

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Pneumologie und Immunologie
-Abt. Pädiatrische Allergologie-
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung und Validierung von neuen Targetgenen für innovative Therapiekonzepte von Asthma bronchiale

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum
(Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl.-Ing. (FH) Martin Krokowski

aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. E. Hamelmann

2. Prof. Dr. med. M. Worm

3. Prof. Dr. med. M. Kopp

Datum der Promotion:

5. Februar 2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1 Epidemiologie.....	11
1.1.1 Definitionen Allergie und Asthma bronchiale.....	11
1.1.2 Häufigkeit von allergischen Erkrankungen.....	12
1.1.3 Genetische Einflüsse.....	13
1.1.4 Umweltfaktoren.....	13
1.1.5 Pathophysiologie.....	14
1.2 Immunologische Grundlagen.....	15
1.2.1 Sensibilisierung.....	15
1.2.2 Entzündung der Atemwege.....	15
1.2.3 Ausbildung von T-Helferzellen Typ1 und Typ2.....	16
1.2.4 T-regulatorische Zellen.....	16
1.3 Pathogenese und klinische Ausprägung von Asthma bronchiale.....	17
1.4 Herleitung der Aufgabenstellung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien, Enzyme und Medien.....	22
2.1.1 Lösungen und Zellkulturmedien.....	22
2.1.2 Oligonukleotide (Primer und Hybridisierungssonden).....	23
2.1.3 Allergen.....	23
2.1.4 Computersoftware.....	24
2.2 <i>In Vivo</i> Tierversuche.....	24
2.2.1 Versuchstiere und Haltung.....	24
2.2.2 Systemische Sensibilisierung.....	25
2.2.3 Provokation mit Allergen.....	25
2.2.4 Serumgewinnung zur Bestimmung der Immunglobuline.....	26
2.2.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Zytozentrifugation.....	26

2.2.6	Invasive Lungenfunktionsmessung im <i>Ex vivo</i> -Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslung (IPML).....	27
2.3	<i>InVitro</i> Versuche.....	27
2.3.1	Bestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA).....	27
2.3.2	Histologie.....	28
2.3.2.1	Gewebefixierung.....	28
2.3.2.2	Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten.....	28
2.3.2.3	Nachweis der Allergen- induzierten Atemwegsentszündung mittels (PAS)-Färbung	29
2.4	Apoptose-Assay (TUNEL-Assay) an Lungengewebeschnitten (Paraffin).....	29
2.5	RNA-Isolierung.....	29
2.5.1	RNA-Isolierung aus murinem Lungengewebe.....	29
2.5.2	RNA-Isolierung aus murinen LA-4-Zellen.....	30
2.5.3	RNA-Quantifizierung mittels NanoDrop.....	30
2.5.4	Bestimmung der RNA-Qualität.....	30
2.6	RT-PCR (cDNA-Synthese).....	31
2.7	Primer und Sonden-Design.....	31
2.8	Quantitative Realtime PCR (TaqMan [®] qPCR).....	32
2.8.1	Mathematische Beschreibung.....	32
2.8.2	Durchführung der TaqMan [®] qPCR.....	32
2.8.3	Etablierung der TaqMan [®] qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe.....	33
2.8.3.1	Auswahl des geeigneten Referenzgens.....	33
2.8.3.2	Überprüfung der optimalen Primer-Sonden-Konzentration.....	33
2.8.3.3	Statistische Auswertung.....	33
2.9	Durchführung der Microarrays.....	33
2.10	Proteinanalytische Methoden.....	34
2.10.1	Proteinextraktion aus Lungengewebe.....	34
2.10.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35

2.10.4	Coomassiefärbung.....	35
2.10.5	Westernblot.....	35
2.11	Zellbiologische Methoden.....	36
2.11.1	Zellkultivierung.....	36
2.11.2	Zytokinstimulierung von LA-4-Zellen.....	36
2.11.3	Apoptose-Assay (TUNEL) LA-4 -Zellen nach Lcn2-Behandlung.....	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Identifizierung gemeinsamer Merkmale von Genen der Atemwegs- entzündung.....	38
3.2	Lcn2 wird stark hochreguliert als Folge akuter und chronischer Allergen- provokation im Mausmodell für Atemwegsentzündungen.....	40
3.2.1	Nachweis der Allergen- induzierten Atemwegsentzündung mittels (PAS)- Färbung in C57BL/6 Mäusen (akutes Mausmodell).....	42
3.3	Lcn2 Defizienz verstärkt allergische Atemwegsentzündung und Apoptose.....	43
3.4	Lcn2 induziert Apoptose in murinen Epithelzellen.....	47
3.5	Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine reguliert.....	48
4.	Diskussion.....	50
4.1	Identifizierung gemeinsamer Merkmale von Genen der Atemwegsentzündung mittels Micro-Array –und quantitativer Realtime-PCR.....	50
4.1.1	Microarrays.....	50
4.1.2	Etablierung der quantitativen Realtime-PCR (qPCR).....	51
4.2	Parallelen des murinen Lcn2 zum homologen humanen NGAL.....	51
4.3	Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und LPS reguliert.....	54
4.4	Apoptose als ein möglicher Wirkmechanismus des Lcn2.....	56
4.5	Lcn2 Defizienz reduziert pulmonale Apoptose <i>in vivo</i>	57
4.6	Lcn2 induziert Apoptose in murinen pulmonalen Epithelzellen <i>in vitro</i>	57
4.7	Alternativen zum Nachweis von Apoptose.....	58
4.8	Mögliche Ansatzpunkte für innovative Asthmatherapien.....	58

5. Zusammenfassung.....60

6. Literaturverzeichnis.....62

Danksagung.....71

Curriculum Vitae72

Publikationen.....74

Eidesstattliche Erklärung.....76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antigenpräsentierende Zellen.....	15
Abbildung 2: Charakteristische Phänomene des allergischen Asthma bronchiale.....	18
Abbildung 3: Pathomechanismus des allergischen Asthmas.....	20
Abbildung 4: Übersicht über Sensibilisierungs- und Provokationsprotokolle.....	26
Abbildung 5: Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge und Druckkammer.....	27
Abbildung 6: Der Agilent 2100 Bioanalizer.....	31
Abbildung 7: Lcn2 wird stark hochreguliert als Folge akuter und chronischer Allergen- provokation im Mausmodell für Atemwegsentzündungen	41
Abbildung 8: Allergische Atemwegsentzündung nach systemischer OVA-Sensibilisierung und –Provokation	53
Abbildung 9: Lcn2-Defizienz steigert den astmatischen Phenotyp im Mausmodell für akute Atemwegsentzündung.....	55
Abbildung 10: Effekte der Lcn2 Blockade mit einem Lcn2-spezifischen Antikörper.....	56
Abbildung 11: Lcn2-Defizienz reduziert pulmonale Apoptose <i>in vivo</i> und Lcn2 induziert Apoptose in murinen pulmonalen Epithellen <i>in vitro</i>	57
Abbildung 12: Lcn2 induziert Apoptose in murinen Epithelzellen.....	58
Abbildung 13: Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine reguliert.....	60
Abbildung 14: Mögliche Effekte der Holo-und Apo-Form von 24p3 im Eisenmetabolismus und Apoptose.....	63
Abbildung 15: Zytokineffekte auf Lcn2 <i>in vitro</i>	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Asthma Schweregrad-Einteilung.....	18
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden für qPCR.....	23
Tabelle 3: Liste hochregulierter Gene nach OVA- Provokation.....	39

Abkürzungsverzeichnis

AI	Atemwegsentzündung
APC	engl. Antigen Presenting Cells
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	BAL-Flüssigkeit
Bp	Basenpaar
BSA	engl. Bovine Serum Albumine
cDNA	engl. Complementary Desoxyribonucleic Acid
COPD	engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease
cRNA	engl. Complementary Ribonucleic Acid
CT-Wert	engl. Threshold Cycle
Da	Dalton
DC	engl. Dendritic Cells
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	engl. Desoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
ECHRS	European Community Respiratory Health Survey
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HRP	engl. Horseradish Peroxidase
IgE	Immunglobulin E
INF- γ	Interferon- γ
IPML	Invasive perfundierte und ventilierte Mauslunge
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
KO	Knock-Out
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales

LAGETSI	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin
Lcn2	Lipocalin2
LPS	Lipopolysaccharid
MAS5	Microarray Suite Software 5.0
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
M-MLV	engl. Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	engl. messenger RNA
NGAL	Neutrophilen gelatinase-assoziierten lipocalin
NIH	National Institutes of Health
OVA	Ovalbumin
PAF	platelet activating factor
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PGD	Prostaglandin
POD	Peroxidase
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonuklease
rRNA	engl. ribosomal RNA
RT-PCR	engl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCF	engl. Stem Cell Factor
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLR	Signal Log Ratio
STAT-6	Signal Transducer and Activator of Transcription-6
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TH	T-Helferzellpopulationen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
Trizima-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Base
TUNEL	engl. terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling
TLR4	Toll Like Receptor 4
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Activation-4 Protein

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

1.1.1 Definitionen Allergie und Asthma bronchiale

Der Begriff „Allergie“ wurde zum ersten Mal von Pirquet im Jahr 1906 eingeführt als eine Umschreibung für die „veränderte Reaktivität“ eines Organismus nach dem zweiten oder weiteren Kontakt mit einem Fremdstoff. Die verschiedenen allergischen Reaktionen erfuhren 1923 eine erste Klassifizierung durch Robert Coca und Arthur Cooke; sie wurde später erweitert durch Philip Gell und Robin Coombs (1963), welche die heute übliche Einteilung der Überempfindlichkeiten einführten. Coca und Cooke prägten den Begriff Atopiker, der andeutet, dass Asthma bronchiale und Heuschnupfen eine genetische Komponente aufweisen, und führten erste Desensibilisierungsbehandlungen durch. Nach heutigem Erkenntnisstand ist eine Allergie eine symptomatische Reaktion auf ein normalerweise harmloses Umgebungsantigen. Sie stellt eine spezifische, immunologische Reaktion dar, die einen vorangegangenen Kontakt des Organismus mit dem Antigen voraussetzt (Janeway et al., 1997). Die allergischen Erkrankungen haben sich von einer am Beginn des vorletzten Jahrhunderts fast unbekanntem Entität zu einer Erkrankungsgruppe mit enormer sozioökonomischer Bedeutung gewandelt (Siegel et al., 1987). In den letzten Jahrzehnten wurde eine ständige Zunahme von jährlichen Neuerkrankungen an Allergie (Inzidenz) beobachtet, die den relativen Anteil von allergischen Patienten an der Gesamtbevölkerung (Prävalenz) ständig wachsen lässt. Allergische Erkrankungen gehören heute in allen Altersklassen der Bevölkerung zu den häufigsten Leiden. Sie können in unterschiedlichen Manifestationen auftreten, so als Nahrungsmittelallergie und Atopische Dermatitis im Säuglings- und Kleinkindesalter, als allergisches Asthma bronchiale im Kindes- und Erwachsenenalter und als so genannter Heuschnupfen im Schulalter und bei Erwachsenen (Hamelmann et al., 2006). Asthma bronchiale ist zur Zeit die häufigste chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, deren Krankheitshäufigkeit in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem in den Industrieländern rasant angestiegen ist (Beasley et al., 1998). Das Asthma bronchiale stellt damit einen außerordentlichen, volkswirtschaftlichen Faktor dar. Als Ursache für die Ausbildung des Asthma bronchiale sind nicht allergische Faktoren, welche das so genannte intrinsische Asthma induzieren können als auch allergische Faktoren bekannt. Über 85 % aller Asthmaerkrankungen lassen sich auf allergische Faktoren zurückführen (Romanet-Manent et al., 2002), zu denen so genannte Inhalationsallergene wie Hausstaubmilbenkot, Katzenepithelien, Birken- und Gräserpollen gehören. Klinisch äußert sich das Asthma bronchiale durch akut auftretende Atemnot verbunden mit einer Atemwegsüberempfindlichkeit als Folge der chronischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen, für die die Infiltration

ration von eosinophilen Granulozyten und T-Helferzellen des Typs 2 (TH₂) charakteristisch ist (Cohn et al., 1997). TH₂-Zellen wird eine zentrale Rolle bei der Regulation der asthmatischen Entzündungsreaktion zugeordnet. Charakteristische Zytokine der TH₂-Zellen wie die Interleukine 4 (IL-4), IL-5 und IL-13 lassen sich mit typischen Merkmalen des Asthma bronchiale verbinden, so z.B. mit einem strukturellen Umbau des Atemwegsgewebes (Remodeling) durch eine erhöhte Mukusproduktion (Lee et al., 1997).

1.1.2 Häufigkeit von allergischen Erkrankungen

Die typischen Manifestationsformen der allergischen Erkrankungen im Kindesalter treten in Abhängigkeit vom Lebensalter der betroffenen Patienten unterschiedlich auf.

Erstes Zeichen für das Vorliegen von Atopie ist zumeist der Nachweis von spezifischer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene, wie z.B. Kuhmilch- und Hühnereiweißproteine. Die frühe Manifestation von Atopie im Sinne einer allergischen Erkrankung ist zumeist das atopische Ekzem, mit einem Inzidenzgefäß im ersten und zweiten Lebensjahr. Ab etwa dem dritten Lebensjahr können auch zunehmend spezifische Sensibilisierungen gegen Inhalationsallergene, wie z.B. Baum- und Gräserpollen oder Hausstaubmilbenallergene, nachgewiesen werden. Gleichzeitig beginnt die Manifestation von Asthma bronchiale, welche typischerweise zwischen dem dritten und zehnten Lebensjahr auftritt. Als letztes entwickelt sich die allergische Rhinokonjunktivitis, mit dem Beginn meist erst im Schulalter und einer deutlichen Zunahme in der Adoleszenz (Hamelmann et al., 2006). Epidemiologische Studien wie die ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) und ECHRS (European Community Respiratory Health Survey) stellten in den vergangenen 30 Jahren einen deutlichen Anstieg der Inzidenz und der Prävalenz des Asthma bronchiale in den industrialisierten Ländern fest (ISAAC, 1998, ECHRS, 1996). Innerhalb Europas liegt die Prävalenz durchschnittlich bei 8,6% (European Lung White Book, 2003), wobei deutliche Unterschiede zwischen den west- und osteuropäischen, ehemaligen Ostblockstaaten bestehen. Mit einer Prävalenz von 10% bei Kindern in Deutschland ist das allergische Asthma die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe (Maziak et al., 2003). Weltweit sind etwa 155 Millionen Menschen vom allergischen Asthma bronchiale betroffen (Asher et al., 1995).

1.1.3 Genetische Einflüsse

Asthma bronchiale wie auch andere allergische Erkrankungen unterliegen einem starken genetischen Einfluss, dem eine komplexe Ätiologie zugrunde liegt. Insgesamt ist bei allergischen Erkrankungen von einem sehr komplexen Vererbungsmodus mit mehreren oder vielen beteiligten Genen auszugehen (multifaktorielle Vererbung), die zusätzlich durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Speziell für die Atopie und IgE-Produktion ergaben sich Hinweise in genetischen Studien, in denen Bereiche identifiziert wurden, die für Faktoren kodieren, die bei der Atemwegsüberempfindlichkeit und der Regulation des Serumspiegels an Immunglobulin E (IgE) eine entscheidende Rolle einnehmen (Hershey et al., 1997). Zur Zeit sind bei einzelnen genetischen Variationen, den so genannten „single nucleotid polymorphisms (SNP`s)“ 64 verschiedene Genabschnitte beschrieben, die mit der Entstehung des allergischen Asthma bronchiale in Verbindung gebracht werden können (Hoffjan et al., 2003). Genabschnitte wie beispielsweise Chromosom 5, auf dem die Gene lokalisiert sind, die für die Th₂-Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 kodieren (Daniels et al., 1996) nehmen damit wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der Asthmapathogenese wahr. Auch auf Chromosom 11, 12 und 16, auf denen Gene lokalisiert sind, die für die β -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors (Hizawa et al., 2000), den „stem cell factor (SCF), Interferon- γ (INF- γ) (Barnes et al., 1987), den „signal transducer and activator of transcription-6 (STAT-6) (Gao et al., 2000), sowie für den IL-4 Rezeptor (IL-4R) (Sandford et al., 2000) kodieren, sind Polymorphismen bei Atopikern bzw. Patienten mit bronchialer Hyperreaktivität beschrieben worden (Heinzmann et al., 2000).

1.1.4 Umweltfaktoren

Mit einem Anstieg der Konzentration von Innenraumallergen ist auch die Zunahme des Risikos für die Entwicklung einer spezifischen Sensibilisierung gegen entsprechende Allergene zu verzeichnen. In Regionen hoher Asthmaprävalenz sind sehr hohe Hausstaubmilbenexpositionen nachgewiesen worden, so dass eine ursächliche Beziehung zwischen Entwicklung und Exposition von Asthma bronchiale postuliert wurde. Einflüsse von Luftschadstoffen auf die Allergieentwicklung und Asthma bronchiale im Speziellen, wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht. Eine sehr gute Abschätzung der Risiken im Hinblick auf die Entstehung allergischer Erkrankungen stellen bislang Studien über die Schadstoffbelastung verschiedener Populationen dar, die zeigen, dass Luftschadstoffe wie Schwefel- und Stickoxide oder Ozon nicht grundsätzlich die Risiken erhöhen, eine Allergie oder Asthma bronchiale zu entwickeln. Dies ist eine Erklärung dafür, dass in einigen Gebieten trotz sehr starker Schadstoffbelastung, wie z.B. in Bergbauregionen in Polen, die Prävalenzen für Allergie und Asthma signifikant niedriger liegen als in weniger

belasteten Regionen, z.B. in skandinavischen Ländern. Es gilt aber als gesichert, dass erhöhte Luftschadstoffbelastungen zur Exazerbation von bestehenden Atemwegserkrankungen wie z.B. Asthma, Pseudokrapp und Bronchitis führen, die auch für ähnliche Aussagen getroffen werden können, die aus Studien über den Einfluss von Tabakrauchexpositionen auf Asthma und Allergie getroffen werden konnten. Ernährungseinflüsse auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen und Atopie sind Gegenstand aktueller Untersuchungen und werden teilweise kontrovers diskutiert (Hamelmann et al., 2006).

1.1.5 Pathophysiologie

Bei Kindern jeder Altersstufe kann es im Verlauf von Atemwegsinfekten zu obstruktiven Bronchitiden, z.T. mit „asthmoider“ Symptomatik kommen. Aufgrund der besonders kurzen und engen Atemwege (besonders bei Säuglingen) führen Verengungen z.B. durch einen Bronchialmuskelspasmus, ein Schleimhautödem oder aufgrund starker Schleimproduktion, zu sehr viel schnellerer Zunahme des Atemwegswiderstandes als bei Erwachsenen. Virale Infekte der oberen und unteren Atemwege (Parainfluenza-, Adeno-, Respiratory Syncytial Virus, RSV) führen im Säuglingsalter meist zu einer obstruktiven Bronchitis, die vor allem durch expiratorisches Gie-men und Brummen angezeigt wird („wheezy bronchitis“). Infektionen mit RSV können im frühkindlichen Alter das Atemwegsepithel direkt schädigen. Dadurch erhöht sich das Risiko für obstruktive Atemwegserkrankungen in der ersten Lebensdekade. Bei der Entwicklung von Asthma bronchiale in der zweiten Lebensdekade stellen RSV-Infektionen der frühen Kindheit kein erhöhtes Risiko mehr dar. Nur ein kleiner Teil der Kinder mit frühen infektassoziierten, obstruktiven Atemwegsbeschwerden können im Schulalter Asthma bronchiale entwickeln, die als so genannte „persistent wheezers“ bezeichnet werden. Man bezweifelt heute daher, dass virale Infekte grundsätzlich wegbereitend für die Entwicklung von Asthma sind. Ihre Rolle als mögliche Triggerfaktoren bei bestehendem Asthma bleibt unbestritten. Es gibt umgekehrt Hinweise dafür, dass bakterielle und oder virale Infektionen im frühkindlichen Stadium einen protektiven Effekt auf die spätere Entwicklung von Atopie und allergischen Erkrankungen ausüben könnten. Jüngere Geschwister kinderreicher Familien zeigen ein deutlich geringeres Risiko bei der Entwicklung von Allergien als ihre älteren Geschwister. Möglicherweise ist dies aufgrund ihrer vermehrten Exposition mit bakteriellen oder viralen Infektionen zurückzuführen .

