

**Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Programmbereich Asthma und Allergie  
Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie  
Direktor: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach**

---

**„Zur Rolle des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden  
Hormons ( $\alpha$ -MSH) und des *retinoid-related orphan  
receptor  $\gamma$ t* (ROR $\gamma$ t) bei der Immunpathogenese  
des Asthma bronchiale“**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften  
vorgelegt von

**Sina Webering**  
aus Flensburg

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fehrenbach
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.02.2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Asthma bronchiale</b>	<b>4</b>
1.1.1 Krankheitscharakteristika	5
1.1.2 Immunpathogenese	6
1.1.3 Regulationsmechanismen	8
<b>1.2 Das <math>\alpha</math>-Melanozyten-stimulierende Hormon (<math>\alpha</math>-MSH)</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Th17-Lymphozyten beim schweren Asthma bronchiale</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Hypothesen</b>	<b>15</b>
<b>2 Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Protokolle zur Induktion und Immunmodulation von Atemwegsentzündungen</b>	<b>17</b>
2.2.1 Induktion einer allergischen Entzündung der Atemwege und lokale Applikation von $\alpha$ -MSH	18
2.2.2 Induktion einer allergischen Entzündung der Atemwege und Injektion eines $\alpha$ -MSH Antagonisten	19
2.2.3 Etablierung einer neutrophilen Atemwegsentzündung	20
2.2.4 Induktion einer neutrophilen Entzündung der Atemwege und therapeutische Behandlung mit ROR $\gamma$ t-spezifischer siRNA	21
<b>2.3 Bestimmung der Atemwegshyperreagibilität</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Gewinnung von Probenmaterial</b>	<b>24</b>
2.4.1 Gewinnung von Serumproben	24
2.4.2 Gewinnung von broncho-alveoläre Lavage	24
2.4.3 Perfusion der Lunge	25
2.4.4 Entnahme der Lunge für Expressionsanalysen	25
2.4.5 Entnahme von Milz und Lymphknoten	25
2.4.6 Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark	25
<b>2.5 Zählung und Differenzierung der Leukozytensubpopulationen der broncho-alveolären Lavage (BAL)</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Lungenhistologie</b>	<b>26</b>
2.6.1 Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie	26
2.6.2 Hämatoxilin-Eosin- (HE) und Perjodsäure-Schiff- (PAS) Färbung	27
2.6.3 Immunhistochemie (IHC)	27

---

<b>2.7</b>	<b>Konzentrationsbestimmung von Zytokinen</b>	<b>29</b>
2.7.1	Cytometric Bead Array (CBA)	29
2.7.2	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) / Enzyme Immuno Assay (EIA)	30
<b>2.8</b>	<b>Herstellung von Lungenhomogenat</b>	<b>30</b>
<b>2.9</b>	<b>Herstellung einer Lungenzellsuspension</b>	<b>31</b>
<b>2.10</b>	<b>Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz und Lymphknoten</b>	<b>31</b>
<b>2.11</b>	<b>Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation</b>	<b>32</b>
<b>2.12</b>	<b>Aufreinigung naiver CD4+/CD62L+ T-Zellen mittels Magnet-Bead-Separation</b>	<b>32</b>
<b>2.13</b>	<b>Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark</b>	<b>34</b>
<b>2.14</b>	<b>Differenzierung von OVA-spezifischen Th17 Zellen</b>	<b>34</b>
<b>2.15</b>	<b>Transfektion von primären OVA-spezifischen Th17 Zellen</b>	<b>35</b>
2.15.1	Transfektion von Th17 Zellen mit ROR $\gamma$ t-spezifischen DNAsen	36
2.15.2	Transfektion von Th17 Zellen mit ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA	36
<b>2.16</b>	<b>Kurzzeitstimulation der mononukleären Zell- (MNC) Kultur</b>	<b>37</b>
<b>2.17</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysen</b>	<b>37</b>
2.17.1	Messung der Transfektionseffizienz	37
2.17.2	Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern auf murinen Zellen	38
2.17.3	Intrazelluläre FACS-Färbung	38
<b>2.18</b>	<b>RNA-Aufreinigung</b>	<b>39</b>
<b>2.19</b>	<b>Reverse Transkription</b>	<b>39</b>
<b>2.20</b>	<b>Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</b>	<b>39</b>
<b>2.21</b>	<b>DNA-Agarose-Gelelektrophorese</b>	<b>41</b>
<b>2.22</b>	<b>Statistik</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Einfluss von <math>\alpha</math>-MSH auf die Immunpathogenese des Asthma bronchiale</b>	<b>42</b>
3.1.1	Die Produktion von $\alpha$ -MSH ist beim experimentellen Asthma bronchiale erhöht	42
3.1.2	$\alpha$ -MSH vermindert das experimentelle Asthma in der Maus	44
3.1.3	Die Neutralisierung von $\alpha$ -MSH geht mit einer leichten Verschlimmerung der Atemwegsentzündung in der Maus einher	47
3.1.4	Der Melanokortinrezeptor 5 (MC5R) wird verstärkt beim experimentellen Asthma exprimiert	50
3.1.5	$\alpha$ -MSH hat keine Wirkung auf das experimentelle Asthma in MC5R-defizienten Mäusen	53
3.1.6	$\alpha$ -MSH beeinflusst die Produktion eosinophil-chemotaktisch wirkender Chemokine und Zytokine	56

---

<b>3.2</b>	<b>Die Rolle von ROR<math>\gamma</math>t als Zielgen für eine therapeutische Intervention beim neutrophilen Asthma</b>	<b>58</b>
3.2.1	Das neutrophile Asthma bei der Maus geht mit einer erhöhten Anzahl an Th17 Zellen und Th17-spezifischer Entzündungsmarker einher	58
3.2.2	Ein ROR $\gamma$ t-Defizit vermindert die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge	63
3.2.3	ROR $\gamma$ t-spezifische DNAsyme haben keinen Einfluss auf <i>in-vitro</i> generierte Th17 Zellen	67
3.2.4	ROR $\gamma$ t-spezifische siRNAs vermindern die Expression von ROR $\gamma$ t und von pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen bei <i>in-vitro</i> generierten Th17 Zellen	69
3.2.5	Die lokale Applikation von ROR $\gamma$ t-spezifischer siRNA lindert neutrophiles Asthma bei der Maus	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>105</b>
<b>6.1</b>	<b>Material</b>	<b>105</b>
6.1.1	Mäuse	105
6.1.2	Betäubungsmittel	105
6.1.3	Geräte	105
6.1.4	Software	106
6.1.5	Antikörper	106
6.1.6	Peptide	107
6.1.7	Zytokine	107
6.1.8	Kits	107
6.1.9	Primer/ siRNAs/DNAsyme	107
6.1.10	Reagenzien und Chemikalien	108
6.1.11	Verbrauchsgegenstände	109
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>111</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>114</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Publikationsverzeichnis aus der Dissertation</b>	<b>118</b>
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>123</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale wird als eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit eingestuft. Eine besonders hohe Prävalenz und Inzidenz ist dabei vor allem in wohlhabenden, industrialisierten Ländern mit westlichem Lebensstil zu beobachten<sup>1</sup>. Dazu gehören neben Großbritannien, Irland und Neuseeland auch Australien und Kanada mit einer Prävalenz zwischen 14% und 18%<sup>2</sup>.

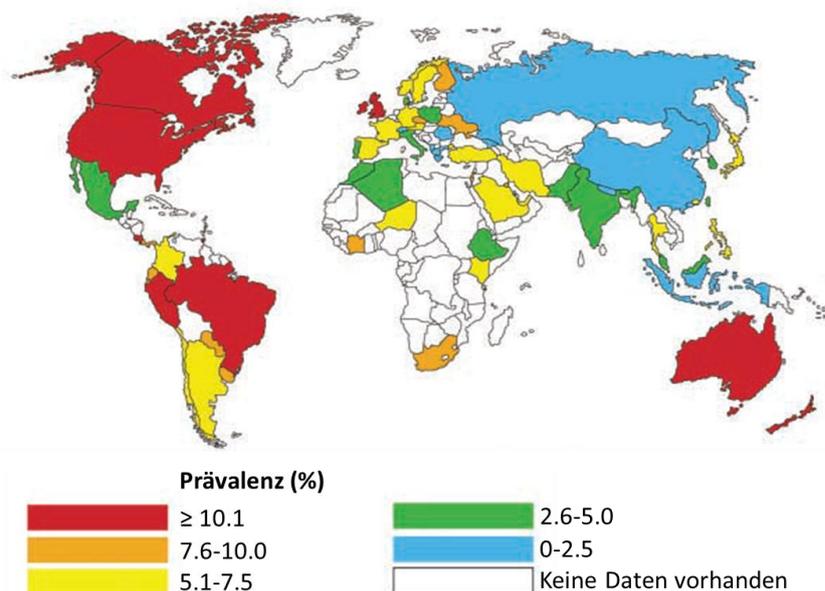


Abbildung 1: Weltweite Prävalenz von Asthma bronchiale (nach Masoli, 2004)<sup>2</sup>

Nach Angaben der World Health Organisation (WHO) sind weltweit 300 Millionen Menschen jeglicher Herkunft und aller Altersklassen erkrankt. Obwohl sich die Prävalenz in den letzten Jahren leicht verringert hat, wird die Anzahl an Asthmatikern bis zum Jahr 2025 um schätzungsweise weitere 100 Millionen ansteigen. Derzeit wird etwa ein von 250 Todesfällen in Zusammenhang mit Asthma gebracht<sup>3</sup>.

Auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive stellt Asthma eine große Bedeutung dar. Neben den direkten Kosten wie für Medikamente, stationäre Behandlung oder Rehabilitation, entstehen weitere indirekte Kosten (Ausfall von Arbeitskraft, Arbeitsunfähigkeit, frühzeitiger Ruhestand). In den USA belaufen sich die

Gesamtkosten auf etwa 56 Milliarden Dollar, in Europa auf über 17 Milliarden Euro pro Jahr<sup>4,5</sup>.

Auch Deutschland ist mit einer Prävalenz von ca. 7% von dem Trend der steigenden Asthmaprävalenz nicht ausgenommen<sup>2</sup>. Laut dem Weißbuch Lunge liegen die direkten Kosten bei 690 bis 981 Millionen Euro pro Jahr<sup>6</sup>. Die jährlich über 360.000 Krankentage, die durch asthmabedingte Arbeitsunfähigkeit entstehen, sind mittlerweile ähnlich hoch wie beim Diabetes-mellitus-Typ-1 und -2 oder bei chronisch ischämischen Herzkrankheiten<sup>7</sup>.

Auffallend ist, dass über 50% der direkten und indirekten Gesundheitskosten für die Behandlung von Asthmatikern mit einem schwerem Asthma anfallen, die nur etwa 5-10% des Asthmagesamtkollektivs ausmachen<sup>8,9</sup>.

### **1.1.1 Krankheitscharakteristika**

Das Asthma bronchiale ist eine sehr heterogene und komplexe Erkrankung, die definiert wird als chronisch entzündliche Erkrankung, begleitet von einer Überempfindlichkeit (Hyperreagibilität) der Atemwege. Diese Atemwegshyperreagibilität (AHR) führt zu immer wiederkehrenden Episoden von Keuchen, Husten, Engegefühl in der Brust sowie Atemnot. Die auftretenden Symptome können je nach Ausprägung und Schweregrad der Erkrankung stark schwanken<sup>10,11</sup>. Neben genetischen Faktoren spielen Umwelteinflüsse und Reizstoffe bei der Entwicklung und Manifestation des Asthmas eine große Rolle. Dabei wird zwischen zwei Haupt-Asthmaformen unterschieden: dem allergischen (extrinsischen) und dem nicht-allergischen (intrinsischen) Asthma<sup>12</sup>. Das allergische Asthma wird meist schon in frühen Jahren durch unterschiedlichste Allergene ausgelöst und geht mit einem erhöhten Serumspiegel des Allergen-spezifischen Immunglobulins E (IgE) sowie einer gesteigerten Anzahl T-Helfer-2 Lymphozyten (Th2) und eosinophilen Granulozyten einher. Die Th2 Zellen sezernieren ein spezifisches Set an Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13, welche direkt auf die glatten Muskelzellen der Atemwege oder das Atemwegsepithel wirken und als Th2-spezifische Zytokine bezeichnet werden<sup>13</sup>. Daneben sezernieren eosinophile Granulozyten verschiedene Entzündungsmediatoren, die zu einer chronischen Entzündung und gegebenenfalls (ggfs.) Zerstörung des

Bronchialepithels führen und mit der Zeit durch die ständigen Reparaturmechanismen den strukturellen Umbau der Atemwege („airway remodelling“) fördern<sup>14</sup>. Bei Asthmatikern mit mildem oder moderatem Asthma können die Symptome durch die Therapie mit Kortikosteroiden in den meisten Fällen kontrolliert werden<sup>15</sup>. Anders ist dies bei Asthma-Patienten mit einer schweren Verlaufsform. Schweres Asthma ist charakterisiert durch anhaltende Beschwerden, häufige Exazerbationen sowie einer deutlichen Verschlechterung der Lungenfunktion durch die persistierende Atemwegsobstruktion. Asthmatiker mit schwerem Asthma sprechen häufig schlecht auf die Behandlung mit Kortikosteroiden an. Daher benötigen sie neben hoch dosierten Kortikosteroiden in Kombination mit langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten oft zusätzliche Medikamente wie Theophylline oder Leukotrienantagonisten. Die Symptome und die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen der Medikamente schränken die Lebensqualität der Patienten stark ein<sup>15,16</sup>. Im Gegensatz zu Asthmatikern mit einer milden oder moderaten Verlaufsform zeigt das zelluläre Infiltrat dieser Patienten oft eine Akkumulationen von neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen, verbunden mit einer erhöhten Konzentration pro-inflammatorischen Mediatoren. Da die Anzahl dieser Zellen mit dem Schweregrad des Asthma bronchiale korreliert, scheinen sie eine Schlüsselrolle bei der Aggravierung des asthmatischen Phänotyps einzunehmen.