1.2 Immunologische Grundlagen

1.2.1 Sensibilisierung

An den Grenzflächen eines Organismus werden unablässig Proteine aus der Umwelt aufgenommen. Lösen Anteile dieser Proteine, so genannte Epitope, eine Reaktion des spezifischen Immunsystems aus, bezeichnet man sie als Antigene. Aufgenommene Proteine werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert (Abb. 1) und die Peptidfragmente in Kombination mit dem „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) den Zellen des spezifischen Immunsystems präsentiert. In der Lunge sind für diese Aufgabe Dendritische Zellen (DC) durch ihre Lokalisation im respiratorischen Epithel prädestiniert. Hier treten sie mit zahlreichen Fremdproteinen in Kontakt. Prozessierte Fremdproteine werden von den MHC-Komplexen der DC nach ihrer Wanderung in die lokalen Lymphknoten in Kombination mit kostimulatorischen Oberflächenmolekülen spezifischen T-Zellen präsentiert (Banchereau et al., 1998).

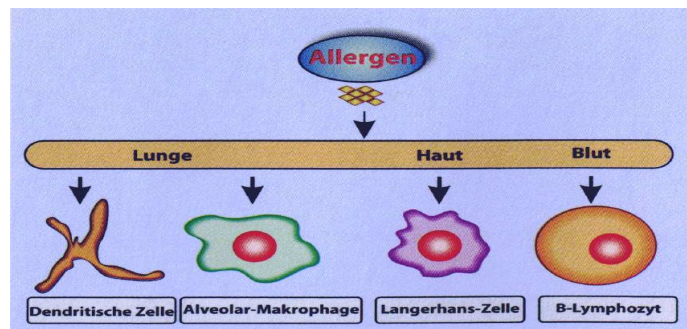


Abb. 1: Antigenpräsentierende Zellen (modifiziert nach Hamelmann et al., 2006)

1.2.2 Entzündung der Atemwege

Nach Antigenpräsentation kommt den antigenspezifischen CD4-positiven T-Helferzellen eine entscheidende Bedeutung zu. Sie proliferieren nach erneutem Antigenkontakt und stimulieren direkt und durch Ausschüttung von Mediatoren B-Zellen zur Differenzierung in Immunglobulin E (IgE) und G4 (IgG4) produzierende Plasmazellklone. Die von den Plasmazellklonen gebildeten spezifischen IgE Moleküle binden mit ihren Fc-Teilen an Mastzellen und basophile Granulozyten, die Fc-ε-Rezeptoren aufweisen. Diese werden für ein spezifisches Allergen „sensibilisiert“. Die Vernetzung zweier IgE Moleküle auf der Oberfläche von Mastzellen führt zu deren Degranulation und Freisetzung von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren (v.a. Histamin), die eine lokale Entzündung auslösen und verstärken. Die klassischen Entzündungszeichen wie Hitze, Röte, Schwellung und Schmerz manifestieren sich in den Atemwegen vor allem als Hype-

rämie, Schleimhautödem, Epithelschädigung und Irritation des sensorischen Nervensystems. Daneben werden auch Zellen des unspezifischen Immunsystems stimuliert, die zum Ort der Entzündung, in die Atemwege, gelockt werden. So kommt es beim Asthma bronchiale zur typischen Infiltration mit Entzündungszellen, v.a. eosinophilen Granulozyten und T-Zellen.

1.2.3 Ausbildung von T-Helferzellen Typ1 und Typ2

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der dem allergischen Asthma zugrunde liegenden Mechanismen gelang mit der Identifikation von drei funktionellen Zuständen der T-Helferzellpopulationen, die als Th1, Th2 und Th0 bezeichnet werden. Sie definieren sich durch die Bildung und Sekretion bestimmter Zytokine, die häufig in fester Kombination als Zytokinmuster vorliegen. Bei den Th1-Zellen sind es v.a. Interleukin- (IL-) 2, IL-12 und Interferon- γ (IFN- γ), während die Th2-Zellen sich durch die Produktion von IL-4, -5, -6, -10, und -13 auszeichnen (Gollob, 1997; Hamelmann et al., 1997). Bei den Gruppen ist die Expression geringer Mengen von IL-3, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) gemeinsam. Naive Th0-Lymphozyten sezernieren die Zytokine beider Zustände; (Firestein et al., 1989). Das erste Signal, das zur Differenzierung von naiven T-Helfer- zu Th2-Zellen führt, ist unbekannt. Möglicherweise ist es die Präsentation einer bestimmten, begrenzten Auswahl von Antigenen in Kombination mit den für die jeweilige Situation adäquaten Zytokinen, oder andere „Umweltfaktoren“, wie bakterielle Bestandteile (Lipopolysaccharid, DNA Sequenz CpG). Kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche der DC, wie B7.2/CD28 könnten dann zur Differenzierung und Proliferation der Th2-Klone führen (Lenschow et al., 1996). Das allergische Asthma ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Zahl von Th2-Zellen. Im Tiermodell konnte ein Teil der Pathophysiologie durch den Transfer von Th2 gerichteten T-Zellen in unbehandelte Tiere imitiert werden (Cohn et al., 1997). Der Effekt der T-Zellen scheint durch die Freisetzung von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 vermittelt zu sein (Wills-Karp et al., 1996).

1.2.4 T-regulatorische Zellen

Die Existenz von regulatorischen T-Zellen (T_{Regs}) war lange Zeit umstritten. Bereits in den 1970er Jahren berichteten verschiedene Forschungsgruppen von *Suppressor-T-Zellen*, die Autoimmunantworten unterdrücken konnten. In den 1980ern und 90ern wurde das Konzept in Zweifel gezogen, weil Daten nicht reproduzierbar waren und die molekularen Mechanismen unbekannt blieben. Erst seit der Mitte der 90er Jahre wurden T_{Regs} verlässlich beschrieben und die Wirkmechanismen wurden teilweise aufgeklärt. In den letzten Jahren haben Untersuchungen

gezeigt, dass bei der allergischen Reaktion und beim Asthma bronchiale nicht unbedingt das Verhältnis von Th1 und Th2 Zellen entscheidend ist, sondern so genannte regulatorische T (T_{Reg}) Zellen (Akbari et al., 2002; Akbari et al., 2003; Curotto de Lafaille et al., 2002; Umetsu et al., 2003). Beim allergischen und beim nicht-IgE vermittelten intrinsischem Asthma bronchiale spielen aktivierte TH2 und regulatorische T_{Reg} Zellen eine zentrale Rolle (Finotto et al., 2002; Larche et al., 2003; Maziak et al., 2003, Neurath et al., 2002). Bei diesen T_{Reg} Zellen handelt es sich um spezialisierte $CD4^+$ T Zellen, die dadurch charakterisiert sind, dass sie ihre Zielzellen supprimieren können (Chinen et al., 2004; O'Garra et al., 2003). T_{Reg} Zellen selbst exprimieren $CD25^{\text{high}}$ und sind mit einer Frequenz von ca. 10 % im peripheren Blut lokalisiert (Asher et al., 1995; Herz et al., 1998). Ein Teil der T_{reg} Zellen exprimiert das suppressive IL-10, die auch als Tr1 Zellen bezeichnet werden (Neurath et al., 2002; Roncarolo et al., 2001). Das suppressive Zytokin „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) wird ebenfalls von einer T_{Reg} Population, den so genannten TH3-Zellen exprimiert (Fu et al., 2004; Tang et al., 2004). Der kürzlich entdeckte Transkriptionsfaktor FOXP3 kommt nur in $CD4^+CD^{25+}$ T Zellen, nicht aber in $CD4^+CD^{25-}$ T Zellen vor und kann demzufolge als spezifisch für T_{Reg} Zellen angesehen werden (Chen et al., 2003; Fontenot et al., 2003; O'Garra et al., 2003; Ramsdell et al., 2003). Die wesentliche Aufgabe dieser Zellen liegt darin, Abwehrvorgänge und Entzündungsprozesse zu limitieren, um Schäden für den Wirt zu begrenzen und Immunreaktionen gegen harmlose Umweltfaktoren und eigene molekulare Strukturen und Zellen zu verhindern. Die Funktion von regulatorischen T-Zellen ist daher sowohl für die Unterdrückung von Immunreaktionen gegen eigene (Autoimmunerkrankungen) wie auch gegen harmlose Umweltfaktoren (Allergische Erkrankungen) von entscheidender Bedeutung (Hamelmann et al., 2006).

1.3 Pathogenese und klinische Ausprägung von Asthma bronchiale

Pathogenetisch zeichnet sich das allergische Asthma bronchiale durch Atemwegs-Entzündung, akute reversible Atemwegs-Obstruktion und Atemwegs-Hyperreaktivität (AHR) der Atemwege aus (Kay et al., 1996). In den vergangenen Jahrzehnten ist es gelungen, diese drei Hauptcharakteristika gut zu definieren (Abb. 2).

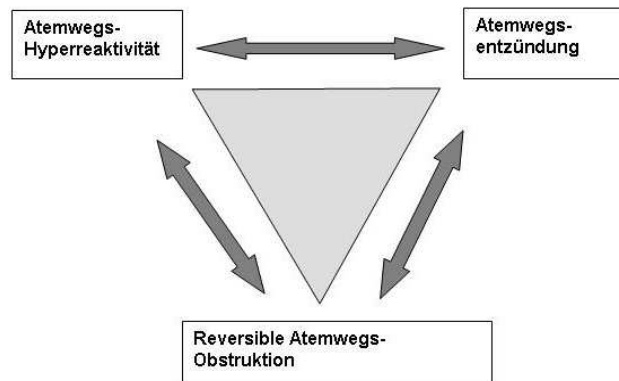


Abb. 2: Charakteristische Phänomene des allergischen Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch Entzündung, akute reversible Obstruktion und Hyperreagibilität der Atemwege.

Kontroverse herrscht dagegen in Bezug auf die Beziehungen zwischen ihnen. Unter experimentellen aber auch klinischen Bedingungen wurden widersprüchliche Beobachtungen gemacht. Einige wissenschaftliche Arbeitsgruppen sehen die bronchiale Hyperreagibilität sowohl zeitlich als auch kausal in Abhängigkeit der Inflammation der Atemwege (Bradley et al., 1991), andere konnten bei langzeitiger Unterdrückung der Entzündung keine Verminderung der Atemwegshyperreagibilität feststellen und betrachten beide als unabhängige Phänomene (Crimi et al., 1998). Die Erkrankung wird nach dem klinischen Schweregrad in leichte, mittelschwere und schwere Erkrankungsformen unterteilt Global Initiative for Asthma, GINA (1994) (Tab.1), auch wird zwischen allergischen Asthmaformen (insbesondere früher auch extrinsisches Asthma genannt) und nicht-allergischen Formen (intrinsisches Asthma) unterschieden.

Tab. 1: Asthma Schweregrad-Einteilung

Stufe	Bezeichnung	Symptome vor Behandlung	Symptome nachts	Peakflow
1	Intermittierend	<1 mal pro Woche Symptome asymptotisch und normaler Peakflow zwischen Anfällen	≤ 2 mal pro Monat	>80% des Sollwerts, Variabilität <20%
2	Geringer Schweregrad	≥1 mal pro Woche Symptome, aber <1 mal pro Tag	> 2 mal pro Monat	>80% des Sollwerts, Variabilität 20-30%
3	Mittlerer Schweregrad	Tägliche Symptome trotz β_2 -Sympathomimetika, Aktivität eingeschränkt	> 1 mal pro Woche	60% - 80% Soll, Variabilität >30%
4	Hoher Schweregrad	Aktivität stark eingeschränkt	häufig	≤60% des Sollwerts, Variabilität >30%

Vereinfacht dargestellt läuft die Erkrankung in zwei Phasen ab: initial kommt es zu einer primären Sensibilisierung durch ein Allergen, z.B. dem Kot der Hausstaubmilbe oder Pollen von Gräsern oder Bäumen, der eingeatmet wird und in den Atemwegen durch Makrophagen und weitere antigenpräsentierende Zellen phagozytiert und anschließend auf deren Oberfläche über MHC II Moleküle präsentiert wird. Hierdurch werden TH₀, naive T Zellen zur Differenzierung in TH₂ Zellen angeregt. Die aktivierten Th₂-Zellen sezernieren zunächst das Zytokin IL-4. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung von B-Zellen, indem es stimulierende Signale wie MHC II und den niedrig affinen IgE-Rezeptor CD23 auf B-Lymphozyten hochreguliert. Daneben führt IL-4 zur Ausreifung IgE und IgG4 produzierender Klone (Snapper et al., 1991). IL-4 wirkt auch auf andere Zellpopulationen des Entzündungsgeschehens. Die Reifung von Mastzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark wird gefördert, und es kommt in den Epithelzellen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) 1, welches in Zusammenhang mit dem auf eosinophilen Granulozyten vorhandenen Very Late Activation-4 Protein (VLA-4) die Gewebeeinfiltration dieser Zellen unterstützt (Chung et al., 1999). Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass IL-4 insbesondere in der Frühphase der allergischen Entzündung eine entscheidende Rolle für die Ausprägung eines Th₂ Phänotyps spielt (McKenzie et al., 2000). In enger funktioneller Verwandtschaft zu IL-4 steht das Zytokin IL-13. Der IL-13 Rezeptor weist große Ähnlichkeiten mit der IL-4 Rezeptor-Kette auf, und die Signaltransduktion beider Zytokine verläuft teilweise über gleiche Wege. Es konnte gezeigt werden, dass IL-13 in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale eine zentrale Rolle spielt (Wills-Karp et al., 1996). Im späteren Verlauf der allergischen Entzündung wird insbesondere das Zytokin IL-5 sezerniert. Im Gegensatz zur vielfältigen Wirkung von IL-4/IL-13 sind es v.a. eosinophile Granulozyten und ihre Vorläuferzellen, die Rezeptoren für dieses Zytokin besitzen (Takaki et al., 1990). IL-5 verstärkt die Bildung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, und hemmt deren Apoptose. T-Zellen des Th₂ Phänotyps bilden einen Grossteil des IL-5 in der allergischen Atemwegsentszündung (Hamelmann et al., 1997). Obwohl die essentielle Rolle von IL-5 für die Eosinophilie im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale heute nicht mehr bezweifelt wird (Van Oosterhout et al., 1995, Hamelmann et al., 1999), ist die Bedeutung dieses Zytokins, ebenso die der Zytokine IL-4 oder IL-13 für die Entstehung der pathologischen Atemwegsreagibilität im Asthma bronchiale bis heute umstritten. Spezifische IgE Antikörper werden gegen das als falsch pathogen erkannte Allergen gebildet, die im Blut zirkulieren und sich in Schleimhäuten ansammeln. Bei dem wiederholten Kontakt mit dem Allergen kommt es zum so genannten „cross-linking“ von mehreren mit dem Allergen verbundenen konstanten Fc Regionen des IgE und den Fc Rezeptoren I auf der gewebständigen Mastzel-

le und innerhalb von Minuten zur Akut-Reaktion (early-phase reaction, Typ I Reaktion) mit Mastzelldegranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Acetylcholin, Prostaglandin PGD₂ und PGF_{2α}, Thromboxan, Leukotriene, sowie PAF (platelet activating factor). Dabei haben die einzelnen Mediatoren eigene und synergetische Wirkungen: Histamin z.B. ist wie Acetylcholin ein potenter Bronchokonstriktor und verursacht zusätzlich eine Vasodilatation und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität (Hartley et al., 1980). PAF zeigte in Versuchen der direkten Inhalation ebenfalls bronchokonstriktorische Wirkung, ist aber primär für die Rekrutierung von Entzündungszellen, vor allem von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und deren Aktivierung verantwortlich, somit trägt PAF auch zur länger anhaltenden Hyperreaktivität bei (Barnes et al., 1987). Die Vermeidung einer anaphylaktischen Reaktion durch eine Mastzelldegranulation im gesamten Körper wird dadurch gesichert, dass der FcεRI Rezeptor erst auf der gewebständigen Mastzelle exprimiert wird (Kaur et al., 2005). Auch exprimieren die verschieden Abwehrzellen zwei unterschiedliche Fcε-Rezeptoren I und II, die eine unterschiedliche Affinität aufweisen: Auf Mastzellen, Basophilen und aktivierten Eosinophilen wird der hochaffine Fcε-Rezeptor I exprimiert. B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Monozyten, Thrombozyten und dendritische Zellen exprimieren den niedrig-affinen Fcε Rezeptor II (Rosenwasser et al., 2005), eosinophile Granulozyten exprimieren beide Arten von Fcε Rezeptoren. Durch das Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren und Abwehrzellen kommt es schließlich zur akuten allergischen Reaktion in der Lunge mit der klassischen Trias: Bronchokonstriktion, Schleimüberproduktion (Mucus hypersekretion) und einer Hyperpermeabilität der pulmonalen Blutgefäße mit Bildung eines peribronchiären Ödems (Abb. 3).

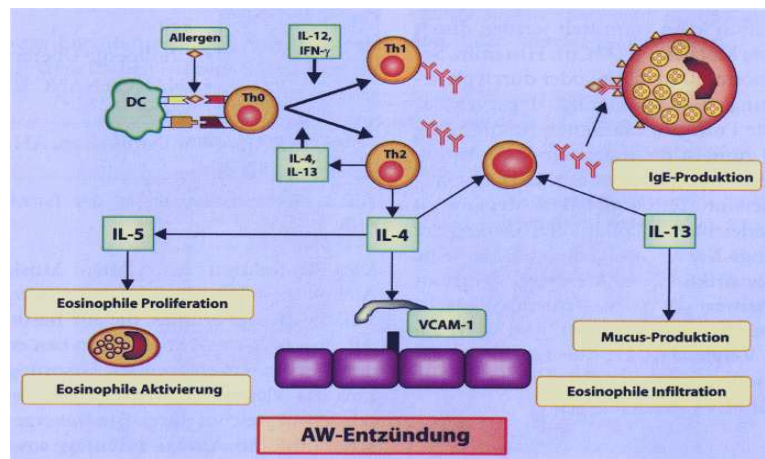


Abb. 3: Pathomechanismus des allergischen Asthmas (modifiziert nach Hamelmann et al., 2006)

Die freigesetzten Zytokine und Chemokine bilden das Milieu für die Spät-Reaktion (late-phase), welche einige Stunden nach dem initialen Ereignis einsetzt und durch das Einwandern (recruit-

ment) und die Aktivierung von weiteren Entzündungszellen gekennzeichnet ist. Was folgt ist eine chronische Inflammation, die über längere Zeit auch einen strukturellen Umbau der Lunge (Remodeling) nach sich zieht und sich in Veränderungen des Epithels und dessen Zelloberflächenmolekülen äußert, was einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber neuen Reizen und Noxen führt (Knight et al., 2003). Weitere strukturelle Veränderungen sind eine subendotheliale Fibrose (Roche et al., 1989), die auch bis in tiefe Schichten reicht (Wilson et al., 1997), sowie Veränderungen der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, einer Verdickung der glatten Bronchialmuskulatur (James et al., 1989) die selbst bei milden Asthmaverläufen eintritt (Benayoun et al., 2003) und Neoangiogenese (Li et al., 1997), bis hin zum teilweisen Funktionsverlust von Lungengewebe (Tang et al., 2006), (Van Eerdewegh et al., 2002). (Zimmermann et al., 2003).

1.4 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Arbeitsgruppe von Prof. E. Hamelmann beschäftigt sich mit der Suche nach neuen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten und präventive Maßnahmen gegen das allergische Asthma bronchiale. Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis der Krankheitsmechanismen bei der Entstehung von Asthma bronchiale durch die funktionelle Analyse neuer Gene im Asthma-Mausmodell zu erhöhen. Durch den direkten Vergleich von Gen-Expressions-Profilen von Maus Stämmen mit unterschiedlichen genetischen Dispositionen sollten wertvolle Informationen für die Charakterisierung der Pathogenese der allergischen Erkrankungen gewonnen werden. Anschließend sollten einzelne Gene, welche bisher noch nicht mit der Pathogenese von Asthma bronchiale assoziiert sind, im Detail analysiert und charakterisiert werden. Konkret wurde in dieser Arbeit das Protein Lipocalin auf seine funktionelle Relevanz sowie dessen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung beim Asthma bronchiale untersucht. Zu diesem Zweck wurden etablierte Mausmodelle der bronchialen Hyperreagibilität die verschiedenen Veränderungen der Lunge auf funktioneller sowie struktureller Ebene, sowie deren molekulare Korrelate in der zeitlichen Entwicklung vom akuten zum chronischen Asthma erfasst. Des Weiteren ermöglichte es, Beobachtungen aus Studien in humanem Gewebe auf Organe oder Zellen zu erweitern, die in Patienten nicht zugänglich sind. Ergebnisse aus humanen und Mausstudien könnten verglichen werden, um gemeinsame Mechanismen der Krankheitsentwicklung zu identifizieren. Weiterhin sollte ermöglicht werden, die Rolle von neu identifizierten Genen aus humanen und Mausmodellen für die Krankheitsentwicklung und -ausbreitung funktionell zu evaluieren. Daraus könnten neue Strategien für eine bessere Prognose, Vorbeugung und Behandlung des Asthmas bronchiale resultieren.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme und Medien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Baxter Chemicals, Biochrom, Sigma-Aldrich, Gibco, Serva, Roche, Fluka, Merck, Roth und Thermo Electron verwendet. Für RNA-Aufreinigung, cDNA Synthese und qPCR wurden Kits und Substanzen von den Firmen Qiagen, Applied Biosystems, Promega, InViTek, benutzt. Die Antikörper, Enzyme, und Zytokine wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology, Roche Diagnostics, KPL, Amersham Pharmacia Biotech, PeproTech, ImmunoTools, R&D Systems bezogen. Für die Zellkultur (Medien) wurden Substanzen von Stanzen von Hyclone, Gibco und PAA eingesetzt.

2.1.2 Lösungen und Zellkulturmedien

Blockpuffer (pH 7,0):

Bovines Serum Albumin BSA, 3 %	Fa. Sigma-Aldrich
1 x PBS pH 7,0	

Gallatipuffer (pH 4,0):

200mM Zitronensäure-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt
4M Kaliumhydroxidlösung	Fa. Merck, Darmstadt
0,01 % Wasserstoffperoxid	Fa. Merck, Darmstadt
2M Schwefelsäure	Fa. Merck, Darmstadt

Gelelektrophoresepuffer:

25 mM Tris-Base,	Fa. Sigma-Aldrich
192 mM Glycin	Fa. Merck
0,1 % (w/v) SDS	Fa. Meck

LA4 Vollmedium:

500 ml F12K Nutrient Mixture	Fa. Gibco
15 % (75 ml) Fötale Kälberserum (FKS)	Fa. HyClone Lab, Logan
1 % (5 ml) Penicillin /Streptomycin	Fa. Biochrom
1 % (5 ml) N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	Fa. Biochrom

RIPA Lysis Puffer (#sc-24948)	Fa. Santa Cruz
--------------------------------------	----------------

2.1.3 Oligonukleotide (Primer und Hybridisierungs sonden)

Für die Durchführung der PCR und quantitativen PCR wurden Primer und Sonden der Firma Eurofins MWG Biotech (Ebersberg) und /oder von der Firma TIPMOLBIOL (Berlin) verwendet. Das Primer-Design der Sequenzen erfolgte mittels der Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Sequenzen für die jeweiligen Referenzgene und Zielgene sind in Tab.2 aufgeführt.

Tab .2: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden für qPCR

Gene	Spezi es	Genbank Acc. No.	Vorwärts- primer 5'- 3'	Rückwärts- primer 5'- 3'	Sonden 5' FAM- 3' TAMRA	Amplikon – Größe (bp)
β-Actin	Maus	X03672	GTTTGAG ACCTTCA ACACCCC A	CTGGTCT CCGTATG T CCC TGT	CCATGTAC GTAGCCAT CCAGGCTG TG	71
Lcn2	Maus	NM_008491	GGCCTCA AGGACGA CAACA	CCACCCA TTCAGTT GTCAAT	CATCTTCT CTGTCCCC ACCGACCA A	68
IL-1 β	Maus	NM_008361	CTCACAA GCAGAGC ACAAGC	ACGGATT CCATGGT GAAGTC	TCCTGGGA AACAACAG TGGTCAGG A	78
IL-4	Maus	M25892	CGCCATG CACGGAG ATG	CGAGCTC ACTCTCT GTGGTGT T	TGCCAAAC GTCCTCAC AGCAACG	68
IL-5	Maus	X06270	AGCACAG TGGT GAAAGA GACCTT	CATCGTC TCATTGC TTGTCAA CA	ACACAGCT GTCCGCTC ACCGAGC	71
IL-6	Maus	NM_031168	AGTTGCC TTCTTGG GACTGA	GTCTCCT CTCCGGA CTTGTG	TGGTGACA ACCCGGC CTTCC	70
Il-10	Maus	M37897	CAGCCGG GAAGACA ATAACTG	CCGCAGC TCTAGGA GCATGT	TTCAACAT CAAGAGCA GTAGCAGT TCCCCT	66
IL-12	Maus	M86671	GGTGCAA AGAAACA TGGACTT G	CACATGT CACT7GC CCGAGAG T	TTCAACAT CAAGAGCA GTAGCAGT TCCCCT	76
IL-13	Maus	M23504	GGAGCTG AGCAACA TCACACA	GCGGCCA GGTCCAC ACT	ACCAGACT CCCCTGTG CAACGGC	74
IFN-γ	Maus	K00083	TGCCAA GTTTGAG GTCAACA A	TGGTGGA CCACTCG GATGA	CCACAGGT CCAGCGCC AAGCA	73
TNF- α	Maus	NM_013693	TCCCCAA AGGGATG AGAAG	AGGGTCT GGGCCAT AGAACT	TCCCCAAT GGCCTCC TCTCA	63

2.1.4 Allergen

Als Allergen wurde Ovalbumin (OVA Grad VI für die systemische Sensibilisierung und OVA Grad V für die Provokation, 100µg/ml; Sigma-Aldrich, 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).

2.1.5 Computersoftware

Zur Bestimmung der RNA-Quantität wurde die Nanodrop[®] ND-1000 Software (NanoDrop, Wilmington, USA) verwendet. Zur Auswertung der quantitativen PCR wurde die ABI PRISM 7300 Sequence Detection System Software Version 1.4 (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Für die Generierung von Primern wurde die Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit der SPSS-Software 17.0 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Für die Auswertungen zur Bestimmung der Apoptose (TUNEL-Assay) im murinen Lungengewebe und murinen LA4-Zellen wurde die öffentlich und frei verfügbare Bildverarbeitungssoftware Image J, Version 4.0 verwendet (National Institutes of Health (NIH),USA). Die Software Affymetrix's Microarray Suite Software 5.0 (MAS5), MicroDB, and Data Mining Tool wurden verwendet für den Scan und die Analysierung der relativen Abundanz jedes einzelnen Gens, basierend auf der Intensität des Signals von jedem Probe-set.

2.2 *InVivo* Tierversuche

2.2.1 Versuchstiere und Haltung

Stamm	Herkunft
BALB/c	Harlan Winkelmann, Borchten
C57BL6 (B6)	Harlan Winkelmann, Borchten
Lcn2-defiziente C57BL6	Dr. Jack B Cowland, Universität Kopenhagen, Rigshospitalet-93.2.2, 9 Blegdamsvej, Copenhagen Ø, DK 2200, Dänemark

Alle für die Versuche verwandten Tiere unterlagen den Vorschriften und Bestimmungen des Tierversuchskomitees des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, LaGeSo und wurden nach der LAGETSI-Registrierungsnummer G0247/3 vom 27.2.2004 genehmigt.

Weibliche BALB/c-und C57BL/6 Mäuse und Lcn2-defiziente C57BL/6 Mäuse, im Alter von 6-8 Wochen wurden unter OVA-freier Diät und unter pathogen-freien Bedingungen in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchowklinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin,

gehalten. Die Lcn2-defizienten C57BL/6 Mäuse wurden freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Dr. Jack B Cowland, Universität Kopenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt. Alle Tiere wurden auf Infektionsfreiheit getestet. Für die Versuche wurden nur 6 bis 8 Wochen alte weibliche Tiere mit ähnlichem Gewicht von ca. 20 Gramm (g) verwendet. Die unterschiedlichen Gruppen der einzelnen Versuche wurden parallel untersucht, meist 4 bis 6 Tiere pro Versuchsgruppe in einem Experiment von 12 bis 16 Tieren.

2.2.2 Systemische Sensibilisierung

Durch die systemische Sensibilisierung werden die Phasen der Sensibilisierung von der Phase der Atemwegs-Provokation mit Allergenen abgegrenzt. Außerdem stellt sie durch die Zufuhr von Adjuvans eine sehr viel stärkere Form der Sensibilisierung dar. Als Adjuvans wurde Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) verwendet, welches wahrscheinlich zu einer Verstärkung der Immunogenität des Antigens/ Allergens führt. Die Mäuse wurden durch i.p. Injektion von 150 μl einer Emulsion aus Allergen (20 μg OVA-Grad VI) in Adjuvans (2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$) an den Tagen 1 und 14 des Protokolls sensibilisiert (Abb. 4).

2.2.3. Provokation mit Allergenen

Bei der systemischen Sensibilisierung fehlt der direkte Kontakt der Atemwege mit dem Allergen. Die Zuführung mit Aerosol über die Atemwege garantiert, dass zumindest ein Teil die tiefen Atemwege erreicht. Jeweils ≤ 8 Mäuse wurden gleichzeitig in eine Acrylkammer (20 x 20 x 15cm, Eigenanfertigung) gesetzt, die auf der einen Seite an einen Ultraschallvernebler multisonic® LS2000 und auf der anderen an einen Abzug angeschlossen war. Über den Ultraschallvernebler multisonic® LS2000 wurde aus einer Lösung von 1% OVA in PBS ein Aerosol an den Tagen 26, 27 und 28 für jeweils 20 min. mit 1% OVA (Grad V) -Lösung in PBS provoziert. Kontrollen waren sensibilisierte Mäuse mit Scheinprovokation durch PBS (Abb. 4).

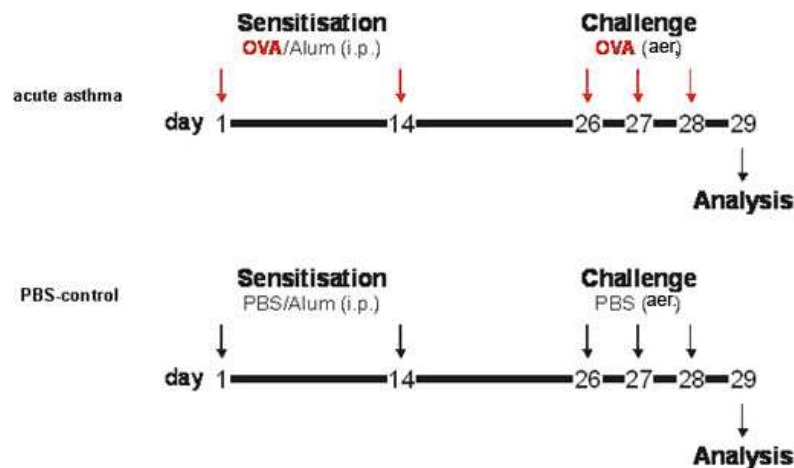


Abb. 4: Übersicht des Sensibilisierungs- und Provokationsprotokolls

2.2.4 Serumgewinnung zur Bestimmung der Immunglobuline

Den Mäusen aus den entsprechenden Gruppen wurde ca. 300-500 μ l venöses Blut aus der durch Infrarotlicht aufgewärmten lateralen Schwanzvene entnommen und in Serumröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation ($1200 \times g$, 10 min, RT) wurde das abgenommene Serum zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Das Gesamt IgE und die allergen-spezifischen IgE, Ig-G1, und Ig-G2a Antikörper wurden mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) bestimmt.

2.2.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Zytozentrifugation

Nach Beendigung des Behandlungsprotokolls erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation. Die Lunge und die Trachea wurden freipräpariert. Mit einer Venenverweilkannüle (0,55 x 25 mm) wurden zweimalig 800 μ l steriles PBS (4°C) unter Sichtkontrolle in die nach oben abgeklemmte Trachea injiziert, wieder aspiriert und anschließend in Eppendorf-Gefäßen auf Eis aufbewahrt. Nach Entnahme eines Aliquots für Zellzählung und Zytozentrifugation wurde die BAL-Flüssigkeit (BALF) bei 4°C zentrifugiert (1200 g, 10 min) und der Überstand für die Zytokin-Bestimmung bei -20°C eingefroren. Die Zellzählung (200 μ l) erfolgte mittels des Zellzählgeräts Cell-Dyn. Je 25 μ l BALF wurden auf einen Objektträger (OT) zentrifugiert (100 g, 5 min.). Die OT wurden mittels Diff-Quick Schnellfärbung gefärbt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte am Mikroskop (Axioplan) unter geblindeten Voraussetzungen bei 250-facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien.

2.2.6 Invasive Lungenfunktionsmessung im *Ex vivo*-Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge (IPML)

Unter kontinuierlicher Beatmung vom Blutkreislauf wurde die Mauslunge des stark narkotisierten Tieres separiert und anschließend mit einer speziellen Elektrolytlösung blutfrei perfundiert. (Abb. 5). Mit dieser Methode ist es möglich, ein intaktes Organ mit funktionaler Integrität zu untersuchen, unabhängig von zentralnervösen, humoralen oder metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus. Die Datenaufzeichnung von Lungenfunktionsparametern z.B. pulmonalarterieller und -venöser Druck, Atemzugvolumen, dynamische Compliance und Atemwegsresistanze können mit dieser Methode kontinuierlich gemessen werden. Über den vaskulären oder den transbronchialen Zugang besteht die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung des Organs (Uhlig et al., 1998).

Die Durchführung der IPML (Witzenrath et al., 2006) der Mauslungen erfolgte in Kooperation mit Frau Stefanie Kube aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Witzenrath, Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

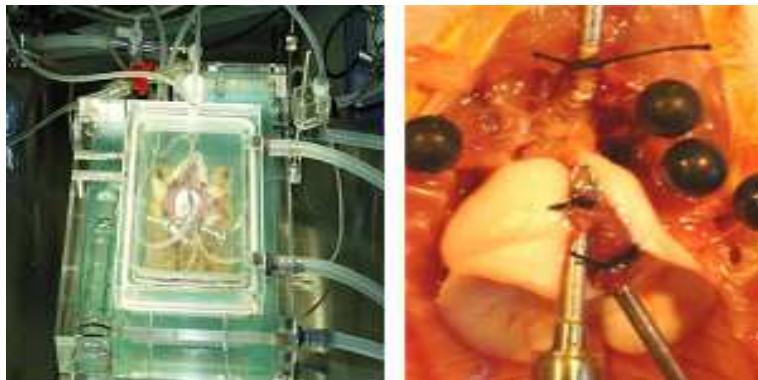


Abb. 5: Isolierte, perfundierte und ventilerte Mauslunge und Druckkammer. (Quelle: Stefanie Kube, AG M. Witzenrath, Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.)

2.3 *In Vitro* Versuche

2.3.1 Bestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Für die spezifischen Immunglobuline gegen OVA wurden 96 well Platten mit OVA (20 µg/ml in PBS) für allergen-spezifische Antikörper beschichtet oder mit polyklonalem anti-Maus-IgE oder anti-Maus-IgG Antikörper (3 µg/ ml in NaHCO₃-Puffer-Lösung, pH 9.6) (für Gesamt-Ig) be-

schichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Blockierung von unspezifischen Bindungen durch den Blockpuffer (150 µl/well, 60 min, RT, Schüttler) und zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Proben und die Standardreihen (50 µl/well) auf die Platten aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde nicht gebundenes Protein durch viermaliges Waschen von der Platte entfernt. Anschließend wurde ein biotinierter sekundärer Antikörper (50 µl/well, 60 min, RT, Schüttler) zugegeben. Nach viermaligem Waschen konnte der Enzymkomplex Streptavidin-Peroxidase, in einer Verdünnung von 1:10000 auf die Platte aufgebracht werden (50 µl/well). Nach 5 x Waschen wurde das Substrat TMB (150 µl/well, 1:100 in Gallati-Puffer verdünnt) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 5 min. mit 2M Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt. Aus der photometrisch gemessenen Extinktion (Testfilter: 450 nm, Referenzfilter: 490 nm) wurde mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration der zu bestimmenden Substanz berechnet.

2.3.2 Histologie

2.3.2.1 Gewebefixierung

Die Zersetzung wird durch die Fixation aufgehalten. Mit dem Standardverfahren der Formalinfixierung kann eine gute Durchdringung und Erhaltung des Gewebes erreicht werden. Formalin, vernetzt Proteine und verleiht dem Gewebe eine gummiartige Konsistenz. Die entnommenen Organe (Lunge, Lymphknoten, Milz, Ganglien) wurden in Einbett-Kassetten gelegt und über Nacht bei RT in einem mit 4 % Formaldehyd-Lösung gefüllten Kunststoffbehälter fixiert.

2.3.2.2 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten

Dauerpräparate wurden mittels Paraffineinbettung hergestellt. Die bei der Paraffin-Einbettung vorausgehende Entwässerung der Präparate wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe über HistoClear im Gewebeeinbettungsautomat (Hypercenter) der Firma Thermo-/Shandon (Frankfurt) erreicht. Anschließend wurden die in Paraplast befindlichen Organe mit Hilfe des Paraffineinbettungsgerätes von Microm (Fa. Walldorf) in Blöcke gegossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Am Rotationsmikrotom HM 355s (Fa. Microm, Walldorf) wurden 2µm dicke Lungengewebeschnitte auf Superfrostobjektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Qualität der Gewebeschnitte wurde mit dem Lichtmikroskop überprüft.

2.3.2.3 Nachweis der Allergen- induzierten Atemwegsentzündung mittels (PAS)-Färbung

Zur Überprüfung ob die Immunisierung im akuten Mausmodell erfolgreich war, wurden von beiden Mausstämmen (BALB/c versus C57BL/6) Paraffinschnitte von der Lunge von PBS -und OVA sensibilisierten- und provozierten Mäusen mittels der PAS-Färbung nach Darcan et al. ,2005 auf histologische Veränderungen hin untersucht.

2.4 Apoptose-Assay (TUNEL-Assay) an Lungengewebeschnitten (Paraffin)

Für die Durchführung eines Apoptose-Assays wurde der InSitu Cell Death Detection Kit, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Lungenparaffingewebeschnitte (2.3.2.2) wurden über Nacht bei 37⁰C im Brutschrank (Fa. Heraeus) inkubiert deparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Sekunden (s) in -20⁰C kaltem Aceton eingetaucht und danach 2 x in 1x PBS gewaschen. Nach dreimaligen Xylene-Substitute-Bad für jeweils 15 Minuten (min.) wurden die Schnitte 2 x für 10 min. mit 100 % Ethanol, 2x 10 min. mit 96 % Ethanol, 1 x 5 min. mit 80% Ethanol und 1 x 5 min. in 70 % Ethanol gewaschen und abschließend mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) abgespült und bei Raumtemperatur (RT) für 15 min. mit Proteinase K in PBS (20 µg /ml) inkubiert und im Anschluss 5 x kurz in PBS gewaschen. Zur Blockierung von endogener Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte für 5 min. in 3% Wasserstoffperoxid in PBS (H₂O₂) inkubiert und danach kurz in 1x PBS gespült. Die Färbung und Signal-Konvertierung wurde wie vom Hersteller im Anleitungsprotokoll angegeben, durchgeführt. Die Analyse der Gewebe erfolgte am Durchlichtmikroskop (Fluoreszenzmikroskop DMRA2, Fa. Leica).

2.5 RNA-Isolierung

2.5.1 RNA-Isolierung aus murinem Lungengewebe

Zur Isolierung der RNA aus murinem Lungengewebe wurde das Aufreinigungskit RNeasy® Minikit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Lungenhälften wurden mit einem Ultra Turrax®-Gerät (Ika, Staufen) oder mittels des Tissue Lyser®-Gerätes (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Pro 25 mg Gewebe wurden 600µl RLT Lysispuffer (10µl β-Mercaptoethanol/ ml RLT) hinzugefügt und die Lungenzellen lysiert. Zur direkten Weiterverarbeitung wurden 600µl des Lysats in ein RNA-se-/DNase- freies 1,5ml Tube überführt, der Rest wurde bei -80°C weggefrohren. Anschließend wurde wie vom Hersteller im Anleitungsprotokoll angegeben, die RNA-Isolierung durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte mittels NanoDrop; die Bestimmung der RNA-Qualität erfolgte mittels Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.5.2 RNA-Isolierung aus murinen LA-4-Zellen

Die in 12 well Zellkulturplatten konfluent in LA4-Vollmedium gewachsenen LA-4-Zellen (ca. $>1 \times 10^6$ Zellen/well) wurden mit 2 ml/well PBS (Mg/Ca-frei) gewaschen und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen pro well mit 600 μ l RLT-Lysispuffer (10 μ l β -Mercaptoethanol/ 1ml RLT) aus dem RNeasy® Minikit (Qiagen, Hilden) lysiert und in ein RNase-/DNase- freies 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die RNA wie in 2.5.1 beschrieben, isoliert.

2.5.3 RNA-Quantifizierung mittels NanoDrop

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop, Fa. peQLab) bestimmt. Hierbei basiert die Konzentrationsbestimmung auf dem Verhältnis der gemessenen Abschwächung des emittierten Lichtstrahls (Extinktion) bei einer bestimmten, für die zu untersuchenden Probe spezifischen Wellenlänge (RNA: 220 nm bis 350 nm). Dargestellt wird die Absorption über des gesamte von der Xenon-Blitz-Lampe emittierte Spektrum.