### 1.1.2 Immunpathogenese

Asthma bronchiale ist eine entzündliche und sehr komplexe Atemwegserkrankung, bei deren Pathogenese eine Vielzahl von Immunzellen wie unter anderem (u.a.) Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie die Strukturzellen der Atemwege beteiligt sind. Die Freisetzung von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen führt zum strukturellen Umbau der Atemwege und schafft somit die Grundlage für die Entstehung dieser chronischen Erkrankung. Die grundlegenden Mechanismen sind beim allergischen und nicht-allergischen Asthma ähnlich<sup>17</sup>. Die Entstehung des Asthma bronchiale kann nach derzeit gängiger Vorstellung in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden. Bei einer Vielzahl von Patienten führt ein vorangegangener Kontakt mit einem Allergen

(Hausstaubmilbenkot, Tierhaare, Schimmelpilze, Gräser etc.) zur allergischen Sensibilisierung. In dieser ersten Phase spielen antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, DCs) eine entscheidende Rolle. Das Antigen wird von unreifen dendritischen Zellen innerhalb der Atemwegsmukosa aufgenommen und prozessiert. Inflammatorische Zytokine und Chemokine, die vom Epithel gebildet werden, verstärken die Reifung der DCs und führen zu ihrer Aktivierung. Die aktivierten DCs wandern dann zu den regionalen Lymphknoten und präsentieren Peptidfragmente des aufgenommenen Antigens über den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) II auf ihrer Oberfläche den naiven T (Th0) Lymphozyten. Die Interaktion zwischen diesen Zellen führt in Anwesenheit von IL-4 zur Differenzierung von Th2 Lymphozyten aus den naiven T-Zellen<sup>18</sup>. Durch den Kontakt der Th2 Lymphozyten mit antigenspezifischen B-Lymphozyten und Bildung der Th2 spezifischen Zytokine Interleukin (IL)-4 und IL-13 werden die B Zellen zur IgE Produktion angeregt. Das allergenspezifische IgE bindet in der Folge an hochaffine IgE-Oberflächenrezeptoren (Fc<sub>ε</sub>RI) von Effektorzellen wie Mastzellen und basophilen Granulozyten<sup>19</sup>. Ein erneuter Allergenkontakt führt dann über die Bindung und Kreuzvernetzung des IgEs mit dem Fc<sub>ε</sub>RI-Rezeptor innerhalb von kurzer Zeit zur Degranulation dieser Zellen und zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen, die eine Kontraktion der Atemwegsmuskulatur und eine vermehrte Mukusproduktion veranlassen<sup>20</sup>. Nach der IgE-vermittelten frühen Immunreaktion kommt es in der späten Phase zur Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen sowie Granulozyten aus dem Blut in die Lunge. Charakteristisch für eine akute allergische Entzündung der Atemwege sind neben den Th2 Lymphozyten die eosinophilen Granulozyten. Eine eosinophile Entzündungsreaktion wird hauptsächlich durch das Zytokin IL-5 vermittelt, welches von Th2 Lymphozyten und Mastzellen produziert wird und die Differenzierung sowie das Überleben der eosinophilen Granulozyten in der Peripherie fördert. Weitere Chemokine wie „*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*“ (RANTES) und Eotaxine, die von Makrophagen, T-Lymphozyten, dem Epithel und eosinophilen Granulozyten produziert werden, dienen als chemotaktisch wirkende Mediatoren und steuern die Migration und Einwanderung der eosinophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung<sup>21</sup>. Dort tragen sie durch die Sekretion

zytotoxischer Granulaproteine wie dem „major basic protein“ (MBP) und der eosinophilen Peroxidase (EPO) wesentlich zur Epithelschädigung und in der Folge zur Bronchokonstriktion und Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität bei<sup>22</sup>.

Die Immunpathogenese der schweren Verlaufsform des Asthma bronchiale ist bislang weit weniger verstanden. Interessanterweise korreliert der Schweregrad des Asthma bronchiale nämlich weder mit dem IgE-Titer, der Konzentration an Th2 Zytokinen noch mit der Anzahl eosinophiler Granulozyten. Beim schweren Asthma scheinen neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Aggravierung zu spielen<sup>23,24</sup>: neutrophile Granulozyten produzieren und sezernieren reaktive Sauerstoffspezies und eine Reihe von Enzymen und Zytokinen wie den Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , IL-9 und den „transforming growth factor beta“ (TGF- $\beta$ ), die die bestehende allergische Immunantwort beeinflussen; während TNF- $\alpha$  und IL-9 zu einer Aggravierung der Entzündung führen, indem sie Entzündungs- und Strukturzellen wie Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und das Atemwegsepithel stimulieren, wird durch die Bildung von TGF- $\beta$  die Proliferation und Kollagensynthese in Lungenfibroblasten induziert<sup>25</sup>.

Bei Patienten mit einem schweren Asthma-Phänotyp ist die Expression des Th2 spezifischen Zytokins IL-4 signifikant vermindert. Hingegen ist die Expression von IL-8, einem Chemokin, welches stark chemotaktisch auf Neutrophile wirkt, stark erhöht und korreliert mit der Anzahl an Neutrophilen<sup>26</sup>. Die Frage nach der initialen Rekrutierung dieser Zellen in das Atemwegsgewebe ist daher von großer Bedeutung. Neben den Kortikosteroiden, die im gewissen Rahmen selbst zur Neutrophilie beitragen, stehen nun auch Th17 Zellen in Verdacht, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer neutrophilen Entzündungsreaktion zu spielen<sup>23,24</sup>.

### 1.1.3 Regulationsmechanismen

Die komplexen immunologischen Regulationsmechanismen, die bei den einen Personen vor dieser allergischen Erkrankung schützen und bei anderen zur Entstehung des Asthma bronchiale beitragen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Bislang standen vor allem Th2 Lymphozyten mit ihren pro-inflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 im Focus der allergischen Reaktion. Die freigesetzten Th2 Zytokine

veranlassen die Differenzierung von naiven Th0 zu Th2 Zellen, fördern die Produktion von IgE durch B-Lymphozyten und sorgen für eine Aktivierung und Migration von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung. Als direkte Gegenspieler der Th2 Zellen werden die Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) produzierenden Th1 Zellen betrachtet (Th1/Th2-Paradigma)<sup>27</sup>. Für die Differenzierung der Th1 Zellen sind insbesondere die Zytokine IL-12 und IL-18 von großer Bedeutung<sup>28</sup>. Das Th1/Th2-Paradigma besagt, dass sich die beiden T-Lymphozyten gegenseitig regulieren können. Im Normalfall besteht im Körper ein Gleichgewicht zwischen den beiden Zelltypen und ihren Zytokinen. Eine Dysbalance zugunsten der Th2 Antwort wird bei Allergien beobachtet<sup>27</sup>. Die Hygienehypothese, die auf der Grundlage von epidemiologischen Daten aufgestellt wurde, versucht dieses Ungleichgewicht zu erklären. Demnach wirkt eine erhöhte Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten und Krankheitserregern, die vermehrt Th1-Immunantworten auslösen, protektiv. Finden diese erhöhten Expositionen in der frühen Kindheit nicht statt, so ist die Fähigkeit, Th1-Immunantworten auszubilden, vermindert und das Risiko, eine allergische Erkrankung zu entwickeln, steigt<sup>21,29</sup>. Th1 Zellen scheinen somit eine protektive Rolle bei der Ausbildung des Asthma bronchiale zu spielen. Einige Studien belegen, dass die Th1 Zellen durch die Produktion von IFN- $\gamma$  die Mukussekretion sowie die bronchiale Hyperreagibilität hemmen und die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge reduzieren<sup>30-32</sup>. Auf der anderen Seite gibt es Daten, die die protektive Wirkung dieser Zellen in Frage stellen und zeigen, dass Th1 Zellen zu einer Verschlimmerung der Atemwegshyperreagibilität und Entzündung in der Lunge führen können<sup>33,34</sup>. Nach dem heutigen Erkenntnisstand existieren neben den Th1 und Th2 Zellen noch weitere Lymphozyten wie Th17 Zellen, die bei der Entstehung und Chronifizierung der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen.

Studien zeigen, dass auch generell pro-inflammatorische Chemokine und Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie IL-17A beim schweren Asthma in der asthmatischen Lunge stark erhöht sind. Auch Wachstumsfaktoren wie der „Vascular-Endothelial Growth Factor“ (VEGF), der „Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor“ (GM-CSF) und Neutrophine werden vermehrt produziert und greifen in die Regulation der Entzündung und den Umbau der Lungengewebe ein. Gegenregulatorisch oder anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie das Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  sowie IL-10 und TGF- $\beta$ ,

welche der Gegenregulation dienen, sind hingegen stark vermindert. Ein langfristiges Übergewicht an pro-inflammatorischen Mediatoren kann die Atemwegsentzündung und die damit verbundenen Umbauprozesse fördern und zur Chronifizierung der Erkrankung beitragen<sup>28,35</sup> (Abbildung 2).

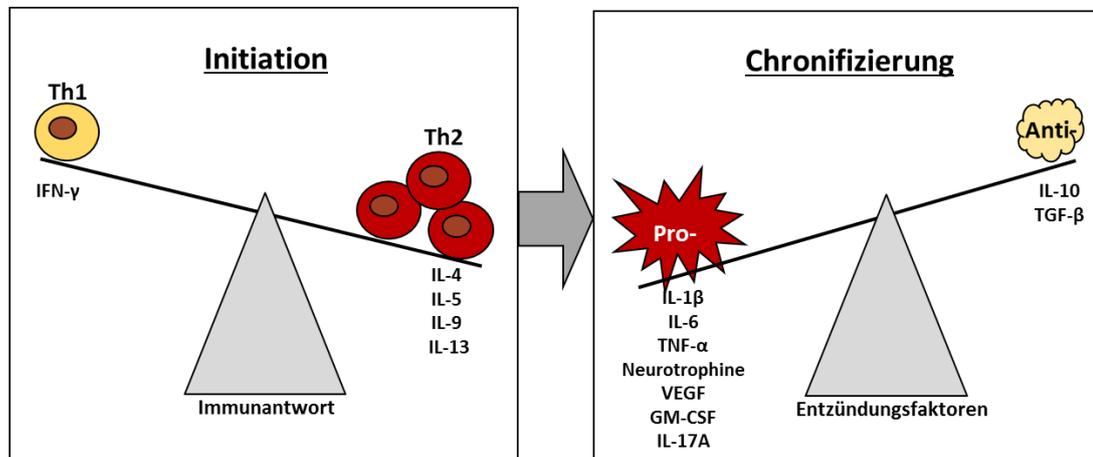


Abbildung 2: Immunregulation beim Asthma bronchiale. Während ein Übergewicht an Th2 Zellen die Entstehung der allergische Entzündungsreaktion begünstigt (Initiation), führt ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Entzündungsfaktoren zur Chronifizierung des Asthma bronchiale (Chronifizierung).

## 1.2 Das $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH)

Als ein weiterer möglicher anti-inflammatorischer Mediator könnte das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH) Einfluss auf die allergischen Entzündungsprozessen nehmen. Das  $\alpha$ -MSH ist ein aus 13 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, welches ursprünglich als Neurohormon der Hypophyse beschrieben wurde. Die Freisetzung von  $\alpha$ -MSH erfolgt aus dem Vorläuferhormon Proopiomelanokortin (POMC) mit Hilfe von proteolytischen Enzymen, den Prohormonkonvertasen (PC). Während die PC-1 in einem ersten Schritt für die Umwandlung von POMC zu Adrenocorticotropin (ACTH) und  $\gamma$ -MSH zuständig ist, erfordert die Bildung von  $\alpha$ -MSH aus ACTH PC-2. Beide Spaltprodukte gehören zusammen mit  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH zur Gruppe der Melanokortine (Abbildung 3).