2.5.4 Bestimmung der RNA-Qualität

Die Qualität der gewonnenen Proben wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) überprüft. Hierbei wird das Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten 28S : 18S-rRNA, sowie degradierte Abbauprodukte in ein Verhältnis gesetzt und mittels der Agilent 2100 Expert- Software ein RIN-Wert auf einer Skala von 1 bis 10 (Abb. 6) ermittelt wird. Dabei entspricht 1 einer vollständig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA (Fleige et al., 2007). Für die weitere Genchip Analyse wurden nur Proben verwendet, deren RIN-Werte auf einer Skala bei 9 und höher lagen. Das Gerät und die Analysen der RNA-Proben zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Grützkau, Projektleiter des Deutschen Rheumaforschungszentrums in Berlin (DRFZ) zur Verfügung gestellt und durchgeführt.

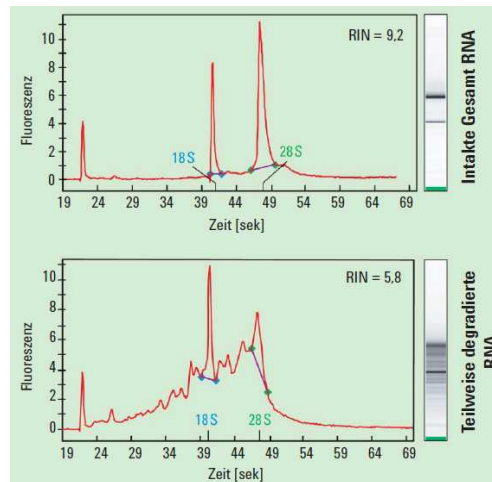


Abb. 6: Der Agilent 2100 Bioanalyzer stellt die Ergebnisse der Qualitätssicherung in gelähnlichen Abbildungen wie auch als elektrophoretische Daten dar (Quelle: Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies)

2.6 RT-PCR (cDNA-Synthese)

Die isolierte totale RNA wird mit einer „reversen Transkriptase“ in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert. Zur Synthese der cDNA-Synthese wurde die M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) verwendet, welche eine zusätzliche RNase H(-)Aktivität aufweist. Random Hexamer Poly-(T)-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) werden zum Start der reversen Transkription dem Reaktionsansatz hinzugefügt, wodurch ca. 150 bp große RNA-DNA-Hybride entstehen. Als Ausgangsmaterial wurde 1 µg totale RNA eingesetzt. Hierzu wurden 8,3 µl der Random-Hexamer Primer (250 ng / 8,3 µl) gegeben und um das Gesamtvolumen von 14 µl zu erhalten mit der entsprechenden Menge ddH₂O aufgefüllt. Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde das RNA-Random-Hexamer-Gemisch 5 min. bei 70°C und anschließend 5 min. auf Eis inkubiert.

2.7 Primer und Sonden-Design

Das Design der Primer und Sonden erfolgte mit der Software Primer Express (v3.0 Release Notes Copyright 1999-2004, Applied Biosystems, Darmstadt). Hierbei wurden verschiedene Qualitätskriterien berücksichtigt wie die durchschnittliche Länge von 18-22 bp, die eine ausreichende Spezifität des Primers und gleichzeitig gute Bindungseigenschaften ermöglicht, sowie die Schmelztemperatur (T_M) die definiert ist als die Temperatur, bei der die Hälfte der vorhandenen DNA Helices zu Einzelsträngen dissoziiert vorliegen. Diese liegt im optimalen Bereich zwischen 52 bis 58°C und kann über den G-C-Gehalt der Sequenz abgeschätzt werden. Der G-C-Gehalt sollte zwischen 40-60% liegen. Vermieden werden sollten Sekundärstrukturbildungen wie *hair-*

pins, *self dimer* und *cross dimer*, welche die Effektivität der Primer herabsetzen. Die Primer wurden über die Firma eurofins MWG Biotech (Ebersberg) oder TIPMOLBIOL bezogen. Eine Übersicht der verwendeten Primer und Hybridisierungs sonden ist in Tab. 2 aufgeführt.

2.8 Quantitative Realtime PCR (TaqMan[®] qPCR)

2.8.1 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 Herleitung der Formel für die Menge des Zieltranskriptes erfolgte nach der Methode von Livak et al. (Livak et al., 2001).

2.8.2 Durchführung der TaqMan[®] qPCR

Zur Quantifizierung von mRNA wurde die quantitative PCR mit dem ABI PRISM 7300 Taqman[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Das verwendete Geamtreaktionsvolumen betrug jeweils 25 μ l.

2.8.3 Etablierung der Taqman-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe

2.8.3.1 Auswahl des geeigneten Referenzgens

Zur relativen Quantifizierung der Expression der Zielgene (Tab. 2) wurde das optimale Referenzgen für die RNA aus Lungenlysaten PBS- bzw. OVA-sensibilisierter Mäuse in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Alexander Meyer und Herrn Christoph Heidt bestimmt. Verwendet wurde das geNorm[®] Housekeeping Gene Selection Kit (Southampton, Großbritannien). In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen das murine β -Actin verwendet.

2.8.3.2 Überprüfung der optimalen Primer-Sonden-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen der eingesetzten Primer wurden mehrere qPCR-Läufe durchgeführt, bei denen forward- und reverse-Primer und den dazu korrespondierenden Hybridisierungssonden in unterschiedlichen Konzentrationen (900, 450, 150 50 nM) und unterschiedlichen Konzentrationskombinationen eingesetzt, während die Konzentration der Probe konstant (200 nM) blieb.

2.8.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter paarweiser Betrachtung jeweils der OVA und der PBS-Gruppe zu den einzelnen Analysezeitpunkten mittels des *Mann-Whitney-U-Tests*. Die statistische Signifikanz wurde als $P < 0,05$ festgelegt. In den Darstellungen entsprechen die Werte Mittelwerten aus den Einzeltieren \pm Standardfehler.

2.9 Durchführung der Microarrays

Doppelsträngige cDNA wurde aus totaler RNA revers umgeschrieben, welche zuvor aus ganzen Mauslungen mit dem SuperScript Choice kit (Invitrogen, Paisly, UK) extrahiert wurde. Hierbei wurde ein T7- (dT) 24 primer verwendet, der zusätzlich einen T7 RNA polymerase Promotor enthielt (Metabion, Martinsried, Germany). cRNA wurde synthetisiert und Biotinmarkiert durch in vitro Transkription (Enzo Biochemical, New York, USA). Die so markierte RNA wurde fragmentiert durch Inkubation bei 94°C für 35 min. in Gegenwart von 40 mM Tris-OAc (pH 8.1), 100 mM KOAc, und 30 mM MgOAc. Die so fragmentierte und markierte cRNA (15 μ g) wurde für 16 h bei 45°C auf einen MG-U74Av2 Maus Genomarray (Affymetrix, High Wycombe, UK) hybridisiert. Anschließend wurden die Genchips automatisch gewaschen und mit Streptavidin-phycoerythrin in einer Fluidstation gefärbt. Die Gen-bzw. Probearrays wurden in einem

Genechip Scanner (Agilent, Böblingen, Germany). mit konfokaler Optik mit einer Auflösung von 3- μ m gescannt Jede cRNA Probe aus jeweils einer Mauslunge wurde auf einem MG-74Av2 array hybridisiert. Insgesamt wurden 8 Mauslungen analysiert, zwei mit Ovalbumin sensibilisierte und provozierte Mäuse versus zwei PBS-Kontrollen in zwei jeweils verschiedenen Mausstämmen (BALB/c and C57BL/6). Die Software Affymetrix's Microarray Suite 5.0 (MAS5), MicroDB, and Data Mining Tool wurden verwendet für den Scan und die Analysierung der relativen Abundanz jedes einzelnen Gens, basierend auf der Intensität des Signals von jedem Probe-set. Die Anordnung der Datenreihen wurde skaliert zu einem Zielwert von 150 (Abgrenzung des Skalierungsfaktors 0.33-0.96) durch die Auswertungssoftware MAS5. Die von den unterschiedlichen Mausstämmen generierten Daten wurden separat ausgewertet. Alle Gene mit einem "absent call" ($p > 0.06$) in allen 4 Proben wurden von den initialen Gruppen ausgenommen. Die Durchführung der Microarrays erfolgte als Forschungsauftrag bei der Firma Microarray Facility Medical Genetics, Calwerstrasse 7, 72076 Tübingen.

2.10 Proteinanalytische Methoden

2.10.1 Proteinextraktion aus Lungengewebe

Bei -80 °C gefrorenes Lungengewebe (bzw. BAL-Fluid) wurde abgewogen und jeweils 1 g Lungengewebe mit jeweils 3 ml RIPA-Lysis Puffer (Santa Cruz; #sc-24948) versetzt und anschließend mit dem Ultra Turrax® auf Eis gründlich homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat bei 10.000 rpm für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 10.000 rpm für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Das klare Lysat wurde in ein steriles Falconröhrchen überführt und diente als Ausgangsmaterial für die weitere Western-Blot Analyse. Ein Aliquot pro Proteinprobe wurde zuvor abgenommen und für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford et al., 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Quick Start™ Bradford Protein Assay, sowie Bovine Serum Albumine (BSA) zur Kalibrierung (Fa. Biorad) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anwendungsvorschrift des Herstellers. Da die Intensität der Farbreaktion von Protein zu Protein verschieden ist, wurde zur genauen Konzentrationsbestimmung eine Kalibrationslösung des zu bestimmenden Proteins verwendet.

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden (Laemmli et al., 1970). Die aufzutrennenden Proteinproben wurden vor dem Auftrag 10 bis 15 min. bei 95 °C in SDS-Probenpuffer (2 % (w/v) SDS, 60 mM Tris Base, 10 % (v/v) Glycerol und 50 mM DTT) denaturiert und auf einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Gelelektrophoresepuffer wurde 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Der Lauf erfolgte bei 50 mA. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) übertragen (Westernblot) oder mit 10 %iger (w/v) Essigsäure fixiert (Coomassiefärbung).

2.10.4 Coomassiefärbung

SDS-Gele wurden kurz in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert und dann mit Coomassiefärbelösung (2 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250 in 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Entfärbt wurde mit demselben Gemisch, jedoch ohne Coomassie Brilliant Blue.

2.10.5 Westernblot

Die Proteine, extrahiert aus den Mauslungen bzw. aus BAL-Fluid, wurden zur weiteren Untersuchung mit SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (0,45 µm Porengröße, Fa. Schleicher & Schuell) Membranen mittels des Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer cell (Fa. Biorad) bei 10 Volt (V), 90 min. transferiert (Blot). Anschließend wurde der Blot in 5% Blockpuffer für 60 min. bei Raumtemperatur (RT) geblockt, danach in Waschpuffer (PBS-Tween (0,05%)) drei mal für 15 min. gewaschen und der Blot mit dem Primärantikörper anti-NGAL (clone M-12, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1:000 verdünnt in 1-10 ml Blockpuffer über Nacht bei 4 °C bei leichtem Schwenken inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen für 15 min. wurde der Blot mit Peroxidase (HRP) konjugiertem Sekundärantikörper (1:10000 verdünnt, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) für 1 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurde der Blot mit dem ECL-Plus –Nachweissystem (Amersham Life Science, Little Chalfont) entsprechend nach den Angaben des Herstellers behandelt.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Zellkultivierung

Murine Lungenepithelzellen der Linie LA-4 (ATCC[®] Number:CCL-196TM) wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Dem Medium (500 ml F12K Nutrient Mixture, Fa. Gibco) wurden 15 % (75 ml) hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FKS) (Fa. HyClone Lab, Logan), 1 % (5 ml) Penicillin /Streptomycin (Fa. Biochrom) und 1 % (5 ml) N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Fa. Biochrom) zugesetzt. Die Zellen wurden unter der sterilen Werkbank (HERA Safe) subkultiviert.

2.11.2 Zytokinstimulierung von LA-4-Zellen

Eine Zellkulturflasche (Easy Flask 75 cm², Fa. Nunc) konfluent gewachsener LA4-Zellen wurden mit 0,5 – 1ml Trypsin/EDTA abgelöst, in ein steriles 15 ml Falcon Röhrchen überführt und bei 1200 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS (Mg/Ca-frei) gewaschen und bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem LA-4 Vollmedium resuspendiert. Zu 3 ml Zellsuspension wurden 47 ml Vollmedium mit einer sterilen Pipette in eine neue Zellkulturflasche (75 cm² EasyFlask, Fa. Nunc) gegeben und die Zellen so subkultiviert. Die restlichen 7 ml Zellsuspension wurden mit 75 ml Vollmedium auf 82 ml aufgefüllt und auf 3 x 12 well-Platten mit jeweils 2 ml Zellsuspension/well verteilt. Die restliche Zellsuspension (10 ml) wurde verworfen. Die so ausplattierten Zellen ließ man konfluent wachsen und wurden dann mit den Zytokinen IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INF- γ , TNF- α , und LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Zellkulturüberstände der 12 well Platten wurden abgesaugt und verworfen. Zu je 1 ml Vollmedium wurde eine jeweilige ansteigende Konzentration an Stimulanz hinzugegeben. Abschließend wurden die Zellen mit 200 μ l RLT-Lysispuffer lysiert, die RNA isoliert und für spätere Realtime-PCR Analysen bei -80 ⁰C weggefroren.

2.11.3 Apoptose-Assay (TUNEL) LA-4 -Zellen nach Lcn2 –Behandlung

Murine LA-4 Zellen wurden in 8fach Chamber slides (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System, Fa. Nunc) mit jeweils 5×10^3 Zellen/slide bis zur Konfluenz kultiviert. Jeweils 4 slides wurden mit rekombinantem Lcn2-Protein (5 μ M) in LA-4 Vollmedium für 24 Stunden (h) pro Zell-slide inkubiert. Als Kontrolle wurden 4 slides mit LA-4 Vollmedium mitgeführt. Für die Durchführung des Apoptose-Assays wurde der InSitu Cell Death Detection Kit, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wie in 2.4 verwendet. Die luftgetrockneten LA-4 Zellen wurden mit 4%igen Paraformaldehyd in PBS (pH 7.4) für 1 h bei RT fixiert, anschließend in PBS zweimal kurz gespült und für 10 min. in 3% H₂O₂ Methanol blockiert. Nach dem Blocken wurden die Zellen mit frisch angesetztem 0.1 % Triton X-100 in 0.1 % Natriumcitrat für 2 min. auf Eis permeabilisiert und danach kurz zweimal in PBS gespült. Die Färbung und Signal-Konvertierung wurde wie in 2.4 beschrieben, durchgeführt. Die Quantifizierung wurde lichtmikroskopisch (DMRA2, Fa. Leica) durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Bildverarbeitungssoftware Image J, Version 4.0 verwendet (National Institutes of Health (NIH) Maryland, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung gemeinsamer Genexpression im Zuge von Atemwegsentzündung

Um Gene zu entdecken, die bei der allergischen Atemwegserkrankung, unabhängig von der genetischen Disposition, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielen könnten, wurden Vergleiche zwischen PBS -und OVA sensibilisierten- und provozierten Mäusen einerseits und zwei verschiedene Mausstämme (BALB/c versus C57BL/6) mit verschiedener genetischer Disposition für die Induktion einer allergischen Atemwegserkrankung andererseits verwendet, um regulierte Gene mittels der Microarray-Technologie zu finden.

Aus Mauslungengewebe sowie aus peribronchialen Lymphknoten isolierte totale RNA wurde verwendet, um Affymetrix (2.9.) basierte Genexpressionsprofile zu generieren. Lungengewebe und peribronchiale Lymphknoten wurde 16 Stunden nach einer einzelnen Atemwegsprovokation entnommen, um Gene zu einem frühen Zeitpunkt der Atemwegsentzündung zu analysieren. Die Genexpression wurde zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen aufgrund bekannter Unterschiede bei der Entstehung von Atemwegsentzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität (AHR) zwischen diesen beiden Mausstämmen (Herz et al., 1998) verglichen. Signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen induzierten asthmatischen Mäusen und Kontrolltieren wurde im Lungengewebe sowie in den peribronchialen Lymphknoten gefunden. Insgesamt wurden in der Lunge 6 bis 10 % der untersuchten Gene differentiell reguliert. OVA-sensibilisierte und provozierte C57BL/6 Mäuse wiesen eine veränderte Expression von 370 probe sets verglichen mit naiven Kontroll-Mäusen auf. OVA-sensibilisierte und provozierte BALB/c Mäuse zeigten hingegen eine veränderte Expression von 2128 probe sets im Vergleich zu naiven Kontroll-Mäusen. Zwischen diesen beiden probe sets waren 95 probe sets konsistent hochreguliert in sensibilisierten und provozierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Lediglich 31 probe sets kodierten für 27 verschiedene Gene, die mindestens zweifach hochreguliert waren in beiden verschiedenen Mausstämmen, darunter auch das Lipocalin2 (Tab. 3).

Tab. 3: Liste mindestens 2 fach hochregulierter Gene nach OVA- Provokation in beiden Mausstämmen (BALB/c und C57BL/6)

Identifizier	Gene Title	Gene symbol	BALB/c (fold-change)	C57BL/6 (fold-change)
EDL04793	arginase 1, liver	Arg1	66,2 ± 15,8	13,4 ± 1,6
BE200119	small chemokine (C-C motif) ligand 11	Ccl11	14,2 ± 6,5	2,8 ± 0,4
BC145867	chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	9,9 ± 0,4	11,9 ± 1,9
L04694	chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	39,4 ± 6,2	20,4 ± 7,6
AAF22536	chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	3,5 ± 0,6	2,8 ± 0,2
AAH39919	cholesterol 25-hydroxylase	Ch25h	3,8 ± 0,2	3,3 ± 0,5
U56900	chitinase 3-like 3	Chi3l3	4,8 ± 0,5	2,6 ± 0,4
BC011134	chitinase, acidic	Chia	35,8 ± 13,9	3,2 ± 0,1
BC116319	chloride channel calcium activated 3	Clca3	65,8 ± 35,0	32,5 ± 1,1
AAD15798	Cytokine-responsive protein CR6	CR6	4,0 ± 0,7	2,1 ± 0,1
AK180750	esterase D/formylglutathione hydrolase	Esd	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2
AK170282	coagulation factor X	F10	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3
BG087011	glycine amidinotransferase	Gatm	2,4 ± 0,2	2,7 ± 0,5
BC010823	glutathione peroxidase 2	Gpx2	7,9 ± 2,9	2,6 ± 0,2
BAE27469	glutathione S-transferase omega 1	Gsto1	4,0 ± 0,3	2,5 ± 0,2
AK085689	potassium inwardly-rectifying channel	Kcnj15	180,3 ± 54,7	2,1 ± 0,3
AAI32070	lipocalin 2	Lcn2	9,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3
BAE42486	matrix metalloproteinase 12	Mmp12	4,2 ± 0,8	4,5 ± 1,1
AAH61139	regenerating islet-derived 3 gamma	Reg3g	45,7 ± 15,7	2,6 ± 0,3
AAH55885	serum amyloid A 3	Saa3	10,9 ± 0,6	57,1 ± 6,9
AAA40130	serine peptidase inhibitor, member 3N	Serpina3n	5,8 ± 0,6	3,3 ± 0,5
AF208031	solute carrier family 5, member 1	Slc5a1	19,7 ± 17,4	2,7 ± 0,2
CAM19105	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,3
AK007633	small proline-rich protein 2A	Sprp2a	8,9 ± 1,8	2,5 ± 0,7
AK007296	sulfiredoxin 1 homolog	Srxn1	9,4 ± 3,0	2,1 ± 0,1
BC008107	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	5,7 ± 1,2	2,5 ± 0,3
BC004676	upstream binding transcription factor	Ubtf	5,3 ± 0,7	2,3 ± 0,1

3.2 Lcn2 wird stark hochreguliert als Folge akuter und chronischer Allergenprovokation im Mausmodell für Atemwegsentzündungen

Aus der Liste hochregulierter Gene nach OVA- Provokation (Tab. 3) wurden einzelne Zielgene herausgesucht und weiter im Detail bearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf Lipocalin (Lcn2) gelegt, weil es für dieses Gen möglich war, Lcn2-defiziente (KO) Mäuse durch eine Kooperation mit Dr. Jack B. Cowland (Universität Kopenhagen, Dänemark) für weitere Analysen zu erhalten. Mit der quantitativen Realtime PCR konnten die Ergebnisse aus den Microarray-Analysen bestätigt werden. Die qPCR-Analysen zeigten eine 2,7-fach erhöhte Lcn2 mRNA Expression in BALB/c und eine 3,3-fache erhöhte Lcn2 mRNA Expression in C57BL/6 Mäusen im Vergleich OVA sensibilisierter und provoziertes Mäuse zu mit PBS behandelten Mäusen im akuten Mausmodell (Abb. 7A).

Neben der akuten Reaktion wurde auch untersucht ob in einem Langzeit chronischen Modell immer noch eine erhöhte Lcn2 Konzentration in den OVA/OVA Tieren beobachtet werden konnte. In einem Mausmodell mit chronischer Atemwegsentzündung, bei der 12 Wochen lang eine wiederholte Allergenexposition verabreicht wurde, konnte eine erhöhte Lcn2-Expression bestätigt werden (Abb. 7B). Western-blot Analysen von BALF bestätigten die erhöhte mRNA Expression durch eine erhöhte Translation und Produktion des sekretierten Proteins (Abb. 7C).

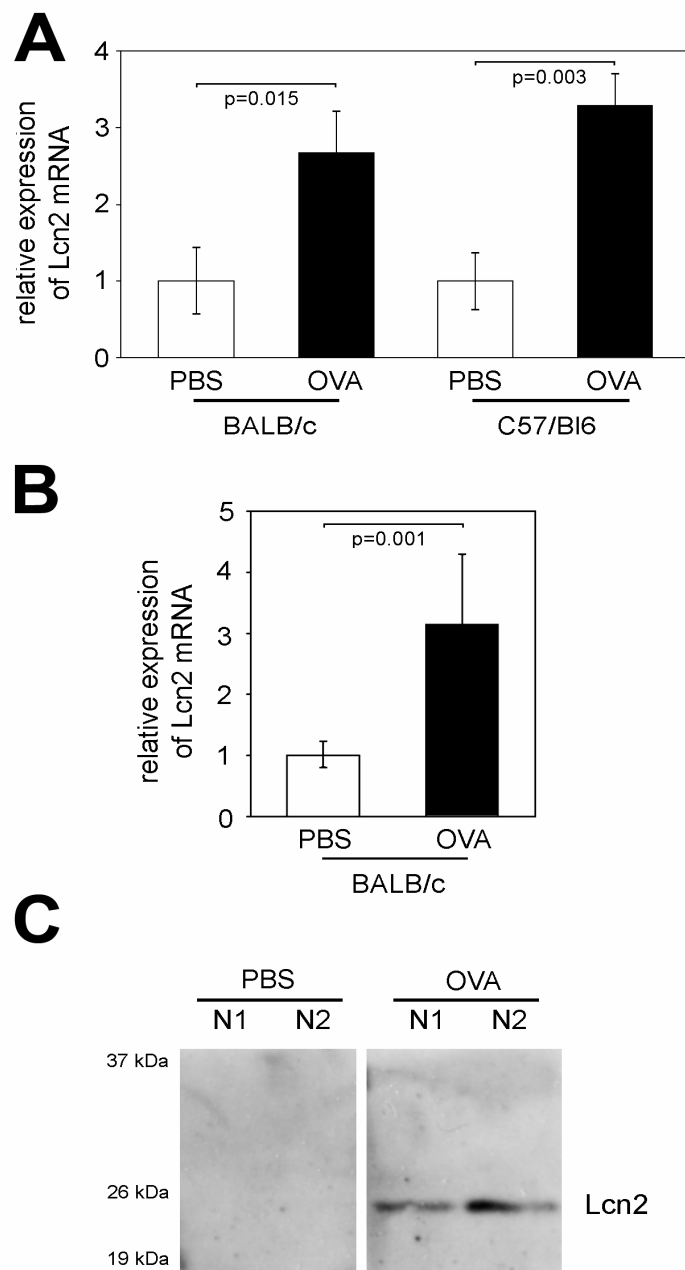


Abb. 7:

Lcn2 wird 2 bis 3 fach hochreguliert als Folge akuter und chronischer Allergen-provokation im Mausmodell für Atemwegsentzündungen. Vergleiche von mRNA-Levels aus der Lunge (Mittelwert \pm Standardabweichung) allergischer Mäuse (OVA, n=10) zu scheinbehandelten Tieren (PBS, n=10) in einem akuten (**A**) und chronischen (**B**) Modell der Atemwegsentzündung zeigten deutlich höhere Mengen von Lcn2 in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung (PBS, n=10; OVA, n=10). BALFs von allergischen Mäusen (OVA, N1-2) verglichen zu BALFs scheinbehandelter Tiere (PBS, N1-2) in einem akuten Modell der Atemwegsentzündung zeigten ebenso höhere Mengen des Lcn2 Proteins in Tieren mit Atemwegsentzündung (**C**).

3.2.1 Nachweis der Allergen- induzierten Atemwegsentzündung mittels (PAS)-Färbung in C57BL/6 Mäusen (akutes Mausmodell)

Zur Überprüfung ob die Immunisierung im akuten Mausmodell erfolgreich war, wurden von beiden Mausstämmen (BALB/c versus C57BL/6) Paraffinschnitte von der Lunge von PBS -und OVA sensibilisierten- und provozierten Mäusen mittels der PAS-Färbung auf histologische Veränderungen hin untersucht (Darcan. et al. 2005). Die PAS-Färbung der Lungenschnitte von Mäusen mit Allergen-induzierter Inflammation zeigte sowohl peribronchiale, als auch perivaskuläre Infiltrate, während diese Merkmale in den Kontrollgruppen nicht nachgewiesen werden konnten.

Akutes Mausmodell

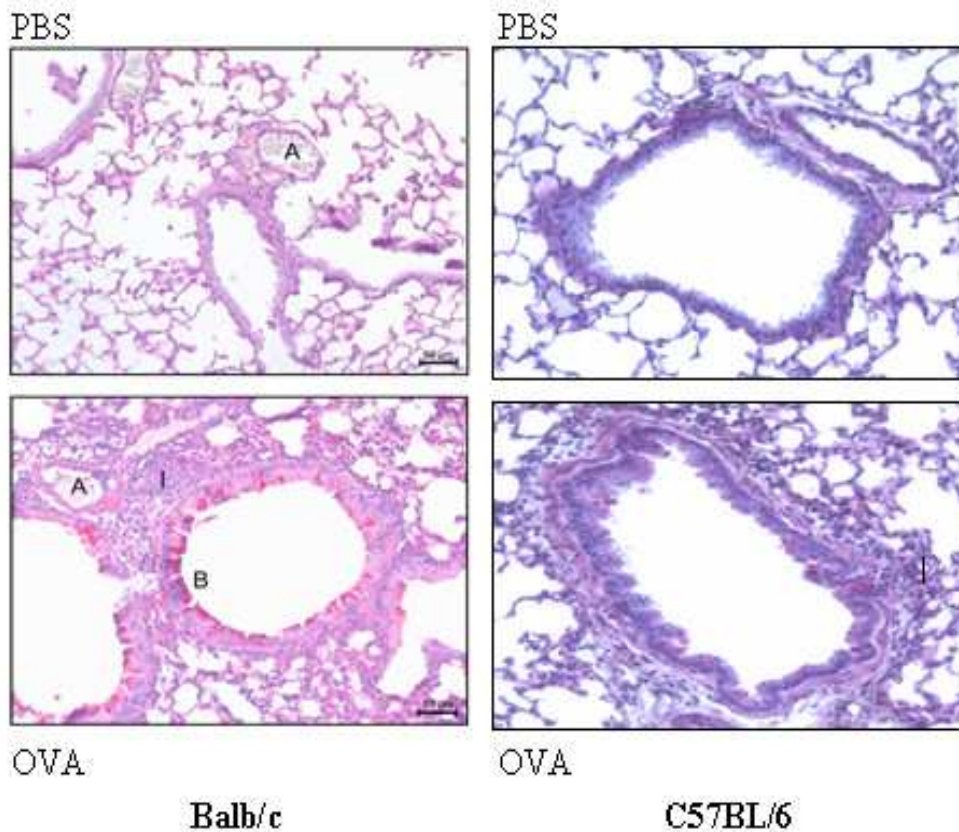


Abb. 8: Allergische Atemwegsentzündung nach systemischer OVA-Sensibilisierung und -Provokation. Ein repräsentativer Blick auf vier histologische Lungenschnitte gefärbt mit der PAS-Färbung. A = Blutgefäß, B = Becherzelle, I = peribronchiale Inflammation. Die Abbildungen der PAS-Färbungen für den Balb/c-Mausstamm wurde zusammen mit Herrn Christoph Heidt angefertigt.

3.3 Lcn2 Defizienz und verstärkt allergische Atemwegsentzündung und Apoptose

Ein wesentliches Ziel war es, die funktionelle Signifikanz von Lcn2 abschätzen zu können. Hierzu wurden zwei Methoden angewendet, diese experimentell plausibel zu demonstrieren. Zum einen wurde dies in Folge von Lcn2-Abwesenheit und zum anderen durch Lcn2-Blockade im Kontext von allergeninduzierter Atemwegsentzündung evaluiert, indem genetisch defiziente Mäuse für Lcn2 Expression (Flo et al., 2004) oder Lcn2-spezifische Antikörper verwendet wurden.

Abbildung 9 zeigt einen direkten Vergleich von Lcn2 Knock-Out (KO) Mäusen mit Wildtyp Nachkommen (WT), die deutlich signifikant höhere Level von Atemwegsentzündung in Lcn2 (KO) Mäusen erkennen lassen, hauptsächlich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten (Abb. 9A). Dahingegen bleiben OVA-spezifische und Gesamt-IgE Levels ähnlich in beiden Mausstämmen (Abb. 9B und 9C). Ähnliche Ergebnisse verstärkter Atemwegsentzündung wurden bei Verabreichung von anti-Lcn2 Antikörpern in sensibilisierten WT-Mäusen vor Allergenprovokation erhalten (Abb. 10) Die Ergebnisse in den KO-Mäusen resultieren nicht aufgrund von Defekten bei der Entwicklung der Lunge oder des Immunsystems. Um die funktionelle Auswirkung der Lcn2-Defizienz zu evaluieren, wurde der Atemwegswiderstand nach Metacholinprovokation im *Ex vivo*-Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (Abb. 5) von Wt- und KO-Mäusen gemessen. Hierbei konnte man einen signifikant erhöhten Atemwegswiderstand in OVA sensibilisierten und provozierten KO-Mäusen im direkten Vergleich zu den korrespondierenden WT-Mäusen beobachten (Abb. 9D).

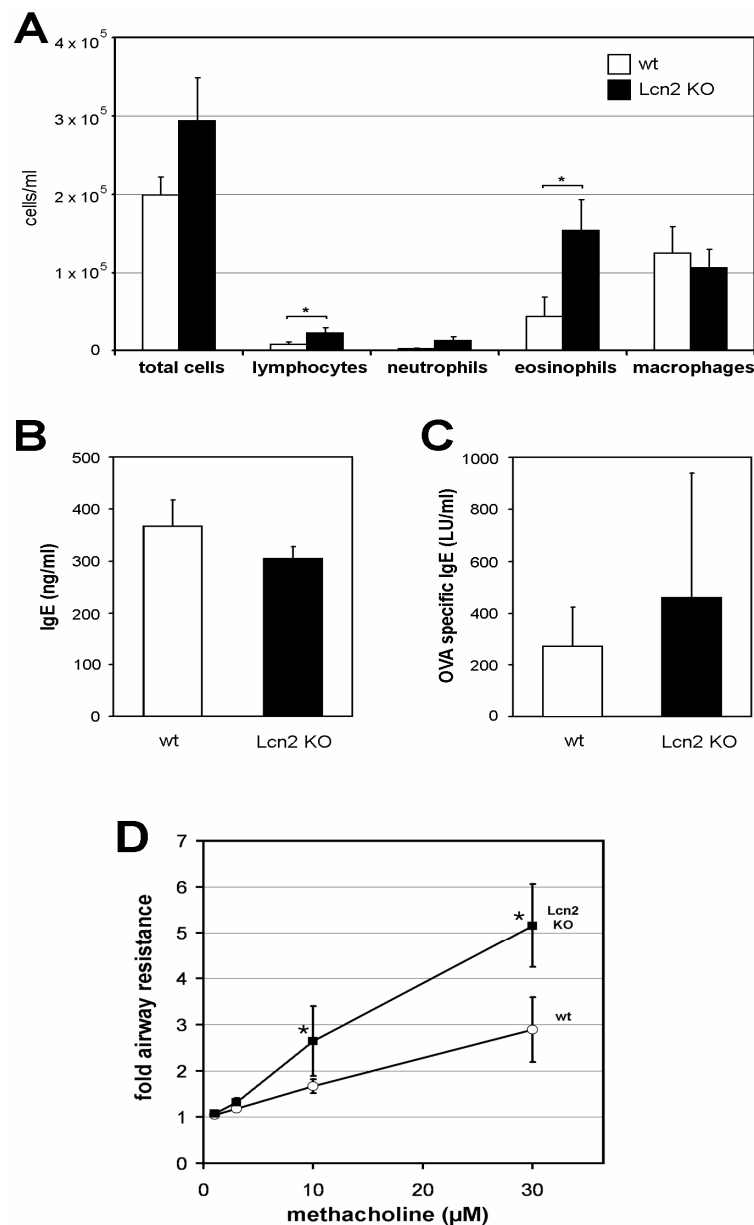


Abb. 9: Lcn2-Defizienz steigert den asthmatischen Phänotyp im Mausmodell für akute Atemwegsentzündung. Verglichen mit WT-Nachkommen (wt, n=6) zeigen Lcn2 KO-Mäuse (n=6) eine erhöhte Atemwegsentzündung aufgrund eines erhöhten Zustroms eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten nach Sensibilisierung und Provokation mit Allergen (A). Gesamt-IgE und OVA-spezifisches IgE unterscheiden sich in beiden Stämmen jedoch nicht (B, C). Ein direkter Vergleich des Atemwegswiderstandes in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung von Lcn2 KO- und WT-Mäusen (je n= 6) nach Sensibilisierung und Provokation mit Allergen zeigte einen signifikant höheren Widerstand in Lcn2 KO-Mäusen als in den korrespondierenden WT-Kontrollen (D). *Signifikanz $P < 0.05$.

Abbildung 10 zeigt einen direkten Vergleich von OVA sensibilisierten Wildtyp-Mäusen mit und ohne Verabreichung von spezifischen anti-Lcn2 Antikörpern vor Allergenprovokation. Zum Schein mit PBS behandelte Mäuse wurden als Kontrolltiere mitgeführt.

OVA sensibilisierte Mäuse, die vor der Atemwegsprovokation einen spezifischen anti-Lcn2 Antikörper verabreicht bekommen haben, zeigten deutliche aber nicht signifikant höhere Level von Atemwegsentzündung, hauptsächlich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten.

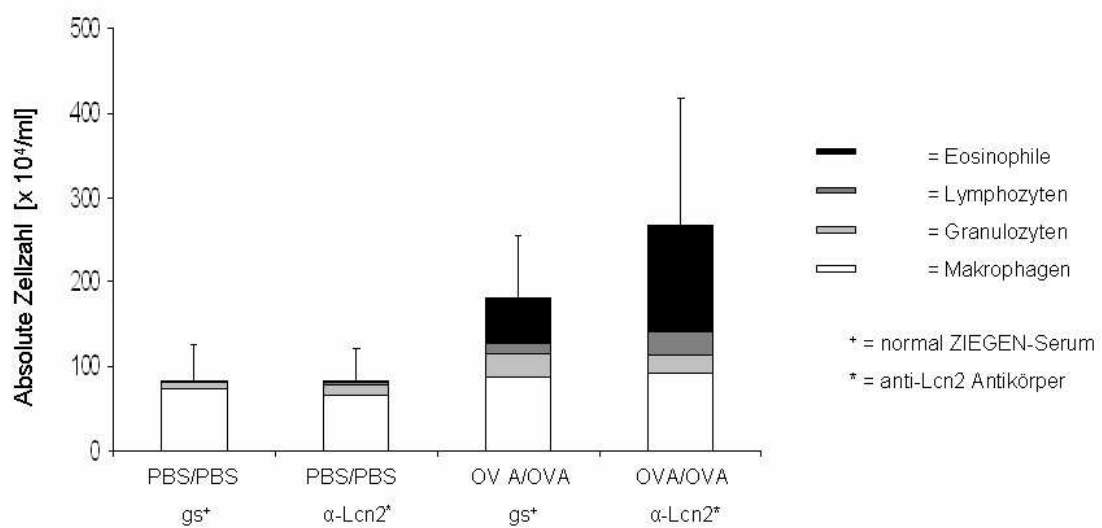
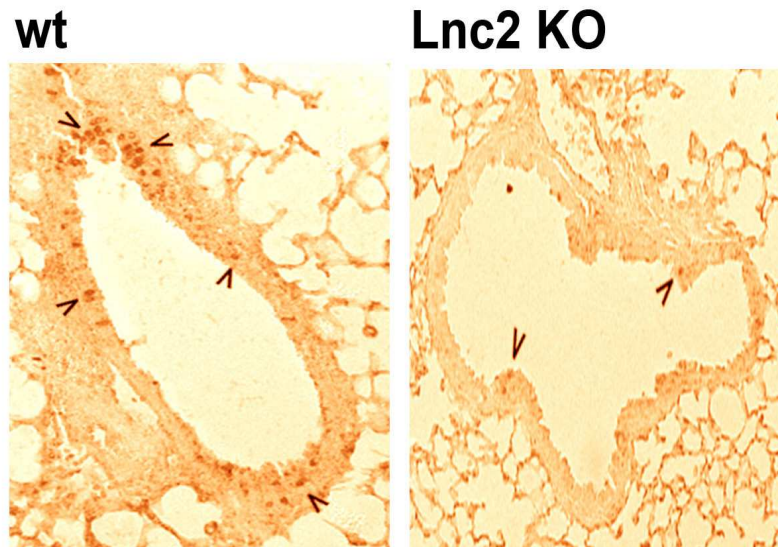
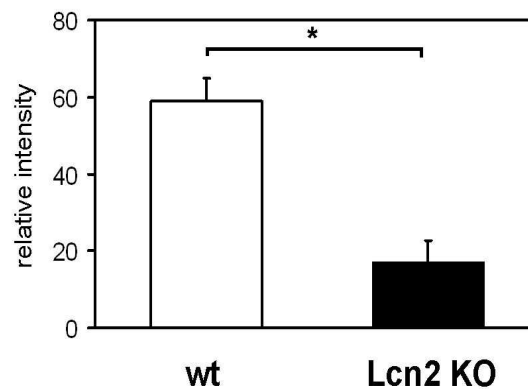


Abb. 10: Effekte der Lcn2 Blockade mit einem Lcn2-spezifischen Antikörper

Um die funktionelle Signifikanz von Lcn2 abschätzen zu können, wurde dies in Folge von Lcn2-Blockade im Kontext von allergeninduzierter Atemwegsentzündung evaluiert, indem Lcn2-spezifische Antikörper verwendet wurden.

Aufgrund von Forschungsergebnissen, das Lcn2 unter bestimmten Umständen Apoptose induziert (Devireddy et al., 2001) und der Tatsache das Apoptose eine immanente Rolle bei der Atemwegsentzündung darstellt (Kuwano et al., 2005; Simon et al., 1995), wurde als nächstes der die Apoptose induzierende Wirkung von Lcn2 im Mausmodell untersucht. Dafür wurde Lungengewebe aus allergen-sensibilisierten und provozierten Lcn2 KO-Mäusen mit Lungengewebe entsprechend gleich behandelter WT-Tiere mittels der „terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling“ (TUNEL)-Färbung verglichen (2.4). TUNEL⁺ positive Zellen treten in einer signifikant höheren Anzahl in WT-Mäusen auf als in Lcn2 KO-Mäusen und sind lokalisiert in Epithelen und peri-epithelen Regionen (Abb. 11A).

Eine quantitative Morphometrie wurde mit Hilfe der Software Image J, Version 4.0 (National Institutes of Health (NIH), Federal agency for conducting and supporting medical research, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt. Ein Mangel an Lcn2 (KO) führt zu einer in etwa 3-fachen Reduktion von TUNEL⁺ positiven Zellen im Vergleich zu WT-Mäusen (Abb. 11B).

A**B****Abb.11:**

Lcn2 Defizienz reduziert pulmonale Apoptose *in vivo* und Lcn2 induziert Apoptose in murinen pulmonalen Epithezellen *in vitro*. Im akuten Modell der Atemwegsentzündung, treten TUNEL⁺ positive Zellen in einer signifikant höheren Anzahl in WT-Mäusen (n=4) auf als in Lcn2 KO-Mäusen (n=5) (A). Statistische Analysen der TUNEL⁺ positiven Regionen, zeigen, dass ein Mangel an Lcn2 (Lcn2 KO) protektiv wirkt gegen Apoptose verglichen mit den WT-Mäusen (B). * Signifikanz $p < 0.05$

3.4 Lcn2 induziert Apoptose in murinen Epithelzellen

Als konsekutiver Schritt wurde untersucht, ob dieser pro-apoptotische Effekt *in vivo* aufgrund einer pro-apoptotischen Aktivität von Lcn2 auf murinen pulmonalen Epithelzellen zurückzuführen ist. Dazu wurden LA-4 Zellen mit rekombinantem Lcn2 für 24 h inkubiert und anschließend mittels TUNEL-Färbung (2.11.3) auf DNA-Fragmentierung, begleitet durch Apoptose, analysiert. Der Vergleich von Lcn2-inkubierten mit nichtinkubierten Kontroll LA-4 Zellen zeigte eine signifikante, meistens 2-fach erhöhte Apoptoserate (Abb. 12).