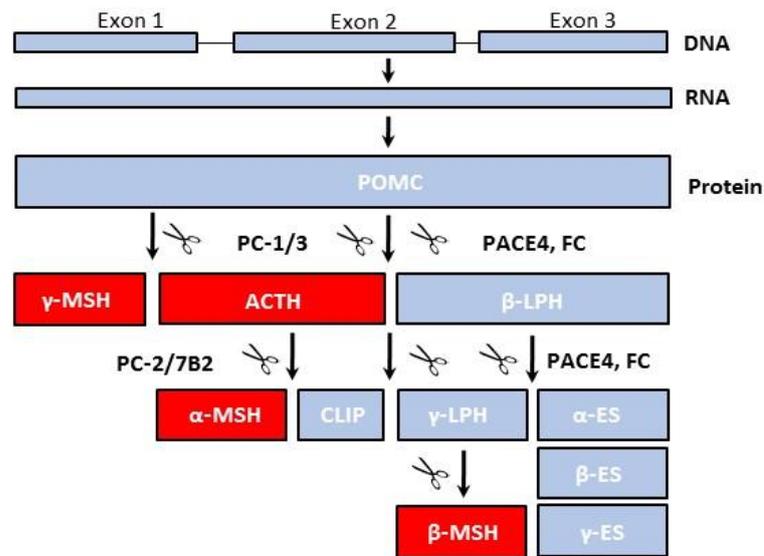


Abbildung 3: Synthese der natürlich vorkommenden Melanokortine. Die natürlichen Melanokortine  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH und ACTH entstehen aus dem Vorläuferhormon Proopiomelanokortin (POMC) mit Hilfe von Konvertasen (Prohormonkonvertase (PC)-1, -2, PACE4, FC, 7B2).

Inzwischen ist bekannt, dass nicht nur die Hypophyse, sondern auch Immunzellen wie Monozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie Epithelzellen und Melanozyten in der Lage sind, POMC und damit  $\alpha$ -MSH freizusetzen<sup>36,37</sup>. Die biologische Wirkung von  $\alpha$ -MSH wird dabei über die Bindung an membrangebundene Melanokortin-Rezeptoren (MC-R) vermittelt, von denen bisher fünf verschiedene Subtypen bekannt sind (MC1R bis MC5R). Die Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden gewebe-spezifisch exprimiert. Daneben unterscheiden sie sich bezüglich ihrer Bindungsaffinität gegenüber den verschiedenen POMC-Peptiden. Angeregt wird die Expression der POMC-Peptide sowie der dazugehörigen Rezeptoren durch pro-inflammatorische Zytokine und ultraviolettes (UV) Licht. In der Haut reguliert  $\alpha$ -MSH hauptsächlich die Pigmentierung. Dort aktiviert es die Melanozyten zur Produktion von Melanin, um so einen Schutz der Haut vor UV-Strahlung zu gewährleisten<sup>37,38</sup>. Darüber hinaus haben eine Reihe von Studien in den letzten Jahren gezeigt, dass  $\alpha$ -MSH über die Bindung an die Rezeptoren nicht nur die Pigmentierung steuert, sondern dass auch anti-inflammatorische und zytoprotektive Effekte über dieses System vermittelt werden. Es ist bekannt, dass die anti-inflammatorische Wirkung *in-vitro* maßgeblich über die Inhibierung der Aktivierung von „Nuclear Factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) erzielt wird<sup>39,40</sup>, was eine verminderte Expression pro-inflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  zur Folge hat<sup>41-43</sup>. Des Weiteren übt  $\alpha$ -MSH eine

immunsupprimierende Wirkung bei humanen Monozyten durch die Induktion von IL-10 aus<sup>44</sup>. Auch *in-vivo* konnte die protektive Wirkung von  $\alpha$ -MSH bestätigt werden. Bei verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -MSH unter anderem die Entzündung bei experimentell induzierter Gehirnhautentzündung<sup>45</sup> sowie bei Schuppenflechte<sup>46</sup>, allergischen Hautentzündungen<sup>47</sup> und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen<sup>48</sup> vermindert. Neben der anti-inflammatorischen Wirkung scheint  $\alpha$ -MSH auch an der Beeinflussung von fibrotischen Prozessen beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH *in-vitro* die Kollagensynthese bei humanen dermalen Fibroblasten vermindert und bei einem Bleomycin-Mausmodell für experimentelle Hautfibrose anti-fibrotische Eigenschaften besitzt<sup>49</sup>. Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung von Raab et al. in einem Mausmodell für das akute experimentelle Asthma nach systemischer Applikation von  $\alpha$ -MSH eine signifikant verminderte Anzahl an eosinophilen Granulozyten sowie verringerte Konzentrationen der Th2 Zytokine IL-4 und IL-13 in der Lunge beobachtet<sup>50</sup>. Über welche der fünf Melanokortin-Rezeptoren diese anti-inflammatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH in der Lunge vermittelt wird und welche Rolle  $\alpha$ -MSH dort spielt, ist bislang nicht genau bekannt.

Die Studien deuten darauf hin, dass  $\alpha$ -MSH als anti-inflammatorischer Gegenspieler einer Reihe pro-inflammatorischer Mediatoren durch negative Feedback-Mechanismen die Entzündung teilweise kontrollieren kann und somit auch in die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung eingreifen könnte.

### **1.3 Th17-Lymphozyten beim schweren Asthma bronchiale**

Mit der Entdeckung der Th17 Zellen als weitere Effektorzellen wurde das klassische Th1/Th2 Schema erweitert. Th17 Zellen zeichnen sich insbesondere durch die Produktion des namensgebenden Zytokins IL-17 aus. Als generell pro-inflammatorischer Mediator scheinen diese Zellen einen Einfluss auf die Pathogenese von chronisch-entzündlichen und Autoimmunerkrankungen zu nehmen<sup>51,52</sup>. Die pro-inflammatorische Wirkung der Th17 Zellen wird vor allem durch die Freisetzung verschiedenster Zytokine und Chemokine vermittelt. Zu diesen gehören neben den Effektorzytokinen IL-17A und IL-17F, auch TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-21, IL-22 sowie IL-26<sup>52,53</sup>.

Bisher ist bekannt, dass Th17 Zellen *in-vitro* durch die Sekretion von IL-17A unter anderem die Produktion der Chemokine und Zytokine „chemokine ligand 1“/„keratinocyte chemoattractant“ (CXCL1/KC; IL-8 Homolog in der Maus), IL-6, GM-CSF, des „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) sowie unterschiedlicher Matrix-Metalloproteasen (MMP) in Bronchialepithelzellen und Fibroblasten induziert. Dabei handelt es sich um pro-inflammatorische Mediatoren, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken und Enzyme, die den Gewebeumbau in der Lunge fördern<sup>54-57</sup>. Eine ähnliche Wirkung durch IL-17A konnte auch bei glatten Muskelzellen beobachtet werden<sup>58</sup> (Abbildung 4).

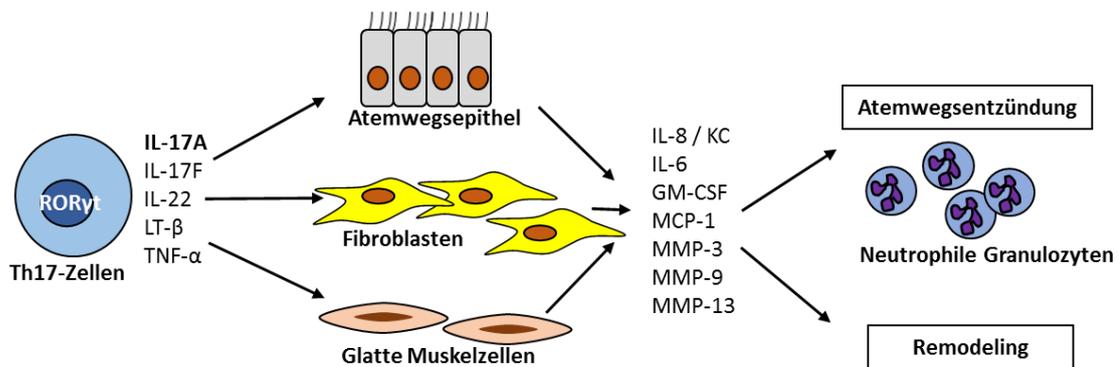


Abbildung 4: Th17 vermittelte Entzündung beim Asthma bronchiale

Bei der Maus wurde gezeigt, dass die intranasale Applikation von IL-17A zu einer starken Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge führt<sup>59</sup>. Die Hypothese, dass Th17 Zellen durch die Sekretion von IL-17A eine wesentliche Rolle innerhalb der Prozesse einnehmen, die zur Entwicklung einer Neutrophilie und Ausbildung eines schweren Phänotyps führt, wird durch klinische Beobachtungen gestützt. Diese zeigen, dass die Menge an IL-8 und die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL von Asthmatikern mit der Höhe an IL-17A mRNA im abgehustetem Bronchialsekret (Sputum) korreliert<sup>60</sup>.

Ähnlich wie Th1 und Th2 Zellen differenzieren Th17 Zellen aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Helfer Lymphozyten (Th0). In der Maus benötigen die Zellen für ihre Differenzierung und Aktivierung die Zytokine TGF-β, IL-6 und IL-1 β. TGF-β und IL-6 induzieren die Expression des IL-23 Rezeptors (IL-23R) auf unreifen Th17 Zellen. Durch IL-23, der an diesen Rezeptor bindet, werden die Entwicklung und das Überleben dieser Zellen

sichergestellt. Auch humane Th17 Zellen benötigen IL-1, IL-6 und IL-23 für ihre Differenzierung. Die genaue Rolle von TGF- $\beta$  ist jedoch noch unklar und die experimentellen Ergebnisse zu TGF- $\beta$  sehr widersprüchlich<sup>24</sup>.

Die Differenzierung der Th17 Zellen in der Maus sowie im Menschen kann jedoch auch durch die Anwesenheit von verschiedenen Zytokinen unterdrückt werden. Zwei Zytokine, die die Entwicklung dieser Zellen hemmen, sind das Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  und das Th2 Zytokin IL-4<sup>61</sup>.

Neben dem speziellen Zytokinmuster zeichnen sich Th17 Zellen noch durch weitere zellspezifische Marker aus, die bei der Differenzierung eine Rolle spielen. Einer dieser Marker ist der Transkriptionsfaktor „*retinoid-related orphan receptor*“  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t), eine thymusspezifische Isoform von ROR $\gamma$ . ROR $\gamma$  und ROR $\gamma$ t werden beide durch RORc kodiert und unterscheiden sich lediglich am N-terminalen Ende. Während ROR $\gamma$  in unterschiedlichen Organen wie Herz, Gehirn, Leber, Lunge und den Muskeln nachgewiesen werden kann, wird ROR $\gamma$ t ausschließlich im Thymus exprimiert. ROR $\gamma$ t gilt als „Masterregulator“ der Th17 Zellen, der nicht nur wesentlich an der Differenzierung dieser Zellen, sondern auch an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt ist<sup>61,62</sup>.

*In-vivo* Studien haben gezeigt, dass ROR $\gamma$ t-defiziente Mäuse eine signifikant verminderte Anzahl an IL-17 produzierenden Zellen ausbilden und geschützt sind vor der Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)<sup>63</sup>. Auch zeigen diese Mäuse eine deutlich verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei einem Mausmodell für das experimentelle Asthma<sup>64</sup>. Eine Überexpression von ROR $\gamma$ t führte bei einem Asthma-Mausmodell hingegen zu einer Aggravierung der Entzündungsantwort. Die Tiere entwickelten eine starke neutrophile Entzündung in der Lunge und waren resistent gegenüber der Behandlung mit Kortikosteroiden<sup>65</sup>.

Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t stellt somit ein potenzielles Ziel für eine Th17 Zellspezifische, therapeutische Intervention dar, um in die Pathogenese des schweren, neutrophilen Asthmas einzugreifen.