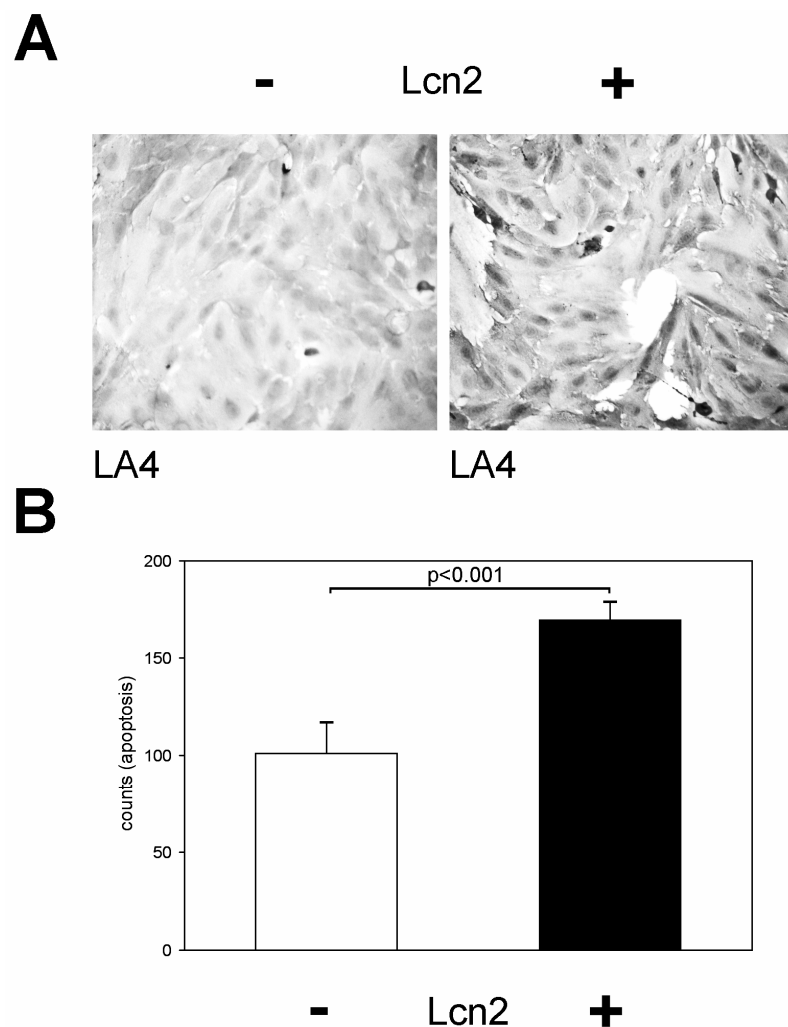


Abb. 12

Lcn2 induziert Apoptose in murinen Epithelzellen. Inkubation von LA-4 Zellen mit rekombinantem Lcn2 für 24h und Vergleiche mit TUNEL-Färbungen un behandelter Kontrollen (**A**). Statistische Analysen TUNEL⁺ positiver Regionen zeigten, dass eine Inkubation mit Lcn2 signifikant Apoptose in LA-4 Zellen induziert (**B**).

3.5 Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine reguliert

Es sollte untersucht werden in wie fern Lcn2 aufgrund der allergischer Atemwegsentzündung induziert wird. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde die Lcn2 mRNA Expression nach 2 und 4 h nach Stimulierung von LA-4 Zellen mit verschiedenen Zytokinen und Zytokinkonzentrationen gemessen (Abb. 13). Es wurde eine dosisabhängige signifikante Hochregulierung von Lcn2 in LA-4 Zellen durch IL-1 β , mit 1, 10 und 100 ng/ml beobachtet, wobei die stärkste Hochregulierung mit 100 ng/ml und nach 4 h der Stimulierung erreicht wurde (Abb. 13A). Äquivalent induzierten TNF- α mit 2, 20 und 200 ng/ml (Abb. 13B), IL-4 mit 1, 10 und 100 ng/ml (Abb. 13C) und IL-12 mit 1, 10 und 100 ng/ml (Abb. 13D) eine signifikante Lcn2 Transkription. In Anbetracht der Tatsache, dass kommerziell erhältliches OVA mit LPS kontaminiert ist (Eisenbarth et al., 2002), war es interessant zu untersuchen, ob eine Induktion von Lcn2 in Epithelzellen eine mögliche Folge von LPS war. Die Stimulierung von LA-4 Zellen mit einer LPS-Konzentration von 1, 10 und 100 ng/ml zeigte eine signifikante, dosisabhängige Hochregulation von Lcn2 nach 2 und 4 h (Abb. 13E).

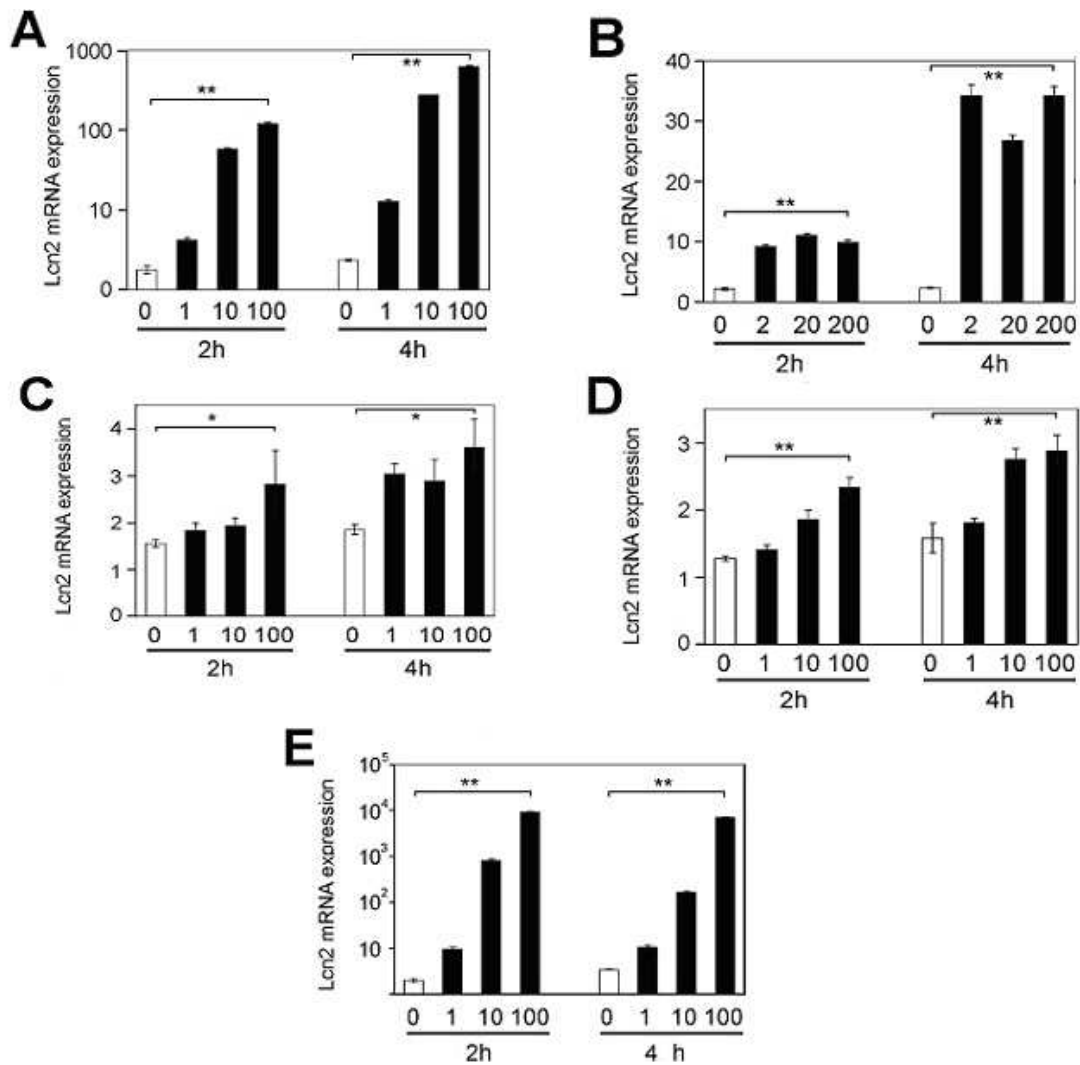


Abb. 13:

Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine reguliert. LA-4 Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen (IL-1 β , IL-4, IL-12, TNF- α) und Konzentrationen (0, 1, 10, 100 und 100 ng/ml bzw. TNF- α mit 0, 2, 20 und 200 ng/ml) stimuliert oder mit LPS (0, 1, 10, 100 ng/ml). Die Lcn2 mRNA Expression wurde durch qPCR zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Man beobachtete eine dosisabhängige Hochregulation von Lcn2 durch IL-1 β (A), eine starke Induktion von Lcn2 durch TNF- α (B) und einen geringen Anstieg von Lcn2 durch das Th2 Zytokin IL-4 (C) und das Th1 Zytokin IL-12 (D). Die Stimulierung mit LPS induzierte eine signifikante, dosisabhängige Hochregulation von Lcn2 (E). * Signifikanz $p < 0.05$ und ** Signifikanz $p < 0.001$.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung gemeinsamer Merkmale von Genen der Atemwegsentzündung mittels Microarrays –und quantitativer Realtime-PCR (qPCR)

4.1.1 Microarrays

Die Grundlage der Generierung von Expressionsprofilen und molekularen Signaturen aus den aus Microarray-Experimenten gewonnenen Daten basiert auf der Annahme, dass sich anhand der Signalstärke der auf dem Assay stattfindenden Hybridisierung des Targets mit der entsprechenden Sonde, Rückschlüsse auf die relative Menge, d.h. auf die relative Expressionsstärke des Targets schließen lassen. Um diese Grundlage zu gewährleisten müssen alle einzelnen Schritte des Experiments einem linearen Verlauf folgen, dadurch entsteht eine Vergleichbarkeit der gefundenen Expressionslevel. Diese ist gegeben, da es sich bei der *in vitro*-Transkription mit den biotinierten dNTPs zur Markierung der cRNA um eine lineare Amplifikation handelt (Van Gelder *et al.*, 1990), und im Hinblick auf die Detektion verlaufen die Menge der fluoreszenzmarkierten Proben und der gemessenen Signalintensität ebenfalls linear (Freeman *et al.*, 2000). Um aus den tausenden von einzelnen Signalen aller Proben Expressionsprofile der verschiedenen Gene zu bilden, müssen diese Signale normalisiert werden, dadurch werden Unterschiede in der Markierungs- und Detektionseffizienz, sowie in der Quantität der Ausgangs-RNA ausgeglichen. Dieses erfolgt durch verschiedene Normalisierungsverfahren. In dieser Arbeit wurde die von Affymetrix hergestellte Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) Software verwendet. Mit Hilfe der Verwendung der Microarray Technologie wurden im murinen Asthma-Mausmodell Genexpressionsprofile in zwei verschiedenen Mausstämmen erstellt. Es konnten verschiedene Gene für inflammatorische Prozesse identifiziert werden wie z.B. glutathione peroxidase 2 (GPX2), Arginase (Arg1), serum amyloid A 3 (Saa3), matrix metalloproteinase 12 (Mmp12), darunter auch das Lipocalin2 (Lcn2). Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Microarray Technologie ein wertvolles Werkzeug zur Genexpressionsanalyse von komplexen Krankheiten wie Asthma darstellt. Aus den Analysen können viele neue Kandidaten Gene extrahiert werden, die als Ansatz für neue Therapien dienen könnten, darunter auch das Lcn2 (Tab. 3).

4.1.2 Etablierung der quantitativen Realtime-PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) ist eine Weiterentwicklung der von K.B. Mullis entwickelten Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1987). Sie stellt eine schnelle und sensitive Methode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten dar und erlaubt die Detektion sehr geringer DNA-Mengen. Die Methode wird zu Genexpressionsstudien, im Bereich der Sequenzanalyse und bei der Genklonierung herangezogen. Die qPCR liefert Aussagen zur Ausgangs-DNA-Menge, während die Endpunkt-PCR lediglich eine qualitative Analyse der Produkte ermöglicht. 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).

Mit der quantitativen Realtime PCR konnten die Ergebnisse aus den Microarray-Analysen für das akute Modell bestätigt werden. Die Microarray-Analysen zeigten eine 2,7-fache erhöhte Lcn2 mRNA Expression in BALB/c und eine 3,3-fache erhöhte Lcn2 mRNA Expression in C57BL/6 Mäusen im Vergleich OVA sensibilisierter und provozierte Mäuse zu mit PBS behandelten Mäusen im akuten Mausmodell (Abb. 7A). Neben der akuten Reaktion konnten auch mit der qPCR die im Langzeit chronischen Modell, bei der 12 Wochen lang eine wiederholte Allergenexposition verabreicht wurde, eine erhöhte Lcn2-Expression bestätigt werden (Abb. 7B).

Für die Expressionsanalyse wurde die totale RNA mittels reverser Transkription (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben und als Ausgangsmaterial 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 an der mRNA von sogenannten Referenzgenen (Housekeeping gene, in dieser Arbeit: β -Actin) normalisiert und miteinander in Beziehung gebracht. Referenzgene werden in allen Zellen und Geweben und zu jeder Zeit im gleichen Ausmaß (konstitutiv) exprimiert und wurden deshalb als Referenz genutzt.

4.2 Parallelen des murinen Lcn2 zum homologen humanen NGAL

Die Lipocaline gehören zu einer diversen Gruppe funktioneller Proteine, die an negativ geladene Eisen-Siderophore binden (Akerstrom et al., 2000) und mit Zelloberflächenrezeptoren interagieren (Flower, 2000). Lipocaline haben eine Transportfunktion, von denen einige enzymatische Eigenschaften aufweisen. Sie transportieren kleine Moleküle zu spezifischen Zellen und sind dadurch vielfältig involviert wie z.B. im Retinoltransport, Ausbildung des Geruchsvermögens, Pheromontransport, der Prostaglandinsynthese, Steuerung des Zellwachstums- und Metabolismus und Regulation der Immunantwort. Das 25 kDa große humane neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) wurde ursprünglich als Bestandteil neutrophiler Granula identifiziert und wird ebenfalls in Epithelzellen als Folge von Entzündungsanzeichen exprimiert (Kjeldsen et al.,

2000). Das zu NGAL hoch homologe, murine Lcn2 (auch als 24p3, superinducible protein (Sip24), oder uterocalin bezeichnet), gehört zur Familie der Lipocaline, die sich durch ihre gemeinsamen tertiären Strukturen auszeichnen (Flower et al., 1996). Es wurde als ein Protein identifiziert, das in Folge verschiedener Proliferationssignale induziert wird und stark in Epithelzellen und Gebärmutterflüssigkeit exprimiert wird. Lcn2 wurde als ein Akut-Phase-Protein in der Leber beschrieben (Liu et al., 1997) und es wurde gezeigt, dass es hochreguliert wird in Makrophagen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) (Meheus et al., 1993) und in der Lunge von LPS-behandelten Mäusen (Sunil et al., 2007). Weitere Studien haben deutlich gemacht, dass die Hypothese, dass die Expression von Lcn2 und die Regulierung durch proinflammatorische Zytokine in der Lunge, das ein prädestiniertes Gewebe für den Kontakt mit Mikroorganismen darstellt (Cowland et al., 2003), vermutlich eine Rolle spielt bei der antimikrobiellen Abwehr und der Regulierung von Entzündungen und möglicherweise beim Zellwachstum in den Atemwegen (Kjeldsen et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass humanes NGAL in der Trachea und Lunge exprimiert wurde unter nicht-entzündlichen Bedingungen (Friedl et al., 1999). NGAL-Werte im induzierten Sputum waren erhöht bei Patienten mit der chronisch-obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) und Asthma-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Keatings et al., 1997), wobei es offenbar mit bronchialer Hyperreaktivität (BHR) korreliert. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Apoptose und der Eisenkonzentration in der Zelle erstellt (Richardson, 2005) und in Verbindung gebracht mit Lcn2 in Apoptose (Devireddy et al., 2001). Es ist bekannt, dass Apoptose in blutbildenden Zellen durch Entzug von Interleukin-3 (IL-3) und Sekretion von Lcn2 ausgelöst werden kann (Devireddy et al., 2001). Durch Devireddy et al. wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem murines 24p3 (Lcn2) Eisen an die Zelle abgibt und so Apoptose (Abb. 14A) auslöst (Devireddy et al. 2005). Man nahm an, dass diese Effekte von Lcn2 davon abhängig waren ob dieses Protein Eisen enthielt oder nicht. In der gebundenen Holo-Form liegt 24p3 im Eisenkomplex als Enterobaktin vor, während die Apo-Form diesen Eisenkomplex nicht enthält. Interessanterweise wurde berichtet, dass der Rezeptor 24p3R für 24p3 an der Apo- und Holo-Form bindet und die Internalisierung durch Endozytose aktiviert (Abb. 14). Der Rezeptor 24p3R vermittelt der Holo-Form von 24p3 die Fähigkeit, Eisen an die Zelle abzugeben und dadurch Apoptose zu verhindern (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu führt die Internalisierung der Apo-Form von 24p3 durch Zellen zu einem Eisenabfluß, das zu Apoptose und Zelltod führt, was durch das proapoptische Protein Bim (Abb. 14B) vermittelt wird. Bislang ist der exakte Mechanismus unklar, ob die an den Rezeptor gebundene 24p3 Apo- und Holo-Form des 24p3 den gleichen intrazellulären Signalweg durchlaufen. Es sind daher weitere Studien hierzu notwendig.

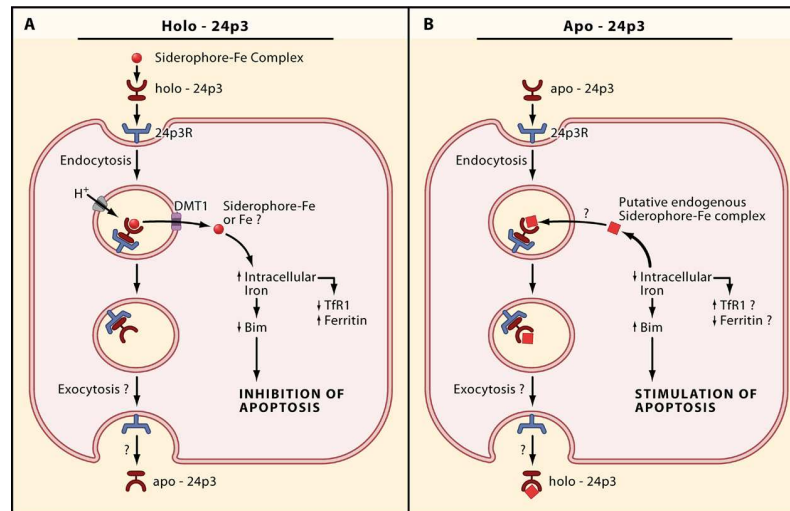


Abb. 14: Mögliche Effekte der Holo- und Apo-Form von 24p3 im Eisenmetabolismus und Apoptose (modifiziert nach Richardson et al., 2005)

In der Literatur wurde gezeigt, dass das zu Lcn2 homologe humane NGAL sehr stark in der humanen Trachea und in der Lunge aber auch im Uterus, Prostata und Colon exprimiert wird, Gewebe also, die entweder oft mit Mikroorganismen exponiert sind oder Drüsen, die Sekrete in Gewebe abgeben (Cowland and Borregard, 1997). Das könnte andeuten, dass NGAL eine Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen spielt und das hat zu der Hypothese geführt, dass NGAL als Vermittler bei Entzündungsantworten fungiert (Cowland and Borregard, 1997). Interessanter Weise wurde NGAL in einer Vielzahl normaler und pathologischer humaner Gewebe gefunden. Ein zellspezifisches Expressionsmuster von NGAL wurde im Bronchus, Magen, Duodenum, Pankreas, Prostata und Thymus gezeigt (Friedl et al., 1998). Krebsartiges, malignes, humanes Gewebe zeigte unterschiedliche Expressionen des NGAL-Proteins. Hohe NGAL-Konzentrationen konnten im Adenokarzinom der Lunge, Colon und Pankreas gefunden werden. Die Bedeutung dieser Beobachtungen scheinen jedoch noch unklar zu sein (Friedl et al., 1998). Da die Mitwirkung von Lcn2 an Funktionsstörungen wie bei allergischen Atemwegserkrankungen bisher immer noch ungelöst aber wahrscheinlich ist, wurde die funktionelle Rolle von Lnc2 in allergischen Atemwegserkrankungen weiterhin untersucht.