## 1.4 Hypothesen

Das Asthma bronchiale ist eine komplexe Erkrankung der Atemwege mit heterogener Ausprägung. Die Behandlung erfolgt in der Regel mit Kortikosteroiden in Kombination mit langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten. Da diese Therapieform häufig mit starken Nebenwirkungen verbunden ist, war es das Ziel dieser Arbeit, neue Targets für die therapeutische Behandlung zu identifizieren. Dabei wurden zwei Moleküle betrachtet, für die es aus der Literatur erste Hinweise gibt, dass sie einen Einfluss auf die Entzündungsantwort und auf die Ausbildung der verschiedenen Asthma-Phänotypen nehmen können. Ein potentieller Mediator mit anti-inflammatorischen Eigenschaften könnte das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon sein. Daher wurde im ersten Teil der Arbeit untersucht, welchen Einfluss  $\alpha$ -MSH auf das eosinophil-dominierte experimentelle Asthma hat.  $\alpha$ -MSH vermittelt seine Wirkung bei der Maus sowie beim Menschen über die Melanokortinrezeptoren 1 bis 5. Über welche Rezeptoren  $\alpha$ -MSH in der Lunge wirkt und welche Zellen dabei eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1.)  $\alpha$ -MSH und seine Melanokortinrezeptoren werden in der asthmatischen Lunge produziert
- 2.)  $\alpha$ -MSH trägt zur Pathogenese des Asthma bronchiale bei
- 3.)  $\alpha$ -MSH hat einen protektiven Einfluss auf die Ausbildung des Asthmas
- 4.)  $\alpha$ -MSH vermindert die Produktion eosinophil-chemotaktischer Zytokine und Chemokine

Demgegenüber zeigt das zelluläre Infiltrat bei Patienten mit einem schweren Asthma bronchiale oft eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen. Ursache dieser erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten könnte eine vermehrte Beteiligung von Th17 Zellen sein, die mit einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t einhergeht. ROR $\gamma$ t könnte somit ein potentielles Zielgen für die Behandlung des neutrophil-dominierten Asthma bronchiale darstellen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Rolle des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t auf das neutrophile Asthma untersucht und folgende Hypothesen überprüft:

- 5.) ROR $\gamma$ t hat einen Einfluss auf das experimentelle neutrophile Asthma
- 6.) ROR $\gamma$ t-spezifische DNzyme und siRNAs vermindern die pro-inflammatorische Aktivität von Th17 Zellen in *in-vitro* generierten Th17 Zellen
- 7.) Durch Verringerung der ROR $\gamma$ t-Produktion mittels ROR $\gamma$ t-spezifischer siRNA lässt sich die pro-inflammatorische Aktivität von Th17 Zellen beim neutrophilen Asthma neutralisieren

## 2 Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die in dieser Arbeit beschriebenen *in-vitro* Experimente wurden Zellen sowohl von weiblichen als auch von männlichen OTII-Mäusen verwendet. Die *in-vivo* Studien wurden ausschließlich mit weiblichen Mäusen im Alter von 6-10 Wochen durchgeführt. Dabei wurden als Wildtyp (wt)-Tiere Balb/c- sowie C57Bl/6J-Mäuse verwendet. Sämtliche gentechnisch veränderten Tiere wurden auf einem C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet. Die versuchsbezogene Haltung erfolgte unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Luftfeuchtigkeit und konstanter Raumtemperatur von 20°C. Alle Mäuse erhielten ovalbuminfreies Wasser und Futter ad libitum. Es wurde ein künstlicher Hell-Dunkel-Zyklus erzeugt. Die *in-vivo* Studien wurden vom Land Schleswig-Holstein genehmigt und im Rahmen der Tierversuchsgenehmigungen V312-72214.123-3(116-8/12) „ $\alpha$ -MSH und Asthma“, V242-7224.123-3 (116-8/13) „MCRs; alpha-MSH und Asthma“, V312-72241.123-3(121-10/11) „TLR's und Sensibilisierung in der Lunge“ und V312-7224.123-3 (21-1/13) „Neutralisierung von Th17 Zellen beim Asthma“ durchgeführt.

### 2.2 Protokolle zur Induktion und Immunmodulation von Atemwegsentzündungen

In der vorliegenden Arbeit dienten Mausmodelle für das experimentelle Asthma als Basis der durchgeführten Studien. Für die verschiedenen Fragestellungen wurden 2 Standardmodelle zur Induktion einer Entzündungsreaktion in der Lunge verwendet, die sich jeweils in der Art der Sensibilisierung sowie der Dauer unterschieden.

Bei dem ersten Modell handelt es sich um ein etabliertes Modell zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung in Verbindung mit der Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit. Hier wurde den Versuchstieren zunächst während der primären Immunantwort das anti-inflammatorische Peptid  $\alpha$ -MSH lokal appliziert (2.2.1). In einem weiteren Schritt wurde den Versuchstieren ein Antagonist gegen  $\alpha$ -MSH injiziert (2.2.2). Des Weiteren wurde ein Modell etabliert, welches eine Th17-

gesteuerte, neutrophile Atemwegsentzündung in der Lunge hervorruft (2.2.3). Nachdem dieses Modell zunächst charakterisiert wurde, wurde den Tieren während der primären Immunantwort eine „small interfering RNA“ (siRNA) gegen den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t lokal appliziert (2.2.4).

### **2.2.1 Induktion einer allergischen Entzündung der Atemwege und lokale Applikation von $\alpha$ -MSH**

Die Voraussetzung für die Etablierung einer lokalen allergischen Entzündung in der Lunge ist die Sensibilisierung gegen ein artfremdes Protein. In den hier beschriebenen Studien wurde dafür das aus Hühnereiweiß gewonnene Ovalbumin (OVA) eingesetzt. Im Mausmodell für das akut-allergische experimentelle Asthma wurde die Sensibilisierung durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 10  $\mu$ g Ovalbumin, gelöst in 100  $\mu$ l PBS in Verbindung mit 100  $\mu$ l des Adjuvans Aluminiumhydroxyd (Alum, Al(OH) $_3$ ) ausgelöst. Diese erfolgte an den Tagen 1, 14 und 21. Die Kontrollgruppe wurde nur mit PBS behandelt. Die Folge dieser systemischen Applikation des Modellallergens Ovalbumin ist eine Reaktion des Immunsystems mit Bildung von OVA-spezifischen Th2 Zellen sowie OVA-spezifischen B-Zellen, welche auch beim menschlichen Asthma bronchiale eine Rolle spielen. Zur Initiation der darauf folgenden lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Tiere an den Tagen 26 und 27 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten mit einem 1%igen OVA Aerosol provoziert, welches mit Hilfe eines Generators vernebelt wurde.

Um das therapeutische Potential des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -MSH) innerhalb der Immunpathogenese des allergischen Asthmas zu untersuchen, wurde den Tieren an Tag 26 und 27 jeweils eine Stunde vor der Aerosol-Challenge 100  $\mu$ l  $\alpha$ -MSH in einer Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht (KG) mit Hilfe eines Microsprayers intratracheal (i.t.) appliziert. Das  $\alpha$ -MSH wurde dabei in sterilem PBS gelöst. Eine weitere Gruppe, die sensibilisiert und mit dem OVA-Aerosol exponiert wurde, erhielt i.t. PBS als Behandlungskontrolle. Als Negativkontrollgruppe diente eine Gruppe, in der kein experimentelles Asthma ausgelöst wurde. Diese Gruppe erhielt zur Sensibilisierung steriles PBS und wurde anschließend einem OVA Aerosol exponiert. Die Präparation der Tiere sowie die Analyse der Parameter, die auf eine Entzündung

der Atemwege sowie auf die Entwicklung einer AHR hinweisen, erfolgte an Tag 28 (Abbildung 5).

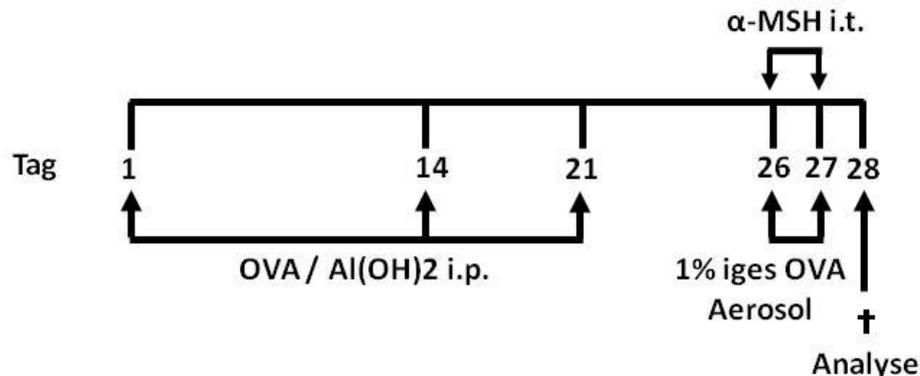


Abbildung 5: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung sowie Immunmodulation durch das Peptidhormon  $\alpha$ -MSH.

### 2.2.2 Induktion einer allergischen Entzündung der Atemwege und Injektion eines $\alpha$ -MSH Antagonisten

Das zuvor beschriebene Protokoll diente dazu, die biologische Funktion des Peptidhormons  $\alpha$ -MSH innerhalb der allergischen Entzündungsreaktion zu untersuchen. Durch die Neutralisierung des natürlich vorkommenden  $\alpha$ -MSHs soll die spezielle Funktion weiter charakterisiert werden. Wie schon in 2.2.1. beschrieben, wurden die Tiere durch drei i.p. Injektionen von 10  $\mu$ g des Modellallergens OVA in Verbindung mit 100  $\mu$ l  $Al(OH)_3$  sensibilisiert. Die Applikation erfolgte an den Tagen 1, 14 und 21 des Protokolls. Zur Initiation der lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Versuchstiere an den Tagen 26 und 27 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten mit einem 1%igen OVA-Aerosol provoziert, welches mittels eines Generators vernebelt wurde.

Um die Funktion von  $\alpha$ -MSH weiter zu untersuchen, wurde ein polyklonaler anti- $\alpha$ -MSH-Antikörper eingesetzt, der  $\alpha$ -MSH bindet und somit dessen Ligand an einen der Melanokortinrezeptoren verhindert. Der  $\alpha$ -MSH Antikörper wurde dabei in sterilem PBS gelöst und in einer Konzentration von 3 mg/kg Körpergewicht den Mäusen in einem Volumen von 200  $\mu$ l i.p. appliziert. Die Behandlungskontrollgruppe wurde mit einem Isotyp-Kontrollantikörper behandelt, der kein murines Antigen erkennt. Die Negativkontrollgruppe, in der kein experimentelles Asthma ausgelöst wurde, erhielt steriles PBS i.p. Die Applikation fand an Tag 26 und 27 jeweils 12 Stunden vor der

jeweiligen OVA-Aerosol Challenge statt. Die Analyse der Atemwegshyperreagibilität sowie die Präparation der Tiere erfolgte an Tag 28 (Abbildung 6).

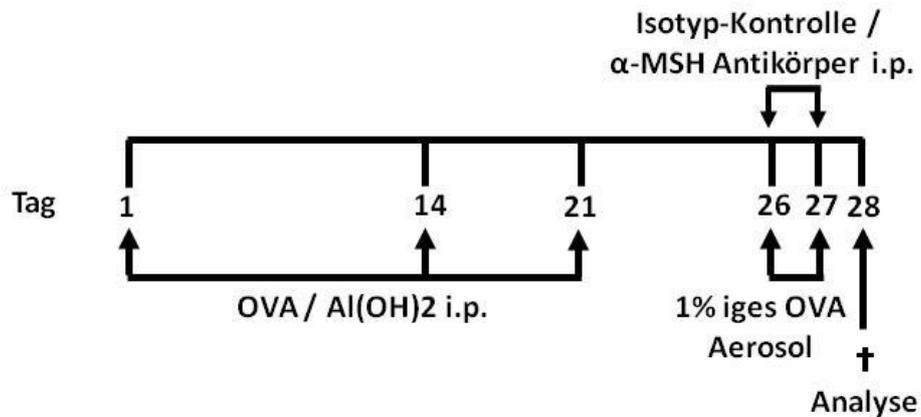


Abbildung 6: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung sowie Immunmodulation durch einen  $\alpha$ -MSH Antagonisten während der Immunantwort

### 2.2.3 Etablierung einer neutrophilen Atemwegsentzündung

Bei dem zuvor beschriebenen Tiermodell handelt es sich um ein Modell, welches eine akut-allergische Entzündungsreaktion in der Lunge induziert und somit nur das von eosinophilen Granulozyten dominierte, allergische Asthma widerspiegelt. Da hiermit nur einige Teilaspekte der humanen Erkrankung zum Ausdruck gebracht werden können, wurde ein weiteres bereits etabliertes Modell<sup>66</sup> zur Induktion einer akuten neutrophilen Atemwegsentzündung leicht adaptiert verwendet und charakterisiert.

Um die Rolle von Th17 Zellen innerhalb der akuten Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurde die Sensibilisierung der Versuchstiere durch eine oropharyngeale Aspiration (o.A.) von 100  $\mu$ g endotoxin-freiem OVA, gelöst in 80  $\mu$ l sterilem PBS, zusammen mit 15  $\mu$ g Lipopolysaccharide (LPS) als Adjuvans, ausgelöst. Die Sensibilisierung erfolgte an Tag 1 und Tag 7. Die Negativkontrollgruppe bekam PBS in die Atemwege appliziert. Dieser Schritt spiegelt damit die zeitgleiche Exposition gegenüber einem möglichen Antigen/Allergen und einem Toll-like Rezeptor (TLR)-Liganden wider. An Tag 14 und 15 wurden die Versuchstiere zur Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten mit einem 1%igen OVA Aerosol provoziert, welches mittels eines Generators vernebelt

wurde. Die Analyse der Versuchstiere erfolgte 24 Stunden später an Tag 16 (Abbildung 7).

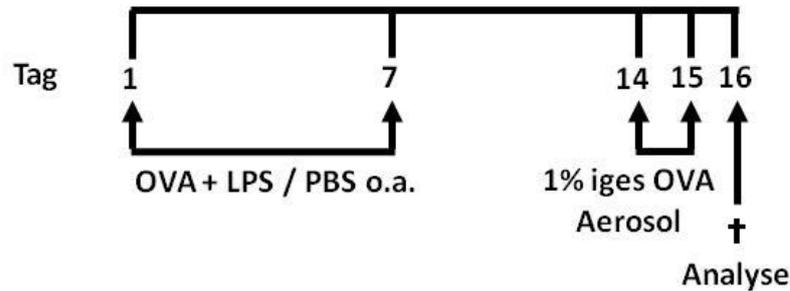


Abbildung 7: Protokoll zur Sensibilisierung und Induktion einer neutrophilen Atemwegsentzündung

#### 2.2.4 Induktion einer neutrophilen Entzündung der Atemwege und therapeutische Behandlung mit RORyt-spezifischer siRNA

Wie in Protokoll 2.2.3. beschrieben, wurde an Tag 1 und 7 durch o.A. von 100 µg endotoxin-freiem OVA, gelöst in 80 µl sterilem PBS zusammen mit 15 µg LPS als Adjuvans, die Sensibilisierung ausgelöst. Die Negativkontrollgruppe bekam PBS in die Atemwege o.A. appliziert. An Tag 14 und 15 wurden die Versuchstiere zur Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten mit einem 1%igen OVA Aerosol provoziert, welches mittels eines Generators vernebelt wurde. Um die pro-inflammatorisch wirkenden Th17 Zellen zu neutralisieren und eine Ausbildung des schweren, Neutrophil-dominierenden Asthmas zu verhindern, wurde eine small interfering RNA eingesetzt. Dafür wurde den Tieren ab Tag 13 bis einschließlich Tag 15 des Protokolls die siRNA jeweils eine Stunde vor der Aerosol-Challenge i.t. appliziert, welche an die Zielsequenz des Th17-spezifischen Transkriptionsfaktor RORyt komplementär bindet und diese degradiert. Bei der siRNA handelte es sich um eine generierte Stealth RNAi™ siRNA für *in-vivo* Applikationen von der Firma Life Technologies. Eine zweite Gruppe wurde dabei mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt, die nicht an die murine RNA bindet (

Tabelle 1).

Tabelle 1: Sequenzen der für die *in-vivo* Versuche verwendeten siRNAs

siRNA	Primersequenz (5' → 3')
<b>RORyt400</b>	GCUGUCAAGUUUGGCCGAAUGUCCA UGGACAUUCGGCCAAACUUGACAGC
<b>Kontroll-siRNA</b>	GGGAGAGCUUUGUGCAGAUCUAAGG CCUJAGAUCUGCACAAAGCUCUCCC

Zur i.t. Behandlung wurden die Mäuse zunächst mit Sevofluoran und einem Sauerstoff-/Luftgemisch sediert. Die Behandlung erfolgte durch Applikation von 200 µg siRNA, gelöst in 100 µl PBS, mit Hilfe eines Microsprayers. Durch spontane Atmung wurde die siRNA dann von den Versuchstieren aspiriert. Die Analyse der Atemwegshyperreagibilität sowie die Präparation der Tiere erfolgte an Tag 16 (Abbildung 8).

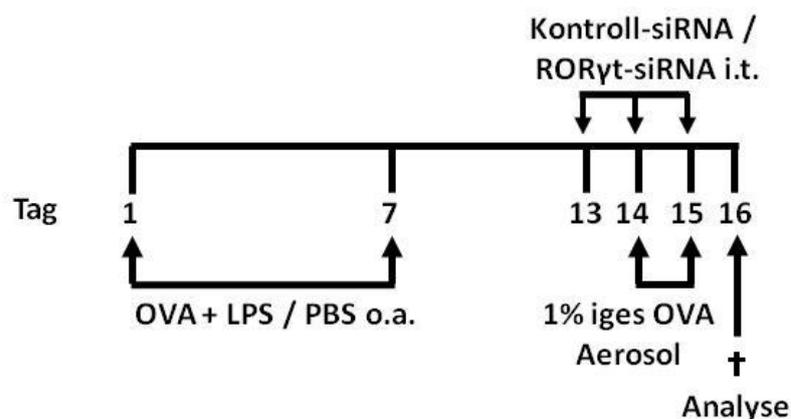


Abbildung 8: Protokoll zur Sensibilisierung, Induktion einer neutrophilen Atemwegsentszündung und therapeutische Behandlung mit RORyt-spezifischer siRNA

### 2.3 Bestimmung der Atemwegshyperreagibilität

Die Messung der Lungenfunktion ist eine der wichtigsten Werkzeuge zur Beurteilung des Asthma bronchiale beim Menschen. Die Entzündung der Atemwege mit zellulärer Infiltration und Freisetzung von Entzündungsmediatoren beeinflusst die bronchiale Atemwegsreagibilität und kann zu einer dauerhaften Lungenfunktionsminderung führen. In dieser Arbeit wurde die Lungenfunktion der Mäuse mittels des FinePoint RC Systems von der Firma Buxco gemessen. Hiermit können am beatmeten und anästhesierten Tier verschiedene Lungenfunktionsparameter wie die Resistance erfasst werden. Die Resistance, angegeben als  $\text{cmH}_2\text{O/l/s}$ , ist ein Maß für den

Strömungswiderstand in den Atemwegen bei definierter Atmung und gilt als einer der wichtigsten Parameter zur Messung von Hyperreaktivität und bronchialer Obstruktionen. Zur Diagnose einer Hyperreaktivität der Atemwege wurde ein Metacholinprovokationstest durchgeführt. Mit Hilfe des Acetylcholin-Derivats Methyl Acetylcholin (Metacholin, MCh) kann während der Messung eine Kontraktion der glatten Atemmuskulatur induziert werden. MCh hat eine Verengung der Atemmuskulatur und somit eine Erhöhung des Atemwegswiderstands zu Folge. Ziel der Messung war es, die Resistance bei ansteigender MCh Konzentration zu ermitteln. Vor der Messung wurden die Versuchstiere durch i.p. Injektion von 350 µl/20 g Körpergewicht einer Rompun-Ketamin-Lösung narkotisiert und anschließend auf Reflexe getestet.

### **Rompun-Ketamin-Lösung**

500 µl Ketamin (10%)

50 µl Rompun (2%)

4,45 ml NaCl (0,9%)

Nachdem kein Schmerzreiz mehr vorhanden war, wurde vorsichtig die Trachea der Tiere freigelegt, mit einem kleinen Schnitt eine Trachealkanüle (1.0 mm) eingeführt und mit einem Garn befestigt. Der Tubus wurde anschließend mit der Beatmungsmaschine verbunden und an das FinePoint-System angeschlossen.

Zur Relaxation der Muskeln und Hemmung der Spontanatmung wurde den Tieren 50 µl 0,2 mg/ml Pakoroniumbromidlösung i.p. gegeben. Die Messung der Ausgangswerte der Lungenfunktion erfolgte nach Abflachen der spontanen Atmung und einem Akklimatisierungszeitraum von 5 Minuten. Anschließend wurde alle 270 Sekunden für jeweils 30 Sekunden MCh in aufsteigender Konzentration (0 mg/ml, 3,25 mg/ml, 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml) vernebelt. Mit steigender MCh Konzentration kommt es zu einer Verengung der Atemwege. Um die Lungen der Versuchstiere auch nach vermehrter Provokation mit MCh noch standardmäßig entfalten zu können, wurde den Mäusen nach Ende der Messung 65 µl des bronchienerweiternden Wirkstoffes Terbutalin (10 µM) intravenös (i.v.) verabreicht. Zur Bewertung der Resistance wurden die Mittelwerte der Messungen zum Zeitpunkt

der PBS Vernebelung (Zeitpunkt 0) gleich 0 gesetzt und die Mittelwerte der folgenden MCh-Konzentrationen darauf bezogen und prozentual umgerechnet.

## **2.4 Gewinnung von Probenmaterial**

### **2.4.1 Gewinnung von Serumproben**

Die Versuchstiere wurden nach der Tötung durch zervikale Dislokation ventral aufgeschnitten und das Zwerchfell durchstoßen. Anschließend wurde das Blut in den sterilen Brustraum des Tieres ausgeblutet und in ein Eppi überführt. Damit dieses vollständig gerinnen konnte, wurden die Proben für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde das Blut für 20 Minuten bei 2000 g und RT zentrifugiert, der Serumüberstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.4.2 Gewinnung von broncho-alveoläre Lavage**

Zur Gewinnung der Zellen, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert waren, sowie zur Untersuchung sämtlicher dort vorhandenen Proteine, wurde eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Dafür wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet und der Halsbereich sowie die Trachea freigelegt. In die Trachea wurde nun eine kleine Öffnung geschnitten, in die eine Trachealkanüle (1.0 mm) eingeführt und mit reißfestem Garn fixiert wurde. Über diese Kanüle wurde anschließend mit Hilfe einer 1 ml Spritze 1 ml eiskaltes PBS mit einem Protease-Inhibitor vorsichtig in die Lunge appliziert und wieder entnommen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in der BAL (2.5.) und die Messung der rückgewonnenen BAL. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 500 g und 4°C wurde der zellfreie BAL-Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 250 µl TriReagent aufgenommen und ebenfalls bei -80°C gelagert.

### **2.4.3 Perfusion der Lunge**

Für die Analyse von T-Lymphozyten aus dem Lungengewebe musste die Lunge zuvor perfundiert werden, um eine Kontamination durch Blutzellen zu verhindern. Nachdem das Tier durch zervikale Dislokation getötet wurde, wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Bauchaorta durchtrennt, so dass möglichst viel Blut durch Ausbluten entfernt wurde. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und mit einer Microlanzette ein kleines Loch in das rechte Atrium des Herzens gestochen. Über eine Knopfkanüle, welche vorsichtig in das rechte Atrium eingeführt wurde, konnte nun 5 ml erwärmtes PBS (37°C) mittels einer 5 ml Spritze dem Lungenkreislauf zugeführt und dieser so gespült werden. Die Perfusion wurde solange durchgeführt, bis das Blut vollständig entfernt und die Lunge einheitlich weiß war. Anschließend wurden die Lungen bis zum nächsten Schritt, der Herstellung einer Lungenzellsuspension, auf Eis gelagert.

### **2.4.4 Entnahme der Lunge für Expressionsanalysen**

Zur Analyse von spezifischen Zytokinen und Chemokinen in der Lunge auf Expressionsebene wurden die Tiere zunächst durch zervikale Dislokation getötet und der Brustkorb freipräpariert. Die Lunge wurde vorsichtig aus der Maus entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **2.4.5 Entnahme von Milz und Lymphknoten**

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz und thorakalen Lymphknoten wurden die Organe mit Hilfe von zwei Pinzetten entfernt. Dafür wurde das Fettgewebe, welches die lokalen Lymphknoten der Lunge umgibt, auseinander gezogen, bis die Lymphknoten frei lagen. Die Organe wurden in sterilem eiskalten PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.4.6 Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark**

Für die Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark (BMDC, bone marrow dendritic cells) wurden nach der Tötung der Tiere die Hinterläufe mit Ethanol (EtOH) desinfiziert,

Femur und Tibia entnommen und vom Muskelgewebe getrennt. Die Knochen wurden jeweils an den Enden aufgeschnitten und mit Dulbecco's Modifiziertes Eagle's (DMEM)-Medium mit Hilfe einer 1 ml Spritze gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 350 g bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

## **2.5 Zählung und Differenzierung der Leukozytensubpopulationen der broncho-alveolären Lavage (BAL)**

Zunächst wurde die BAL gewogen und die Anzahl der Leukozyten in der BAL mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der BAL wurden Zytospins angefertigt. Dafür wurden 50 µl der BAL mit 150 µl sterilem eiskaltem PBS verdünnt und in einen Zelltrichter gegeben. Durch die anschließende Zentrifugation für fünf Minuten bei 320 g und 4°C in einer Zytocentrifuge wurden die in der Probe befindlichen Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Präparate über Nacht an der Luft getrocknet und am nächsten Tag mit einer Diff-Quick-Lösung angefärbt. Die anschließende Differenzierung der Zellen erfolgte anhand morphologischer Kriterien und lichtmikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung.

## **2.6 Lungenhistologie**

### **2.6.1 Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie**

Nach der Tötung der Tiere wurde die Trachea freigelegt und durch einen kleinen Schnitt eine Trachealkanüle (1.0 mm) eingeführt. Die Kanüle wurde mit einem reißfesten Garn befestigt und inklusive der Trachea und der Lunge aus der Maus entnommen. Um die Lungen der Versuchstiere miteinander vergleichen zu können, wurden diese unter standardisierten Bedingungen mit 4%iger Formaldehydlösung für 20 Minuten entfaltet. Dafür wurden sie über einen Plastikschauch an ein Fixativ befestigt und mit einem konstanten Druck von 20 cm Wassersäule belastet. Anschließend wurden die Lungen mit einem Garn abgebunden und über Nacht in 4%iger Formaldehydlösung gelagert. Die Einbettung in 2%igem Agar erfolgte am

nächsten Tag. Die fixierten und in Agar eingebetteten Lungen wurden um der Anisotropie des Atemwegsbaumes Rechnung zu tragen mittels Orientator<sup>67</sup> bzgl. ihrer Ausrichtung randomisiert. Dann wurden 2 mm dicke Organschnitte hergestellt, welche hinterher im Autotechnikon entwässert und in Paraffin eingebettet wurden.