Es konnten in dieser vorliegenden Arbeit Daten gezeigt werden, die erstmals wissenschaftliche Hinweise für eine ausschlaggebende Rolle des Lnc2 bei der Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung liefern. Die Ergebnisse zeigen, dass die Entzündungsanzeichen im Mausmodell für allergische Atemwegserkrankungen assoziiert sind mit einer signifikanten Hochregulierung von Lcn2 auf mRNA- und Proteinebene in murinem Lungengewebe und BALF. Entscheidend hierbei ist, dass diese Hochregulierung nicht nur im Frühstadium der akuten Atemwegsentzündung

dung (im akuten Modell) gefunden wurde, sondern auch nach chronischer Allergenexposition sensibilisierter und provozierter Tiere (im chronischen Modell). Das deutet darauf hin, dass Lcn2 eine Rolle spielen könnte im Zusammenhang von nachhaltigen Veränderungen, die verknüpft sind mit chronischem Asthma bronchiale wie beispielsweise der Wiederherstellung des Atemwegsgewebes (Repair) oder des Umbaus (Remodeling).

4.3 Lcn2 wird in murinen Epithelzellen durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und LPS reguliert

Um nachzuweisen, dass Lcn2 aufgrund allergischer Atemwegsentzündung induziert wird, wurde die Lcn2 mRNA Expression nach 2 und 4 h nach Stimulierung von LA-4 Zellen mit verschiedenen Zytokinen und Zytokinkonzentrationen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Lcn2 in pulmonalen Epithelzellen als Antwort auf verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und LPS produziert wird und pro-apoptotische Effekte in pulmonalen Zellen *in vitro* (Abb. 13) und *in vivo* bewirkt (Abb. 12). Als Schlussfolgerung deuten diese Daten auf einen protektiven Effekt von Lcn2 bei der Entstehung von Atemwegshyperreaktivität und Atemwegsentzündung hin. Die Ergebnisse der erhöhten Lcn2 Produktion durch Epithelzellen nach der Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und IL-4 korrespondiert nicht ganz mit früheren Publikationen von humanen Zellen (Cowland et al., 2004). Das könnte am besten durch Unterschiede in der Versuchsdurchführung erklärt werden oder der verwendeten Spezies (Klausen et al., 2005). Insbesondere eine IL-4-abhängige Hochregulierung von Lcn2 mRNA ist von Interesse und rechtfertigt weitere Untersuchungen. Aufgrund der entscheidenden Rolle dieses Zytokins in der frühen Phase der Allergen-induzierten Atemwegsentzündung (Wills-Karp et al., 1996) weisen die gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass das pro-inflammatorische Milieu, welches man in der frühen Phase der Atemwegsentzündung vorfindet- aber ebenso die erhöhte Th2 Umgebung, gesteuert durch IL-4, ausschlaggebend für die Hochregulierung von Lcn2 in diesem hier verwendeten Mausmodell gewesen sein könnte, welches durch eine Art inhibitorischer Feedback-Mechanismen für die Selbstlimitierung von Allergen induzierter Atemwegsentzündung reflektiert wird.

Standard OVA-Präparationen sind erfahrungsgemäß „kontaminiert“ mit geringen Spuren von LPS, die möglicherweise für die Induktion einer allergischen Th2 Antwort (Eisenbarth et al., 2002) notwendig gewesen sein konnten. Lcn2 könnte auf die Induktion von LPS auf zweierlei Wege reagiert haben. Entweder auf direktem Weg über den „Toll Like Receptor 4“ (TLR4), wie in anderen *in vivo* Studien vermutet wird (Flo et al., 2002; Sunil et al., 2007; Nelson et al., 2005) und oder indirekt über LPS-induzierte, pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF-alpha

oder eben IL-4, wie in den hier gezeigten *in vitro* Daten suggeriert wurde. Eine Übersicht der Lcn2 regulierenden Zytokine zeigt Abb. 15.

Targetvalidierung: Zytokineffekte *in vitro*

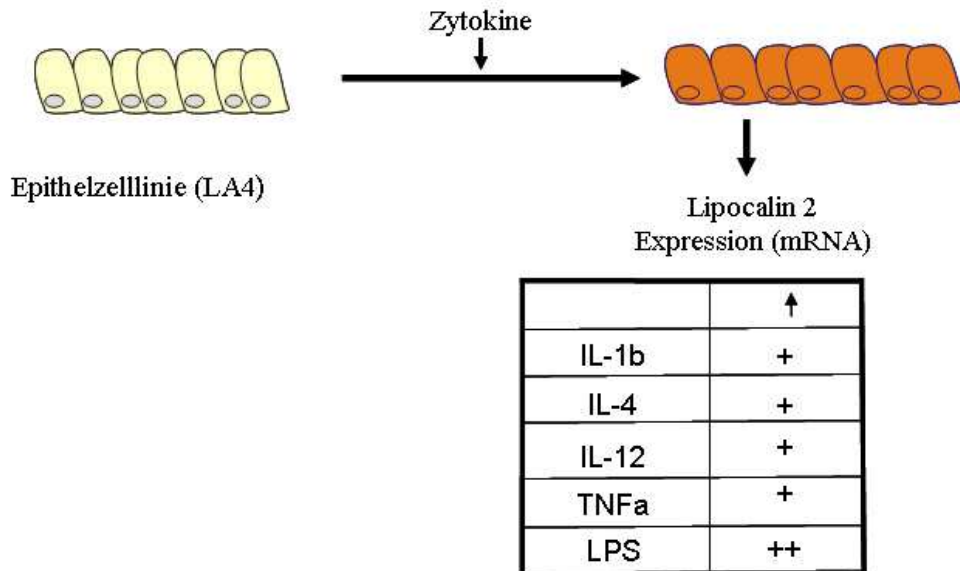


Abb. 15: Zytokineffekte auf Lcn2 *in vitro*

Ein „gefährliches herantasten“ über eine Lcn2 Induktion nach Kontakt mit bakteriellen Komponenten wie LPS könnte eine angeborene Immunantwort hervorrufen, die notwendig wäre für das Auslösen einer darauf folgenden erworbenen Immunantwort gegen eindringende Pathogene (Flo et al., 2004; Nelson et al., 2005). Wie hier und durch andere Untersuchungen gezeigt wurde, kann Lcn2 ebenfalls eine protektive Rolle gegen die schädliche Wirkung der (adaptiven) Immunantwort einnehmen, was in verschiedenen inflammatorischen Prozessen beobachtet werden konnte (Zhang et al., 2008) wie bei der allergischen Atemwegserkrankung. In diesem Kontext verleitet es zu der Spekulation, dass der Schutz vor allergischer Atemwegsentzündung durch LPS, wie in experimentellen Modellen der Atemwegserkrankung beobachtet wurde (Gerhold et al., 2002), letztendlich durch eine LPS gesteuerte Hochregulierung von Lcn2, erhöht wurde. Zu diesem Zweck könnte die Induktion von Lcn2 über das Th2 Zytokin IL-4, wie oben demonstriert wurde (Abb. 13) oder IL-9 (Orabona et al., 2001) eine wichtige negative Rückkopplungsschleife festsetzen, in der eine initiale Lcn2 Induktion durch LPS oder pro-inflammatorische Zytokine

eine fortwährende Hochregulierung von Lcn2 durch permanente Th2 Inflammation zur Folge hat, um sich gegen eine übermäßige Entzündung zu schützen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass einige Zytokine und inflammatorische Marker die Produktion von Lcn2 induzieren. Es ist nahe liegend, dass die Expression von Lcn2 kritisch davon abhängt, in welchem mikrobiologischen Milieu dieser Prozess abläuft.

4.4 Apoptose als ein möglicher Wirkmechanismus des Lcn2

Es wird postuliert, dass eine Reduzierung der Apoptose eine wichtige Rolle spielt bei allergischen Erkrankungen (Kuwano et al., 2005; Simon et al., 1995). Unsere Ergebnisse identifizierten pro-apoptotische Effekte von Lcn2 auf Lungenzellen *in vitro* und innerhalb der Atemwege *in vivo* und stützen die Ergebnisse von Devireddy et al., die zuerst Lcn2's pro-apoptotische Effekte identifizierten (Devireddy et al., 2001). Es wird ein Zusammenhang beschrieben zwischen der von Lcn2 vermittelten Internalisierung von Eisen und Apoptose (Devireddy et al., 2005). Als eine Strategie zum Schutz gegen Infektionen fangen Säugerzellen Eisen ab, welches essentiell für das Bakterienwachstum ist. Lcn2 bindet an Eisen durch Ligation an ein mycobakterielles Siderophore wie z.B. das Enterobaktin (Goetz et al., 2002; Flo et al., 2004; Fluckinger et al., 2004; Holmes et al., 2005). Lnc2 reagiert während dieser akuten Phase der immanenten Immunantwort (Flo et al., 2004) und verstärkt die Abwehr durch Transferrin und Lactoferrin, die nicht gebundenes Eisen binden. Durch Devireddy et al., (2005) und Richardson, (2005) wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem murines Lcn2 Eisen an die Zelle abgibt und so Apoptose (Abb. 14) induziert.

Man nimmt an, dass diese Effekte von Lcn2 davon abhängig sind ob dieses Protein Eisen enthält oder nicht. In der gebundenen Holo-Form liegt Lcn2 im Eisenkomplex als Enterobaktin vor und Eisen kann an die Zelle abgegeben werden ,wenn der Eisenkomplex am Lnc2-Rezeptor bindet und so Apoptose verhindert, während die Apo-Form diesen Eisenkomplex nicht enthält und zu einem Eisenabfluss aus der Zelle und dadurch zu Apoptose und Zelltod führt. Bislang ist der exakte Mechanismus unklar, ob die an den Lcn2-Rezeptor gebundene Lcn2 Apo-und Holo-Form des Lcn2 den gleichen intrazellulären Signalweg durchlaufen. Es sind daher weitere Studien hierzu notwendig. Es wäre aber denkbar, dass Lcn2 in der Lunge pro-apoptotisch wirkt, wenn es in der Lunge nicht an Eisenverbindungen gebunden würde, was beim allergischen Asthma bronchiale der Fall ist.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse aus den Experimenten mit Lcn2-KO-Mäusen im Vergleich zum WT und der Blockade des Proteins durch Verabreichung von Lcn2-spezifischen An-

tikörpern erhalten Ergebnisse, dass ein Lcn2-Mangel zu einer erhöhten allergischen Atemwegsentzündung führen könnte, unterstützen diese Hypothese.

4.5 Lcn2 Defizienz reduziert pulmonale Apoptose *in vivo*

Ein wesentliches Ziel war es, die funktionelle Signifikanz von Lcn2 abschätzen zu können. Hierzu wurden zwei Methoden angewendet, diese experimentell plausibel zu demonstrieren. Zum einen wurde dies in Folge von Lcn2-Abwesenheit oder zum anderen durch Lcn2-Blockade im Kontext von allergeninduzierter Atemwegsentzündung evaluiert, indem genetisch defiziente Mäuse für Lcn2 Expression oder Lcn2-spezifische Antikörper verwendet wurden.

Lungengewebe aus allergen-sensibilisierten und provozierten Lcn2 KO-Mäusen mit Lungengewebe entsprechend gleich behandelter WT-Tiere, die mittels der TUNEL-Färbung verglichen wurden, zeigten TUNEL⁺ positive Zellen in einer signifikant höheren Anzahl in WT-Mäusen auf als in Lcn2 KO-Mäusen. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussagen in der Literatur, dass Lcn2 Apoptose induziert (Devireddy et al., 2001), ein Mechanismus mit einer immanenten Rolle bei der Atemwegsentzündung (Kuwano et al., 2005; Simon et al., 1995).

Im direkten Vergleich von Lcn2 Knock-Out (KO) Mäusen mit Wildtyp Nachkommen (WT) war der Atemwegswiderstand signifikant erhöht. Deutlich signifikant höhere Level der Atemwegsentzündung in Lcn2 (KO) Mäusen konnte hauptsächlich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse verstärkter Atemwegsentzündung wurden bei Verabreichung von anti-Lcn2 Antikörpern in sensibilisierten WT-Mäusen vor Allergenprovokation erhalten. Diese beiden Methoden konnten erfolgreich zum Nachweis einer eventuellen protektiven Rolle des Lcn2 bei einer Atemwegsentzündung eingesetzt werden. Allerdings handelt es sich hier um zwei indirekte Nachweismethoden. Der „Goldstandard“ wäre, das Protein Lcn2 selbst *in vivo* zu verabreichen, um einen direkten Nachweis für eine protektive Rolle des Lcn2 zeigen zu können. Man würde erwarten, dass in einem solchen Versuch die Atemwegsentzündung vermindert werden sollte, da Lcn2 als ein Akut-Phase-Protein beschrieben wurde (Goetz et al., 2002). Dieser Versuch konnte aufgrund mangelnder Proteinmengen von Lcn2 nicht durchgeführt werden.

4.6 Lcn2 induziert Apoptose in murinen pulmonalen Epithelzellen *in vitro*.

Als konsekutiver Schritt wurde untersucht, ob der pro-apoptotische Effekt *in vivo* aufgrund einer pro-apoptotischen Aktivität von Lcn2 auf murinen pulmonalen Epithelzellen zurückzuführen ist. Dazu wurden LA-4 Zellen mit rekombinantem Lcn2 inkubiert und mittels TUNEL-Färbung auf

DNA-Fragmentierung als Folge der Apoptose, analysiert. Der Vergleich von Lcn2-inkubierten mit nicht inkubierten Kontroll LA-4 Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Apoptoserate, was unterstreicht, dass Lcn2 eine direkte pro-apoptotische Wirkung auf Epithelzellen bewirkte; gleichwohl dieser Effekt nicht auf Epithelzellen begrenzt werden konnte, worauf die TUNEL-Färbung des Lungengewebes hindeutete. Andere entzündliche Zellen in der (Peri-) Epithellokalisierung könnten ebenso durch die pro-apoptischen Effekte von Lcn2 (Devireddy et al., 2001) beeinflusst werden. Apoptose ist ein wahrscheinlicher Mechanismus, der die Entwicklung und die Bestimmtheit von Atemwegsentzündung über verursachten Zelltod der wichtigen Effektorzellen (Simon et al., 1995) reguliert. Dennoch bekräftigen diese Ergebnisse, dass Lcn2 ein weiteres Protein sein könnte, das dem angeborenen Immunsystem entspringt (Meheus et al.), jedoch zunehmend verknüpft ist mit dem Signalweg der erworbenen Immunantworten bei allergischen Atemwegserkrankungen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Lcn2 *in vitro* und *in vivo* nach Stimulierung mit LPS hochreguliert wird (Flo et al., 2004). Allerdings ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass es sich hier „nur“ um ein Mausmodell handelt und ein direkter Vergleich mit dem hoch komplexen „System“ des Menschen nicht direkt möglich sein kann. NGAL wird im Menschen auch stark bei allergischen Atemwegserkrankungen hochreguliert und dort kann LPS nicht primär eine Rolle spielen, da dass Allergen nicht immer mit LPS verunreinigt sein muss.

4.7 Alternativen zum Nachweis von Apoptose

Ein wesentlicher Schwachpunkt bei der verwendeten TUNEL-Färbung liegt darin, dass mittels dieser Methode zwar eine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden kann, was allerdings nicht zwangsläufig spezifisch für den Nachweis von Apoptose ist, denn bei Nekrosen tritt dieser Effekt ebenso auf, so dass zwangsläufig eine weitere Methode zur Anwendung kommen muss, um die Ergebnisse der TUNEL-Experimente *in vivo* und *in vitro* zu validieren. Apoptose kann in Geweben durch mehrere Methoden nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit wäre die Immunhistochemische Messung der Caspase-3 Aktivität mittels eines spezifischen anti-Caspase-3 Antikörpers (CM-1) (Stadelmann et al. 2000), um die TUNEL-Ergebnisse zu unterstützen. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Versuche aber nicht mehr durchgeführt werden.

4.8 Mögliche Ansatzpunkte für innovative Asthmatherapien

Bei Nierenschäden wurde Lcn2 erstmals als ein Marker für eine akute Verletzung beschrieben (Mishra et al., 2004). Erhöhte verabreichte Mengen von Lcn2 durch intravenöse Injektionen des Proteins verbesserten allerdings merklich eine akute ischämische Nierenverletzung (Mishra et

al., 2004). Es stellt eine hochinteressante Möglichkeit dar, dass eine ähnliche Behandlung mit Lcn2 auch zum Einsatz bei Atemwegsentzündung kommen könnte. Die Größe von Lcn2 und die Beschaffenheit des Proteins machen es zu einem primären Kandidaten für eine inhalative Behandlung, eine weitaus wünschenswertere Anwendung als eine intravenöse Injektion bei renalen Erkrankungen (Mishra et al., 2004). Man beginnt erst langsam das Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunität in allergischen Atemwegserkrankungen zu verstehen. Bei Infektionskrankheiten wurde das Zusammenspiel von angeborener und erworbener (adaptiver) Immunität für eine lange Zeit als wesentlich für das einwandfreie Funktionieren einer Schutz-Immunantwort gegen infektiöse Erreger anerkannt. Bei Krankheiten, deren Ursache ein überreaktives Immunsystem ist, wie z.B. Autoimmunerkrankungen oder atopischen Krankheiten, glaubte man, dass es allein wegen einer Störung des adaptiven Immunsystems hervorgerufen wird. Neuere Studien zeigten, dass angeborene Immunantwort-Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von atopischen Erkrankungen spielen. Während einige Studien auf eine Abhängigkeit der atopischen Krankheiten auf die Mechanismen der angeborenen Immunantwort hinweisen (Dabbagh et al., 2002; Eisenbarth et al., 2002; Taube et al., 2003), konnten andere zeigen, dass angeborene Immunitätsmechanismen die Entwicklung bestimmter Aspekte von atopischen Erkrankungen verhindern könnten, (Gerhold et al., 2002; Wohlleben et al., 2003). Diese Studien unterstreichen, dass es vermutlich die Balance zwischen protektiven, regulatorischen Mechanismen und intensiven, schädlichen Übertragungswegen ist, die durch das angeborene Immunsystem reguliert wird und über den Verlauf einer allergischen Reaktion entscheidet.

Lcn2 ist ein neuartiger Kandidat, der dazu beitragen könnte, weitere Erkenntnisse in den zugrunde liegenden Mechanismen und Wechselbeziehungen abzugrenzen, die ultimativ zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie führen bei einer der meist verbreiteten und kostspieligsten chronischen Erkrankungen in industrialisierten Ländern. Hochkomplexe Mechanismen, die umweltbedingte Mechanismen genauso einschließen wie genetische Faktoren, könnten aufgezeigt werden durch Identifizierung von Genen allgemein bekannter Signalwege, die maßgeblich für die Entstehung dieser Erkrankung sind ungeachtet des genetischen Hintergrundes dieser Krankheit. Demzufolge hat sich Lcn2, welches in zwei verschiedenen Mausstämmen ähnlich reguliert wird mit signifikant differenzierten Prädispositionslevel gegenüber allergischen Erkrankungen (Herz et al., 1998), als ein mögliches Signalgen für Atemwegsentzündung (Zimmermann et al., 2003) qualifiziert.