### **2.6.2 Hämatoxilin-Eosin- (HE) und Perjodsäure-Schiff- (PAS) Färbung**

Zur Analyse der Entzündung im Gewebe wurden an einem Mikrotom für die Hämatoxilin-Eosin (HE) sowie die Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS) 3 µm dicke Dünnschnitte von den Paraffinblöcken hergestellt und über Nacht getrocknet. Um zunächst einen Gesamtüberblick über die Morphologie der Lungen und eventuell pathologische Veränderungen zu bekommen, wurde von den Lungen-Dünnschnitten eine HE-Färbung angefertigt. Des Weiteren wurden die Dünnschnitte einer PAS-Färbung unterzogen. Mit Hilfe dieser Färbung lassen sich in den Atemwegen die mukusproduzierenden Becherzellen darstellen. Dabei werden die Glykolgruppen in Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen durch die Reaktion mit Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. In Verbindung mit der Schiffs-Reagenz kommt es zu einer leuchtend-roten Farbreaktion, wodurch sich die Mukusbestandteile in den Becherzellen spezifisch nachweisen lassen. Die hier beschriebene Hämatoxilin-Färbung diente als Gegenfärbung.

Sowohl die HE als auch die PAS-Färbungen in dieser Arbeit wurden in der Pathologie im Forschungszentrum Borstel mit Hilfe eines Färberoboters durchgeführt. Die getrockneten Schnitte wurden anschließend mit einem Eindeckmedium (Entellan) auf Xylolbasis und Deckgläsern (24 mm x 60 mm) eingedeckelt und am Mikroskop mit der Olympus cell<sup>^</sup>A Software analysiert.

### **2.6.3 Immunhistochemie (IHC)**

Um die α-MSH- und MC5R- positiven Zellen im Lungengewebe und in der BAL sichtbar zu machen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Dafür wurden zunächst 3 µm dicke Schnitte von den standardentfalteten Lungen mit einem Mikrotom angefertigt und in Färbeküvetten entparaffiniert (2 x 12 Minuten Xylol, 2 x Ethanol 100%). Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit

einem Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gemisch (200 ml Methanol auf 6 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 Minuten inaktiviert. Nach einmaligem Spülen der Lungenschnitte mit destilliertem Wasser erfolgte die Vorbehandlung mit Citratpuffer im Dampfgarer oder mit einer Pronase-Lösung (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorbehandlung der Lungenschnitte und BAL-Zellen für die immunhistochemische Färbung

	Lungenschnitte	BAL-Zellen
<b>α-MSH</b>	1 mg/ml Pronase, 2 Minuten bei RT	-
<b>MC5R</b>	Citratpuffer (0,01M, pH6), 20 Minuten kochen im Dampfgarer	-

Im Gegensatz zu den Gewebeschnitten erfolgte die Fixierung der BAL-Zellen mittels Aceton bei 4°C für 20 Minuten. Für die Färbung von α-MSH wurden die BAL-Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,25% Triton-X-100 behandelt. Anschließend erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit einem Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gemisch für 30 Minuten.

Nach der Vorbehandlung bzw. Blockade wurden die Lungenschnitte und BAL-Zellen mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült und für die weiteren Schritte auf Coverplates überführt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit PBS, Ziegen Serum (1:10) und 2% Milchpulver. Im Anschluss wurde der in PBS mit 2% Milchpulver gelöste primäre Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 (α-MSH) beziehungsweise 1:200 (MC5R) auf die Coverplates gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Bei der technischen Kontrolle wurde kein primärer Antikörper verwendet. Nach 5-minütigem Spülen mit PBS wurden die Schnitte mit einem biotinylierten sekundären Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege bei RT für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden ein weiteres Mal mit PBS gespült, bevor der ABC-Komplex zugegeben und für 30 Minuten inkubiert wurde. Nach einem Waschschrift mit PBS konnten die gebundenen Antikörper durch die Zugabe und 10-minütige Inkubation des Substrates 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (200 mg DAB auf 200 ml Tris/HCl + 100 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sichtbar gemacht werden. Danach wurden die Schnitte bzw. BAL-Zellen mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült, abschließend für die Gegenfärbung einige Male in Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung) getaucht und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden nach kurzem Spülen

mit Aqua dest. über eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 5 Minuten Ethanol 70%, 5 Minuten Ethanol 96%, 2 x 5 Minuten Ethanol 100%) dehydriert und mit Entellan eingedeckt. Anschließend wurden die Färbungen am Mikroskop mit Hilfe der Olympus cell<sup>A</sup> Software analysiert.

## 2.7 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen

### 2.7.1 Cytometric Bead Array (CBA)

Zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Entzündungsprozesse wurde die Konzentration verschiedener Zytokine und Chemokine in den murinen BALF-Proben mittels Cytometric Bead Array (CBA)-Technik bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, aus einem sehr geringen Probenvolumen mehrere in einer Probe vorhandene Zytokine gleichzeitig zu messen. Für die Messung der Zytokine IL-17A, TNF- $\alpha$  und KC wurden kommerziell erhältliche CBA Flex Sets sowie CBA enhanced sensitivity Flex Sets verwendet. Der Vorteil der enhanced sensitivity Kits ist, dass hier schon sehr geringe Zytokinkonzentrationen gemessen werden können. Die verwendeten Proben wurden unverdünnt eingesetzt und die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der CBA ist eine Methode, bei der verschiedene Latexbeads mit unterschiedlicher Größe eingesetzt werden. Jeder dieser Beads ist mit Primärantikörpern beschichtet, an den ein bestimmtes lösliches Antigen (Zytokin) in der Probe spezifisch binden kann. Anschließend bindet ein weiterer Antikörper, welcher mit einem Phycoerythrin (PE) Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, an die Oberfläche der Latexbeads. Bei Anregung mit einem Laser (488 nm) zeigen die Beads eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität, aus der mit Hilfe von Standards die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine bestimmt werden kann.

Als Zytokinstandards wurden folgende Verdünnungen verwendet:

**Standard CBA Flex Set:** 0 pg/ml, 10 pg/ml, 20 pg/ml, 40 pg/ml, 80 pg/ml, 156 pg/ml, 312,5 pg/ml, 625 pg/ml und 1250 pg/ml.

**Standard CBA enhanced sensitivity Flex Set:** 0 fg/ml, 274 fg/ml, 823 fg/ml, 2469 fg/ml, 7407 fg/ml, 22222 fg/ml, 66667 fg/ml und 200000 fg/ml.

Die Messung wurde mittels BD Accuri™ C6 Software am BD Accuri C6 durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit Hilfe der FCAP Array™v3.0.1 Software.

### **2.7.2 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) / Enzyme Immuno Assay EIA)**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von  $\alpha$ -MSH und Eotaxin-1 in murinen BALF Proben mittels EIA/ELISA gemessen. Für die Messung von  $\alpha$ -MSH und Eotaxin-1 wurden käuflich erwerbliche Kits von der Firma Abcam und Phoenix Pharmaceuticals verwendet. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt und die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Methode dient zum Nachweis einer Antikörper-Antigen Wechselwirkung sowie zur quantitativen Bestimmung, bei der Enzyme zur Markierung verwendet werden. Nach Auftragen der Proben und Standards auf die mit dem spezifischen Antikörper gecoatete Platte kommt es zur Bindung zwischen dem gesuchten Antigen und dem Antikörper. Es folgt die Inkubation mit einem zweiten enzymgekoppelten antigenspezifischen Antikörper oder Peptid. Die Quantifizierung der enthaltenen Antigene erfolgte nach der Zugabe des Substrates TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), welches durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) umgesetzt wird, durch die Intensität der Farbreaktion. Das Hinzufügen einer Stopplösung ( $H_2SO_4$ , Schwefelsäure) bewirkt einen Farbumschlag von blau nach gelb, der bei 250 nm in einem Absorptionsphotometer gemessen wird. Als Standards wurden folgende Verdünnungen verwendet:

**Standard Eotaxin ELISA:** 0 pg/ml, 1,02 pg/ml, 2,56 pg/ml, 6,4 pg/ml, 16 pg/ml 40 pg/ml 100 pg/ml

**Standard  $\alpha$ -MSH EIA:** 0 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Photometersoftware Magellan 7.1.

## **2.8 Herstellung von Lungenhomogenat**

Zur Messung der Expression von Zytokinen und Chemokinen im Lungengewebe wurden die schockgefrorenen Lungen (2.4.4) unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im

Mörser zu Pulver verarbeitet. Im Anschluss wurden je 15-20 mg Lungenpulver abgewogen und in 1 ml TriReagent lysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Lysat bei -80°C gelagert.

## **2.9 Herstellung einer Lungenzellsuspension**

Bei Atemwegsentzündungen kommt es zur Einwanderung von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten in die Lunge. In der vorliegenden Arbeit wurde der mögliche Einfluss der Lymphozyten auf die Entzündung näher untersucht. Dafür wurden die Lungen nach der Perfusion (siehe 2.4.3) aus dem Thorax der Tiere genommen, in eiskaltem PBS gewaschen und im Anschluss mit einer Schere in ca. 3x3 mm große Stücke zerschnitten. Die Lungen-Stücke wurden in einen mit Medium befüllten Zell-Schredder gegeben und für vier Minuten mittels DAKO Medimaschine durch ein Stahlnetz mit 35 µm Porengröße gerieben. Dafür wurde folgendes Zellkulturmedium verwendet:

### **Kulturmedium für BMDCs und Lymphzyten:**

- 10% FCS (Fötales Kälberserum)
- 1% L-Glutamin-Lösung
- 1% Natriumpyruvat
- 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)-Lösung
- 50 µM β-Mercaptoethanol

Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension entnommen, mit eiskaltem PBS gespült und auf Eis gelagert.

## **2.10 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz und Lymphknoten**

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden Milz und Lymphknoten in ein mit eiskaltem Zellkulturmedium (siehe 2.9.) benetztes Zellsieb (40 µm) gelegt. Damit sich die Zellen aus dem Gewebeverband lösen, wurden die Organe mit dem Stempel einer 1 ml Spritze vorsichtig durch ein Sieb mit einer Nylonmembran gedrückt. Das

Nylonsieb wurde anschließend mit kaltem Medium gespült und die entstandende Einzelzellsuspension in 4 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.11 Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation**

Die aus festem Gewebe hergestellte Zellsuspension enthält neben den Leukozyten auch verschiedene Strukturzellen. Um die Leukozyten aus der Einzelzellsuspension, welche aus der Lunge (2.9.) bzw. aus Milz und Lymphknoten (2.10.) hergestellt wurde, zu separieren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Als Separationsmittel wurde Lympholyte-M mit einer Dichte von  $1.088 \text{ g/cm}^3$  verwendet. Dafür wurde in ein 15 ml Facon ein Volumen Lympholyte-M vorgelegt und anschließend vorsichtig mit der Einzelzellsuspension überschichtet. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 1200 g ungebremst bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die mononukleären Zellen, darunter Lymphozyten, Makrophagen und z.T. Granulozyten akkumulieren aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Interphase zwischen dem Trennmittel und dem Medium. Diese Interphase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Danach wurden die Zellen bei 300 g für 10 Minuten und  $4^\circ\text{C}$  durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS vom Medium befreit. Die Leukozytenkonzentration wurde im Anschluss mit Hilfe eines automatischen Zählsystems bestimmt und die entstandende Zellsuspension danach bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **2.12 Aufreinigung naiver $\text{CD4}^+/\text{CD62L}^+$ T-Zellen mittels Magnet-Bead-Separation**

Die Aufreinigung von naiven  $\text{CD4}^+/\text{CD62L}^+$  T-Zellen aus einer Leukozytensuspension erfolgte mittels antikörperbeschichteter Magnetbeads. Dabei binden die Magnetbeads an spezifische Oberflächenstrukturen der Zellen. Nach der Bindung können diese dann mittels Magnetfeld aus der Zellsuspension separiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dafür ein T-Zell-Separations Kit verwendet, welches nach Herstellerangaben genutzt wurde.

Zunächst wurde die Leukozytenzellsuspension bei 300 g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl pro  $1 \times 10^8$  Zellen eiskaltem MACS-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA) resuspendiert. Zusätzlich wurden auf je  $1 \times 10^8$  Zellen 100 µl von dem CD4<sup>+</sup> T-Zell-Biotin-Antikörper-Cocktail gegeben. Die Zellsuspension wurde durch vorsichtiges Schnippen gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden weitere 300 µl MACS Puffer sowie 200 µl Anti-Biotin Magnetbeads je  $1 \times 10^8$  Zellen auf die Probe gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml MACS Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Die Probe wurde dann bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Negativ-Selektion wurden je  $1 \times 10^8$  der gelabelten Zellen in 1000 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine Säule der Größe LS gegeben, welche an einem Magneten befestigt war. Die CD4-positiven Zellen wurden aufgefangen und nach dreimaligem Spülen mit 3 ml MACS-Puffer in einem 15 ml Falcon gesammelt. Die CD4-negativen Zellen verblieben in der Säule und konnten verworfen werden. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS (Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 Minuten) wurde die Zellkonzentration mittels Countess bestimmt. Im Anschluss wurden die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ein weiteres Mal bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und danach in 800 µl eiskaltem MACS-Puffer je  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert. Für die Positiv-Selektion wurden auf je  $1 \times 10^8$  Zellen 200 µl CD62<sup>+</sup> Magnetbeads gegeben. Nach vorsichtigem Mischen der Zellsuspension erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten auf Eis. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskaltem MACS-Puffer gestoppt. Die Probe wurde bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 500 µl MACS Puffer resuspendiert. Die gelabelten Zellen wurden auf eine Säule der Größe MS gegeben, welche ebenfalls an einem Magneten befestigt war. Dabei wurde die Negativ-Fraktion (CD62<sup>-</sup>) in einem 15 ml Falcon gesammelt, die Positiv-Fraktion (CD62<sup>+</sup>) verblieb in der Säule. Es folgt ein dreimaliges Waschen der Säule mit je 0,5 ml eiskaltem MACS Puffer. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde die Säule mit den CD62<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus dem Magnetfeld genommen, auf ein neues 15 ml Falcon gesetzt und mit 1 ml MACS-Puffer versetzt. Mit Hilfe eines Stempels wurde der Puffer vorsichtig durch die Säule gedrückt, wobei sich die CD4<sup>+</sup>/CD62<sup>+</sup> Zellen aus der Säule gelöst haben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und nach einmaligem Waschschrift und

Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 Minuten die Zellkonzentration mittels Countess bestimmt. Die CD4<sup>+</sup>/CD62<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.13 Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark**

Die gewonnenen Zellen aus dem Knochenmark (2.4.6.) wurden bei 350 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS in 15 ml Kulturmedium (Herstellung siehe 2.9.) aufgenommen und in einer T75er Kulturflasche kultiviert. Für die Reifung der dendritischen Zellen wurde zusätzlich 20 ng/ml murines recombinantes GM-CSF zugegeben. An Tag 4 wurden die Zellen erneut mit 5 ml frischem Medium und 20 ng/ml GM-CSF versetzt. Nach weiteren drei Tagen erfolgte die Ernte der gereiften dendritischen Zellen. Durch zweimaliges Waschen und zentrifugieren (300 g bei 4 °C für 5 Minuten) wurden sie von dem Medium befreit. Adhärente Zellen wurden durch Zugabe und 5-minütige Inkubation einer Accutase-Lösung vom Boden der Kulturflasche gelöst, mit PBS gespült und anschließend geerntet. Im Anschluss wurde die Zellkonzentration mit Hilfe der Countess bestimmt, die Zellen wurden zentrifugiert (350 g bei 4°C für 5 Minuten), in Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **2.14 Differenzierung von OVA-spezifischen Th17 Zellen**

Für die Differenzierung OVA-spezifischer Th17 Zellen wurden die aufgereinigten CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> T-Lymphozyten (2.12.) bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und in Medium auf 6x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte in einer 24-well Flachbodenplatte, in die zuvor unter Zugabe von 5 µg/ml OVA<sub>323-339</sub>-Peptid, 1x10<sup>4</sup> ausgereifte dendritische Zellen pro Well in Kulturmedium ausgesät wurden. Im Anschluss wurden je 6x10<sup>6</sup> der CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu den aktivierten BMDCs in die 24-Well Flachbodenplatte gegeben.

Die Differenzierung erfolgte durch die Zugabe von folgenden Wachstumsfaktoren und neutralisierenden Antikörpern ( Tabelle 3).

Tabelle 3: Zytokine und Antikörper für die Differenzierung von Th17 Zellen

Zytokin/Antikörper	Eingesetzte Konzentration
Rekombinantes humanes TGF- $\beta$	5 ng/ml
Rekombinantes Maus IL-6	20 ng/ml
Rekombinantes Maus IL-23	20 ng/ml
Anti-Maus IFN- $\gamma$	10 $\mu$ g/ml
Anti-Maus IL-4	10 $\mu$ g/ml

Die Zellen wurden für 6 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am Tag 6 erfolgte das Ernten der Zellen. Nachdem die Zellkonzentration mittels Countess bestimmt wurde, wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.15 Transfektion von primären OVA-spezifischen Th17 Zellen

Die für die Transfektion der Th17 Zellen mit ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNAs und Desoxyribozymen (DNAzymen) verwendete Methode basiert auf der Elektroporation. Bei dieser Methode wird die Zellmembran kurzzeitig durch einen elektrischen Impuls permeabel gemacht und so verändert, dass Desoxyribonukleinsäure (DNA) beziehungsweise Ribonukleinsäure (RNA) in lebende Zellen eingeschleust werden kann. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Amaxa® Mouse T Cell Nucleofactor Kits und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden je  $1 \times 10^6$  Th17 Zellen 5 Minuten bei 350 g abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Nucleofactor Solution resuspendiert. Anschließend wurde das spezifische DNAzym/die siRNA zugegeben. Die Transfektion erfolgte mit dem Programm X-01 im Nucleofactor I. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen in 500  $\mu$ l Kulturmedium aufgenommen, in eine mit 1 ml vorgewärmten Kulturmedium 24-Well Flachbodenplatte überführt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Hälfte der inkubierten Zellen geerntet, mit eiskaltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 350 g bei 4°C für 5 Minuten) und für die RNA-Isolierung in 350  $\mu$ l RPL-Puffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die restlichen Zellen ebenfalls geerntet, gewaschen und in RPL-Puffer resuspendiert. Bis zur RNA-Isolierung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Messung der Transfektionseffizienz erfolgte 48h nach der Transfektion.

### 2.15.1 Transfektion von Th17 Zellen mit RORyt-spezifischen DNAzymen

Zunächst wurden die *in-vitro* generierten OVA-spezifischen Th17 Zellen mit RORyt-spezifischen DNAzymen transfiziert. Dafür wurde zu den Zellen 500 pmol der generierten RORyt-spezifischen DNAzyme von der Firma MWG Eurofins gegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Kontroll-Oligodesoxynukleotid (dODN) verwendet, welches unspezifische Bindungsarme aufweist und daher die murine mRNA nicht spalten kann. Die Messung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe eines Kontroll-DNAzyms, dessen 5'Ende mit Fluorescein (FAM) markiert war.

Für die Transfektion wurden die in Tabelle 4 aufgeführten DNAzyme verwendet.

Tabelle 4: Sequenzen der für die Transfektion generierten DNAzyme

DNAzym	Primersequenz (5' → 3')
FAM-dODN	FAM-TGTGACGTAGGCTAGCTACAACGACAGATGGCA
dODN	TGTGACGTAGGCTAGCTACAACGACAGATGGCA
dRORyt37	GCTCTCCCAGCAACATCGATCGGAGTGTCT
dRORyt104	CACAGCTGGAGCAACATCGATCGGAGTGGAGGT
dRORyt112	GACAGCACAGGCTAGCTACAACGAAGCTGGCAG
dRORyt114	AGGACAGCAGGCTAGCTACAACGAACAGCTGGC
dRORyt115	CCAGGACAGAGCAACATCGATCGGACACAGCTG
dRORyt119	AGCCCAGGAGGCTAGCTACAACGAAGCACACAG
dRORyt123	AGGGTAGCCAGCAACATCGATCGGAGGACAGCA
dRORyt128	TCAGTAGGGAGCAACATCGATCGGAGCCCAGGA
dRORyt133	CCTCCTCAGAGCAACATCGATCGGAGGGTAGCC
dRORyt136	TGTCCTCCTAGCAACATCGATCGGAGTAGGGTA
dRORyt156	GACTGAGAAGGCTAGCTACAACGATTGGCTCCC
dRORyt163	TTTCATGAGGCTAGCTACAACGATGAGAACTT
dRORyt166	GTGTTCTCAGGCTAGCTACAACGAGACTGAGAA

### 2.15.2 Transfektion von Th17 Zellen mit RORyt-spezifischen siRNA

Als nächstes wurden die Th17 Zellen mit RORyt-spezifischen siRNAs transfiziert. Dafür wurden 300 pmol der jeweiligen siRNA zu den Zellen gegeben. Bei den verwendeten RORyt-spezifischen siRNAs handelte es sich um generierte Stealth RNAi<sup>TM</sup> siRNAs von der Firma Life Technologies (Tabelle 5). Daneben wurde als Kontroll-siRNA eine Negativkontrolle mit mittlerem GC-Gehalt von der Firma Ambion/Lifetechnologies

gewählt, die keine Homologie zu der murinen RNA aufweist. Für die Messung der Transfektionseffizienz wurde eine unspezifische Alexa555-markierte siRNA verwendet.

Tabelle 5: Sequenzen der für die Transfektion generierten Stealth RNAi™ siRNAs

siRNA	Primersequenz (5' → 3')
RORyt400	GCUGUCAAGUUUGGCCGAAUGUCCA UGGACAUUCGGCCAAACUUGACAGC
RORyt40	GGGAGAGCUUUGUGCAGAUCUAAGG CCUUAGAUCUGCACAAAGCUCUCCC
RORyt44	GAGCUUUGUGCAGAUCUAAGGGCUG CAGCCCUUAGAUCUGCACAAAGCUC

## 2.16 Kurzzeitstimulation der mononukleären Zell- (MNC) Kultur

Zur Restimulierung der gewonnenen Einzellzellsuspension aus der Lunge wurden diese nach Dichtegradienten-Zentrifugation (2.11.) in eine 24-Well Zellkulturplatte gegeben. Die Zellen wurden anschließend mit 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 100 ng/ml Ionomycin stimuliert und für vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Um die Sekretion der Zytokine aus der Zelle zu verhindern, wurde der Proteintransport nach einer Stunde Inkubationszeit mittels 1 µl/Well GolgiPlug blockiert.

## 2.17 Durchflusszytometrische Analysen

### 2.17.1 Messung der Transfektionseffizienz

Für die Messung der Transfektionseffizienz wurden die mit dem fluoreszenz-markierten Kontroll-DNAzym beziehungsweise mit der fluoreszenz-markierten Kontroll-siRNA transfizierten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion vorsichtig aus der 24-well Flachbodenplatte gespült, mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Zur Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (kurz FACS, Fluorescence-activated cell sorter) wurden das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer (PBS, 3% FCS, 0,1% NaN<sub>3</sub>) aufgenommen und am Accuri C6 mittels Accuri C6 Software analysiert. Ausgewertet wurde anschließend mit Hilfe der FCS Express 4 Flow Software.

Dafür wurde die Lymphozytenpopulation im Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) gegatet und in einem Histogramm die Fluoreszenzintensität des fluoreszenzmarkierten DNAzyms beziehungsweise der markierten siRNA dargestellt.

### **2.17.2 Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern auf murinen Zellen**

Für die Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Lunge wurden die Zellen nach Restimulierung (2.16.) aus den Vertiefungen der 24-Well Flachbodenplatte gespült und die Zellkonzentration mittels Countess bestimmt. Danach wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in FACS Röhrchen überführt und mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen, bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper an die auf Makrophagen vorhandenen Fc-Rezeptoren zu unterbinden, wurde den Proben ein Fc-Block-Antikörper (*CD16/CD32*) zugesetzt (1 µl/ $1 \times 10^6$  Zellen). Die Proben wurden für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor jeweils 1 µl CD4-FITC Antikörper pro  $1 \times 10^6$  Zellen zum Ansatz hinzugegeben wurde. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C unter Lichtausschluss. Durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen anschließend gewaschen, zentrifugiert und bis zur intrazellulären Färbung auf Eis gelagert.

### **2.17.3 Intrazelluläre FACS-Färbung**

Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde das Zellpellet in 250 µl Cytofix resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben mit 750 µl Perm/Wash-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml Perm/Wash-Lösung. Nach Zugabe von 50 µl Perm/Wash-Puffer und 0,5 µl des IL-17A-PE Antikörpers für die intrazelluläre Färbung folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 4 °C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen erneut mit 1 ml Perm/Wash-Puffer gewaschen und bei 350 g für 8 Minuten und 4°C zentrifugiert. Die anschließende Messung erfolgte am Accuri C6, die Auswertung wurde mittels Accuri C6 Software durchgeführt.

### **2.18 RNA-Aufreinigung**

Um die Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen in Geweben und Einzelzellsuspensionen messen zu können, wurde die Isolierung und Aufreinigung der mRNA aus Gewebe mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und für Einzelzellsuspensionen das RNeasy Micro Kits der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss wurde der RNA-Gehalt und die Reinheit der Proben mit einem Nanophotometer bestimmt.