5. Zusammenfassung

Allergisches Asthma bronchiale (AB) ist zur häufigsten chronischen Atemwegs-Erkrankung geworden. Trotz aller Fortschritte bei der Behandlung von AB ist die Gesamt-Mortalität in den letzten Jahrzehnten leicht angestiegen wegen der starken Zunahme von Prävalenz und Inzidenz von AB. Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag leisten, das Verständnis von Krankheitsmechanismen bei der Entstehung von AB durch die funktionelle Analyse neuer Gene im Mausmodell zu erhöhen. Über 300 differenziell neue und relevante regulierte Gene konnten durch die Microarray Analyse identifiziert und eine Auswahl an Genen mittels qPCR validiert werden, die bei der Ausbildung der allergischen Atemwegsentzündung und AHR beteiligt sind. Aus den Microarray Analysen konnten 27 verschiedene Gene gefunden werden, die nach allergischer (OVA) Sensibilisierung und Provokation mindestens zweifach konsistent hochreguliert waren, und das in zwei verschiedenen, Mausstämmen (BALB/c und C57BL/6). Darunter fanden sich Gene, die mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung zu bringen sind, wie z.B. GPX2, Arg1, Saa3, Mmp12 und Lcn2. Am Beispiel von Lipocalin (Lcn2) wurde die funktionelle Relevanz der verstärkten Genexpression überprüft, diese Ergebnisse sind ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Western-blot Analysen der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF) bestätigten direkt die biologische Relevanz der erhöhten Lcn2 mRNA Expression durch Nachweis einer erhöhten Translation und Produktion des sekretierten Proteins, Lipocalin-2. In dem Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung und AHR wurde der Einfluss der Lcn2-Expression auf die Hauptmerkmale des Krankheitsbildes von AB mit Hilfe von Wildtyp- und Lcn2-defizienten Mäusen (KO) untersucht. Genetische Lcn2-Defizienz führte zu einer signifikant stärkeren Ausprägung des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell für akute Atemwegsentzündung (AI). Verglichen mit WT-Nachkommen zeigen Lcn2 KO-Mäuse einen erhöhten Zustrom eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten nach allergischer Sensibilisierung und Provokation. Dagegen war die allergische Sensibilisierung nicht betroffen, die Produktion von Gesamt- und OVA-spezifischem IgE war in WT und KO-Mäusen gleich. Ein direkter Vergleich des Atemwegswiderstandes in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge von sensibilisierten und provozierten Mäusen als funktioneller Parameter zeigte einen signifikant höheren Widerstand in Lcn2 KO-Mäusen als in den korrespondierenden WT-Kontrollen. Gleichzeitig zeigte sich in histologischen Lungenschnitten, dass die genetische Lcn2 Defizienz in den KO-Mäusen zu signifikant geringerer pulmonaler Apoptose *in vivo* führte. Im akuten Modell der AI traten TUNEL⁺ positive Zellen in einer signifikant höheren Anzahl in WT-Mäusen auf als in Lcn2 KO-Mäusen. Analysen der TUNEL⁺ positiven Regionen zeigten, dass ein Mangel an Lcn2 protektiv gegen die lokale Apoptose wirkt verglichen mit den WT-Mäusen. Auf der Suche nach dem zugrunde liegenden Mechanismus der gesteigerten Entzündungsreaktion bei Fehlen von Lcn2 zeigte sich, dass Lcn2 einen direkten pro-apoptotischen Effekt auf murine pulmonale Epithellen *in vitro* ausübte. Inkubation von LA-4 Zellen mit rekombinantem Lcn2

und Vergleiche mit TUNEL-Färbungen unbehandelter Kontrollen zeigten, dass eine Inkubation mit Lcn2 signifikant Apoptose in LA-4 Zellen induzierte. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Lcn2 in murinen Epithelzellen dosisabhängig durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und in geringem Maße durch das Th2 Zytokin IL-4 und das Th1 Zytokin IL-12 hoch reguliert wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass Lcn2 ein neuartiger Kandidat für ein Signalgen zur Identifizierung der AI sein könnte, ungeachtet des genetischen Hintergrundes dieser Krankheit.

6. Literaturverzeichnis

1. Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., et al. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8, 1024-32.
2. Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. (2003). Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 15, 627-33.
3. Akerstrom, B., Flower, D.R., and Salier, J.-P. (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 1-8.
4. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, et al. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 8(3):483-91.
5. Baecher-Allan, C., Viglietta, V., Hafler, D.A. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16, 89-98.
6. Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 6673:245-52..
7. Barnes P. J., Chung K. F., Page C. P. (1987). Platelet activating factors as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81: 919-934
8. Barnes KC., Neely JD., Duffy DL, Freidhoff LR, et al. (1996).. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* (1):41-50.
9. Beasley R, Nishima S, Pearce N, Crane J (1998).. Beta-agonist therapy and asthma mortality in Japan. *Lancet*. 351(9113):1406-7.
10. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, & Pretolani M (2003).. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 167: 1360-1368.
11. Bradley M, Azzawi M, Jacobson, et al. (1991). Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, Vol: 88,661-74.
12. Chen W., Jin W., Hardegen N., et al. (2003).. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-86.
13. Chinen, J., Shearer, W.T. (2004).. Advances in asthma, allergy and immunology series 2004: basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 114, 398-405. (23) Cho, S.H., Yao, Z., Wang, S.W., Alban, R.F., Barbers, R.G., French, S.

14. Chung, K.F., Godard, P., Adelroth, E., et al. (1999). Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. European Respiratory Society. *Eur Respir J* 13, 1198-208.
15. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. (1997). Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2). cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med.*;186(10):1737-47.
16. Cohn L, Elias J.A, Chupp GL (2004). Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 789-815.
17. Cowland JB and Borregaard N (1997). Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans. *Genomics* 45, 17-23
18. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N (2003). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* ; 171:6630-9.
19. Crimi, E., Spanevello, A, Neri, M, Ind, P.W., Rossi, G. A: and Brusasco, V. (1998) *Am J Respir Crit Care Med*, Vol: 157, 4-9..
20. Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. (2002) CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 14, 771-8.
21. Darcan Y, Petersen A, Becker WM et al. (2005). Immunoprophylaxis with DNA vaccination inhibits Th2-mediated responses and airway inflammation in mice sensitised with the major timothy grass pollen allergen Phl p 5b. *Vaccine* 23(33):4203-11.
22. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. (2002). Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 168(9):4524-30.
23. Daniels SE, Bhattacharya S, James A, et al. (1996). Genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*;383(6597):247-50.
24. Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, Green MR. (2001). Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*; 293:829-3
25. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. (2005). A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell.* ;123(7):1293-305.
26. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196:1645-51.

-
27. Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., et al. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295, 336-8.
 28. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, et al. (1989). A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol.* 143(2):518-25.
 29. Fleige S, Pfaffl M. W. (2007). Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt* 5: 4-8.
 30. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, et al. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*; 432:917-21
 31. Flower DR. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* ;318 (Pt 1):1-14. Review.
 32. Flower, D.R. (2000). Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 327–336.
 33. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-6.
 34. Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN.(1999). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J.*, (7):433-41.
 35. Fluckinger M, Haas H, Merschak P, Glasgow BJ, Redl B (2004). Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother*;48(9):3367-72.
 36. Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., et al. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 4, 1614-27.
 37. Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, et al. (2000). Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet*, 37(5):380-2.
 38. Gerhold K, Blumchen K, Bock A, et al. (2002). E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H).2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 110:110-6. 2
 39. Global Initiative for Asthma, GINA (1994). Pocket guide for asthma management and prevention. NIH/NHLBI, Bethesda Maryland, USA 20892.
 40. Goetz D, Holmes MA, Borregaard N et al., 2002). The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*, Vol. 10, 1033–1043

-
41. Gollob J. A., Kawasaki, H and J. Ritz (1997) Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression. *Eur J Immunol*, Vol:27, 647-52.
 42. Hamelmann E, Wahn U, Wahn V. (2006). Immunomodulation in der Allergie-und Asthmatherapie. Uni-MED Verlag AG Bremen
 43. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, et al. (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):766-75.
 44. Hamelmann E, Wahn U, Gelfand EW (1999). Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* ;118(2-4):90-4.
 45. Hartley J. P. R., Nogrady S. G. (1980). Effect of an inhaled antihistamine on exercise-induced asthma. *Thorax* 35: 675-679.
 46. Heinzmann A, Blattmann S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (2000). Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. *Eur J Immunogenet*, (3):121-7.
 47. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA (1997). The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med.*,337(24):1720-5.
 48. Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H (1998). Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 28:625-34.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y (2000). A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.*;161(3 Pt 1):906-9.
 52. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C (2003). Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res.*;4(1):14.
 53. Holmes MA, Paulsene W, Jide X, Ratledge C, Strong RK (2005). Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure.*;13(1):29-41.

-
54. Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Gray, J.D. (2003) The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 74, 471-8.
 55. Hotchkiss R. D. (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch Biochem.* 16: 131-141.
 56. James, A., Pare, P., & Hogg, J. (1989a). The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 242–246.
 57. Janeway CA, Chervonsky AV, Sant'Angelo D. (1997). T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? ;7(5):R299-300. Review.
 58. 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.
 59. Kaur D., Berger P., Duffy D. E., Brightling C. E., Bradding P. (2005). Co-cultivation of mast cells and FcεRIα+ dendritic-like cells from human hip bone marrow. *Clin. Exp. Allergy* 35: 226–233.
 60. Kay AB, Pathology of mild, severe, and fatal asthma (1996). *Am J Respir Crit Care Med*, Vol: 154, S66-9.
 61. Keatings VM, Barnes P.J. (1997). Granulocytes activation markers in induced sputum; comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 155:449-53.
 62. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N (2000). Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482 272^283.
 63. Klausen P, Niemann CU, Cowland JB, Krabbe K, Borregaard N. (2005). On mouse and man: neutrophil gelatinase associated lipocalin is not involved in apoptosis or acute response. *Eur J Haematol* ; 75:332-40. 23
 64. Knight, D. A., & Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8: 432–446.
 65. Kraft S., Kinet J.P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Rev. Immunol.* 7: 365–378.
 66. Kuwano K, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Yamada M, Nakanishi Y (2005). Apoptosis signaling pathways in lung diseases. *Med Chem.* ; 1:49-56.
 67. Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, S.680-685

-
68. Larche M., Robinson DS, Kay A.B. (2003). The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111, 450-63; quiz 464.
 69. Leckie M. J., Brinke A.ten, Khan J., et al. (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response, Barnes, *Lancet*, Vol: 356, 2144-8.
 70. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC et al. (1997): Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma, *J Exp Med*, Vol: 185, 2143-56,
 71. Lenschow D J, Herold KC, Rhee L, Patel B, et al. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes, *Immunity*, Vol: 5, 285-93.
 72. Li, X., & Wilson, J.W. (1997). Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 229–233.
 73. Liu Q, Nilsen-Hamilton M. (1995). Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem.*; 270(38):22565-70.
 74. Livak K. J. und Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25: 402-408
 75. Maziak W, Behrens T, Brasky TM, et al. (2003). Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy*;58(7):572-9.
 76. McKenzie AN, *Pharmacol Ther* (2000). Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13, *Pharmacol Ther*, Vol: 88, 143-51.
 77. McManus J. F. A. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23: 99-108.
 78. Meheus LA, Fransen LM, Raymackers JG, et al. (1993). Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J Immunol* ; 151:1535-47.
 79. Meijer AH, Verbeek FJ, Salas-Vidal E, et al. (2005). Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection. *Mol. Immunol.* 42(10):1185-203.
 80. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. (2004). Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*; 15:3073-82. 27

-
81. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54
 82. Nelson AL, Barasch JM, Bunte RM, Weiser JN. (2005). Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an iron-sequestering component of innate immunity. *Cell Microbiol* ; 7:1404-17. 25
 83. Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H. (2002) The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8, 567-73.
 84. O'Garra, A., Barrat, F.J. (2003) In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 85, 135-9.
 85. O'Garra, A., Vieira, P. (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10, 801-5.
 86. Orabona C, Dumoutier L, Renaud JC. (2001). Interleukin-9 induces 24P3 lipocalin gene expression in murine T cell lymphomas. *Eur Cytokine Netw*; 12:154-61.
 87. Ramsdell, F. (2003) Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19, 165-8.
 88. Richardson Des R, (2005). 24p3 and Its Receptor: Dawn of a New Iron Age? *Cell* 123, Elsevier Inc.
 89. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. (1989) Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 11;1(8637):520-4
 90. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, and the EGEA Cooperative Group. (2002) Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 57(7):607-613.
 91. Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., Levings, M.K. (2001) Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68-79.
 92. Rosenwasser, L. J. und Meng, J. (2005). Anti-CD23. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* 29: 61-72.
 93. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, et al. (2000). Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.*;106(1 Pt 1):135-40.
 94. Siegel S C (1987). History of asthma deaths from antiquity, *J Allergy Clin Immunol*, Vol:80, 458-62.
 95. Simon HU, Blaser K. (1995). Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today*; 16:53-5. 21

-
96. Snapper CM, Pecanha LM, Levine AD and Mond JJ (1991). IgE class switching is critically dependent upon the nature of the B cell activator, in addition to the presence of IL-4, *J Immunol*, Vol: 147, 1163-70.
 97. Stadelmann C, Lassmann H. (2000). Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res.* 2000 Jul;301(1):19-31.
 98. Sunil VR, Patel KJ, Nilsen-Hamilton M, et al. (2007). Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Exp Mol Pathol* ; 83(2):177-87.
 99. Takaki S, Tominaga A, Hitoshi Y, Mita S, Sonoda E, Yamaguchi N (1990). Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor *Embo J*, Vol: 9, 4367-74.
 100. Tang M. L.K., Wilson J. W., Stewart A. G., Royce S. G. (2006). Airway remodelling in asthma: Current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & Therapeutics* 112: 474–488.
 101. Tang Q, Boden EK, Henriksen, KJ, Bour-Jordan H, B M, Bluestone JA (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34, 2996-3005.
 102. Taube C, Dakhama A, Rha YH, Takeda K, Joetham A, Park JW et al. (2003). Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J Immunol* ; 170(8):4301-9.
 103. Uhlig S, (1998). The isolated perfused lung. In: Uhlig S, Taylor A, eds. *Methods in Pulmonary Research*. Birkhaeuser, Boston; 29-53.
 104. Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH (2003). Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112,480-7; quiz 488.
 105. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. (2002). Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418: 426–430.
 106. Van Oosterhout AJ, Fattah D, Van Ark I, Hofman G, Buckley TL and Nijkamp FP (1995). Eosinophil infiltration precedes development of airway hyperreactivity and mucosal exudation after intranasal administration of interleukin-5 to mice. *J Allergy Clin Immunol*, Vol: 96, 104-12.
 107. Wills-Karp M, Gavett SH, Schofield B, Finkelman F. (1996). Role of interleukin-4 in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Adv Exp Med Biol* ; 409:343-7.:343-7.
 108. Wilson JW & Li X (1997). The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin. Exp. Allergy* 27: 363–371.
 109. Witzentrath M, Ahrens B, Kube SM, et al. (2006). Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:466-472.

110. Wohlleben G, Muller J, Tatsch U, Hambrecht C, Herz U, Renz H et al. (2003). Influenza A virus infection inhibits the efficient recruitment of Th2 cells into the airways and the development of airway eosinophilia. *J Immunol* ; 170(9):4601-11.
111. Zhang J, Wu Y, Zhang Y, Leroith D, Bernlohr DA, Chen X. (2008). The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. *Mol Endocrinol* ; 22:1416-26. 26
112. Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM et al. (2003). Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* ; 111(12):1863-74.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann, der mir nicht nur die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte, sondern mir auch überhaupt erst die Möglichkeit erschlossen hat, dass ich diese Doktorarbeit anfertigen konnte. Des Weiteren danke ich Ihm dafür, dass er mir in vielen Bereichen jede erdenkliche Gestaltungsmöglichkeit gab und für das in mich gesetzte Vertrauen, dass er mir mit den einhergehenden Aufgaben und der damit verbundenen Verantwortung übertragen hat. Trotz des großen Klinikstreß und seines stetig engen Terminplanes hatte er immer ein „offenes Ohr“ für mich und hat mich immer unterstützt und stand mit Rat und Tat zur Seite.

Unserem Kooperationspartner Herrn Dr. Jack B. Cowland von der Universität Kopenhagen, Dänemark danke ich sehr für die bereitwillige Unterstützung und Überlassung der benötigten Lcn2-Knockout-Mäuse und des rekombinanten Lcn2-Proteins, durch die diese Untersuchungen und Ergebnisse erst ermöglicht wurden.

Unserem Kooperationspartner Herrn Dr. Martin Witzenrath und seiner Mitarbeiterin Frau Stefanie Kube aus der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung und für die Möglichkeit zur Durchführung der IPML der Mauslungen und die daraus resultierenden Ergebnisse.

Ein ganz besonders großer Dank geht auch an das Labor-Team und allen Mitarbeitern, die ich in meiner Zeit im Forschungshaus und Ostring kennen lernen durfte und ohne die dieses ausgezeichnete und kollegiale Arbeitsklima nicht möglich gewesen wäre. Frau Christine Seib, die jederzeit ansprechbar und immer Ihre Hilfe zur Verfügung stellte, danke ich ganz besonders für Ihre Hilfsbereitschaft, sowie auch allen anderen Mitarbeitern durch die ein Zugehörigkeitsgefühl als Team überhaupt erst zustande kam.

Herrn Dr. Hellmuth Meyer danke ich für die geduldige Durchsicht und die wertvollen Anregungen und Hinweise zur Korrektur dieser Arbeit.

Curriculum Vitae

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

Publikationen

In Fachzeitschriften

H.-A. Meyer, C. Heidt, M. Krokowski, A. M. Dittrich, U. Wahn and E. Hamelmann (2009) Gene expression profiling after acute versus chronic allergen airway exposure reveals distinct gene clusters. *Allergy & Clinical Immunology International –Journal of the World Allergy Organization* 2009; eingereicht.

Dittrich, Anna Maria *, Krokowski, Martin *, Meyer, Hellmuth Alexander, Quarcoo, David, Avagjan, Angela, Ahrens, Birgit, Cowland, Jack B. and Hamelmann, Eckard (2009). Lipocalin2 – linking innate and adaptive immunity in allergic airway inflammation *. These authors contributed equally to the study; CEA; in revision.

*Anna M. Dittrich, *David Quarcoo, Martin Krokowski, Hellmuth-Alexander Meyer, Birgit Ahrens, Fong-Fong Chu, R. Steven Esworthy and Eckard Hamelmann (2008). Glutathione Peroxidase-2 Protects Mice from Allergen-Induced Asthma *. These authors contributed equally to the study, *Eur Resp J*; in final revision.

Anke Jaudszus, Martin Krokowski, Peter Möckel, Yasemin Darcan, Avagjan, Angela, Paolo Matricardi, Gerhard Jahreis and Eckard Hamelmann (2008).

Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergen-induced sensitization and airway inflammation via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in mice; *The Journal of Nutrition* 2008; 138: 1336-1342

Dittrich AM, Erbacher A, Diesner F, Krokowski M, Steinhausen S, Stock P, Awagjan A, Quarcoo D, Ahrens B, Hoffmann W, Hamelmann, E (2008). Helminth infection with *Litomosoides Sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation and hyperreactivity in a murine asthma model. *The Journal of Immunology* 2008

Abstracts

Dittrich AM, Quarcoo D, Krokowski M, Ahrens B, Hamelmann E. (2006) Gene expression profiling as novel tool in experimental asthma research. *Exp Toxicol Pathol.* 2006 Jun;57 Suppl 2:31-3. A.M. Dittrich, D. Quarcoo, M. Krokowski, A. Avagjan, B. Ahrens, E.H. Hamelmann (2006) Lipocalin2 (lcn2) is upregulated and May Serve as a Novel Protective Factor in Allergic Airway Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* February 2006 (Vol.117.Issue 2, Page S182)

D. Quarcoo, A.M. Dittrich, M. Krokowski, A. Avagjan, B. Ahrens, E.H. Hamelmann (2006). The Antioxidants, Glutathione-S-Transferase-Omega1-1 (GST1-1) and Glutathione Peroxidase2 (GPX2), Are increased in Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* February 2006 (Vol.117.Issue 2, Pages S150-S151)

Konferenzbeiträge

H.-A. Meyer, A. M. Dittrich, M. Krokowski, D. Quarcoo¹, B. Ahrens, S. M. Kube, M. Witzenth, R. S. Esworthy, F.-F. Chu and E. Hamelmann (2009). Antioxidative Gene werden bei der allergischen Atemwegs-Entzündung im Asthma-Maus Modell hochreguliert und wirken protektiv ;4. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress Berlin 2009.

M. Krokowski, H-A. Meyer, A. Dittrich, Jack B. Cowland, und E. Hamelmann (2008). Lipocalin 2 ein neuer Mediator zwischen angeborener und erworbener Immunität, 20. Mainzer Allergie-Workshop, 7./8. März 2008 (Vortrag).

M. Krokowski, H-A. Meyer, A. Dittrich, Jack B. Cowland and E. Hamelmann (2008). Lipocalin 2 a new mediator between innate and adaptive immunity . 6th EAACI-GA²LEN Da²vos Meeting, 31.01. -03.02. 2008, Pichl/Schladming, Österreich (Vortrag).

M. Krokowski, H-A. Meyer, A. Dittrich and E. Hamelmann (2007). Lipocalin 2 a new mediator between innate and adaptive immunity . Inflammatory of Barrier Organs, 12.07. -14.07. 2007, Kiel (Poster).

D. Quarcoo, A.M. Dittrich, M. Krokowski, B. Ahrens, W. Griethe, Q.T. Dinh, A. Fischer and E. Hamelmann (2005)
Identification of common inflammatory genes by gene expression-profiling in a model of allergen-induced airway disease, Inflammatory of Barrier Organs, 3./4.06. 2005, Kiel (Poster).

D. Quarcoo, A. M. Dittrich, M. Krokowski, B. Ahrens, W. Griethe, Q.T. Dinh, and E. Hamelmann Identification of common inflammatory genes by gene expression profiling in a mouse model of allergen-induced airway disease, Allergie-Kongress, Juni 2005, München (Poster).

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Martin Krokowski

Berlin, den 3. September 2009