### **2.19 Reverse Transkription**

Die Umschreibung der isolierten Gesamt-„messenger“ RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels reverser Transkription. Der vollständige Reaktionsansatz bestand dabei neben einer Reversen Transkriptase, welche in Form von 2 µl Enzym-Mix zugegeben wurde, aus 4 µl Reaktionsmix, bestehend aus Reaktionspuffer, Primern und Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs). Für die Umschreibung von isolierter mRNA aus Einzelzellsuspensionen wurde 100 ng mRNA zugegeben. Bei Gewebeproben wurde 500 ng mRNA eingesetzt. Zuletzt wurde der Ansatz noch mit RNase- und DNase-freiem, destilliertem Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde dann für 10 Minuten bei 25°C und danach weitere 15 Minuten bei 50°C in einem Thermocycler inkubiert. Durch eine abschließende Inkubation für fünf Minuten bei 80°C wurde das Enzym inaktiviert und die Reaktion abgestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.20 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die umgeschriebene cDNA diente als Basis für die Quantifizierung der relativen Expression von verschiedenen Interleukinen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Hierfür wurde der LightCycler 480 II verwendet. Zunächst wurde die umgeschriebene cDNA 1:10 (bei cDNA aus Einzelzellsuspensionen) bzw. 1:25 (bei cDNA aus Gewebe) mit DEPC Wasser verdünnt. In einem Reaktionsgefäß wurden pro Probe 5 µl 2-fach SYBR Green Master Mix, 1,5 µl DEPC Wasser sowie je 0,5 µl des spezifischen forward bzw. reversen Primers gemischt und zusammen mit 2,5 µl der verdünnten cDNA in

eine 96-Well-Lightcycler-Platte pipettiert und anschließend in der PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde statt der cDNA-Probe 2,5 µl DEPC Wasser verwendet. Nach einer 10-minütigen Denaturierungsphase bei 94°C, erfolgte die Analyse in 45 Amplifikationszyklen. Um in den ersten Zyklen eine hohe Spezifität der Primer-Bindung an das Template zu erreichen, wurde ein „Touchdown“-Protokoll angewendet. Dabei startete der erste Zyklus mit einer Annealingtemperatur von 63 °C. Dieser wurde dann nach jedem Zyklus um 0,5°C bis zu einer Temperatur von 58°C herabgesetzt, was eine hohe Amplifikationsrate zur Folge hatte. Die Zyklen endeten jeweils mit einer Elongationsphase von 72°C. Für die Auswertung wurde das Verhältnis des gesuchten Gens zum Referenzgen „*ribosomal protein L32*“ (RPL-32) bestimmt. Die in der Real-time PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Sequenzen der in der Real-time-PCR eingesetzten Primer

Zielgen	Primername	Primersequenz (5'-3')
<b>RORyt</b>	RORyt_for	GGAGCCAAGTTCTCAGTCAT
	RORyt_rev	AGGTGATAACCCCGTAGTGGA
<b>IL-23R</b>	IL-23R_for	ACAACAACAAACCAAACGTGGAGTG
	IL-23R_rev	TGGGAAACTGTCTGGGAAGTTTGGT
<b>IL-17A</b>	IL-17A_for	TGTGAAGGTCAACCTCAAAGTCT
	IL-17A_rev	GAGGGATATCTATCAGGGTCTTCAT
<b>IL-17F</b>	IL-17F_for	TGAGGGAGGTAGCAGCTCGGA
	IL-17F_rev	GGTGGGGGTCTCGAGTGATGTTGT
<b>MC1R</b>	MC1R_for	GCTGGACTGAGATTGGAAGC
	MC1R_rev	TGGGTGAGATCTGTCTCTG
<b>MC2R</b>	MC2R_for	GAGCTGAAGCCAGCAAGC
	MC2R_rev	GGATCTGGCTTAGAAGGG
<b>MC3R</b>	MC3R_for	ATGATCGCCGTGATCAACAG
	MC3R_rev	ATCATAGAGTCGAAGATATTATCCATGTG
<b>MC4R</b>	MC4R_for	AAGCTGCCAGATACAACCTATGA
	MC4R_rev	ACGCGCTCCAGTACCATAACA
<b>MC5R</b>	MC5R_for	AGAGCAGAATGGTAAATCCGATGCC
	MC5R_rev	CAGCATGTCCGCCACGGCTA
<b>IL-21</b>	IL-21_for	AGCTCCACAAGATGTAAAGGGGCA
	IL-21_rev	TCTCATACGAATCACAGGAAGGGCA
<b>TNF-α</b>	TNF-α_for	TCGTAGCAAACCAAGTG
	TNF-α_rev	AGATAGCAAATCGGCTGACG
<b>RPL-32</b>	RPL-32_for	AAAATTAAGCGAAACTGGCG
	RPL-32_rev	ATTGTGGACCAGGAACTTGC

## 2.21 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte erfolgte im Agarosegel. Dafür wurden zunächst 1,5 g Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE; 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA) Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l Ethidiumbromid wurde das flüssige Gel zum Aushärten in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Anschließend wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und der Kamm entfernt. Zusammen mit 2  $\mu$ l 6x DNA Loading Dye wurden je 8  $\mu$ l der PCR-Produkte neben einem 50 Basenpaar (bp)-Größenmarker in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung von 90 Volt für 35 Minuten wurde das Agarose-Gel in einer Gel-Dokumentationsstation unter UV-Licht abfotografiert.

## 2.22 Statistik

Die graphische Darstellung sowie die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 4 Software und Microsoft Excel. Sämtliche Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurden mittels Student's t-test überprüft. Bei mehr als zwei miteinander zu vergleichenden Proben wurde die statistische Auswertung mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Immunpathogenese des Asthma bronchiale

##### 3.1.1 Die Produktion von $\alpha$ -MSH ist beim experimentellen Asthma bronchiale erhöht

Zunächst wurde überprüft, ob  $\alpha$ -MSH in der Lunge von gesunden und / oder experimentell asthmatischen Mäusen produziert wird. Dafür wurden die  $\alpha$ -MSH Protein-Level in der BALF von Mäusen mit akutem und chronisch experimentellem Asthma sowie von gesunden (PBS) Mäusen bestimmt. Interessanterweise war in der PBS-Kontrollgruppe nur eine sehr geringe  $\alpha$ -MSH Konzentration in der BALF detektierbar (3,2 pg/ml  $\pm$  3,2 pg/ml). Nach akuter und auch nach chronischer Allergenexposition kam es zu einem signifikanten Anstieg der  $\alpha$ -MSH Konzentration. Während in der Gruppe mit akutem Asthma eine Konzentration von 52,6 pg/ml  $\pm$  6,0 pg/ml nachgewiesen werden konnte, zeigten die Tiere aus der Gruppe mit chronischem Asthma  $\alpha$ -MSH Level von 156 pg/ml  $\pm$  11 pg/ml (Abbildung 9).

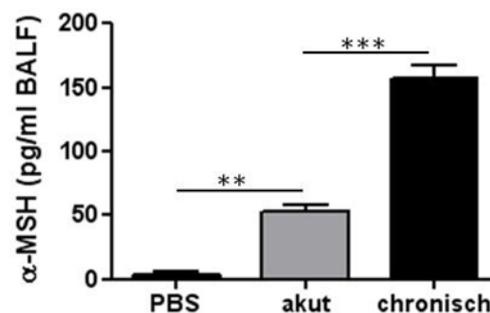


Abbildung 9:  $\alpha$ -MSH Level in der Broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von gesunden Mäusen (PBS) und Mäusen mit akutem und chronischem Asthma. Die  $\alpha$ -MSH Level wurden wie in 2.7.2. beschrieben mittels ELISA bestimmt (n=5-7). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Um im Anschluss zu untersuchen, welche Zellen in der Lunge an der  $\alpha$ -MSH Produktion beteiligt sind, wurden Paraffinschnitte von Mäuselungen mit akutem und chronischem Asthma sowie von Mäuselungen der PBS-Gruppe immunhistologisch gegen  $\alpha$ -MSH gefärbt (2.6.3.). Abbildung 10 zeigt, dass  $\alpha$ -MSH insbesondere vom Atemwegsepithel produziert wird. Nach akuter sowie chronischer Allergenexposition war auch hier eine vermehrte  $\alpha$ -MSH Produktion zu beobachten. Entgegen unseren Erwartungen zeigte auch die IHC-Kontrolle eine leichte Färbung, die jedoch im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe deutlich schwächer ausfiel.

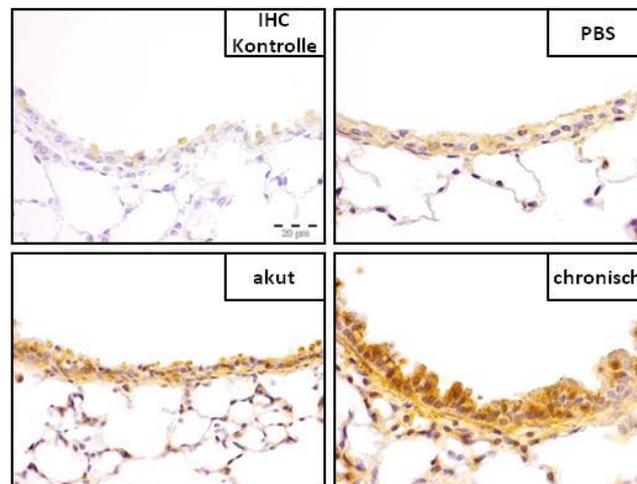


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -MSH in gesunden Mäusen (PBS) sowie Mäusen mit akutem und chronisch experimentellem Asthma. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen gegen  $\alpha$ -MSH von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Atemwegsschnitten. Die IHC-Kontrolle dient als technische Kontrolle.

Durch die immunhistochemische Färbung gegen  $\alpha$ -MSH von BAL Zellen von Mäusen mit experimentellem Asthma konnte überprüft werden, welche der infiltrierenden Zellen dieses Peptidhormon aus dem Vorläuferhormon POMC bilden. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der  $\alpha$ -MSH Produktion vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten eine Rolle spielen (Abbildung 11).

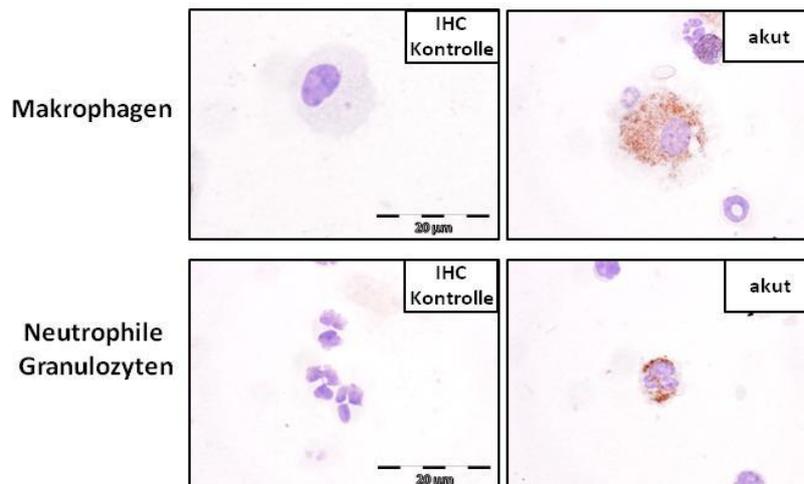


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -MSH in der Broncho-alveolären Lavage von Mäusen mit akutem experimentellem Asthma. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen gegen  $\alpha$ -MSH von fixierten BAL-Zellen. Die IHC-Kontrolle dient als technische Kontrolle.

### 3.1.2 $\alpha$ -MSH vermindert das experimentelle Asthma in der Maus

In den oben dargestellten Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in der murinen Lunge umso mehr  $\alpha$ -MSH produziert wird, je länger die allergische Atemwegsentzündung anhält. Nachfolgend sollte geprüft werden, welche *in-vivo* Effekte das  $\alpha$ -MSH im Kontext der allergischen Atemwegsentzündung vermittelt und ob es innerhalb der Immunpathogenese des allergischen Asthmas therapeutisch nutzbar gemacht werden könnte. Die Wirkung des  $\alpha$ -MSHs auf eine bereits bestehende allergische Atemwegsentzündung wurde in einem etablierten Mausmodell für das akute experimentelle Asthma untersucht. Dafür wurden weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wie in Protokoll 2.2.1. beschrieben gegen das Modellallergen OVA sensibilisiert und anschließend inhalativ mit einem OVA-Aerosol provoziert. Jeweils eine Stunde vor der OVA-Aerosol-Provokation wurden 100  $\mu$ l des  $\alpha$ -MSHs in einer Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht intratracheal (i.t.) appliziert. 24 Stunden nach der letzten OVA Challenge erfolgte die Analyse. Die Lungen der Versuchstiere wurden anschließend anhand verschiedener Aspekte auf eine allergische Atemwegsentzündung hin analysiert. Dazu wurde neben der Messung der Lungenfunktion, die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht sowie die Lungenhistologie analysiert.

Als erstes wurde am anästhesierten Tier die Atemwegsreagibilität gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin mittels invasiver Lungenfunktionsbestimmung bestimmt. Die Untersuchung zeigte, dass die Tiere aus der Asthmagruppe (OVA) bei einer Metacholin-Konzentration von 50 mg/ml mit einer Resistance von  $1,6 \pm 0,4$  cmH<sub>2</sub>O/l/s eine signifikant erhöhte Atemwegsreagibilität im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (PBS) mit  $0,7 \pm 0,1$  cmH<sub>2</sub>O/l/s aufwiesen. Die Gruppe, die mit  $\alpha$ -MSH behandelt wurde ( $\alpha$ -MSH) zeigte im Vergleich zur OVA-Gruppe eine deutlich, aber nicht signifikant verminderte Atemwegsreagibilität (Resistance:  $1,0 \pm 0,1$  cmH<sub>2</sub>O/l/s) (Abbildung 12).

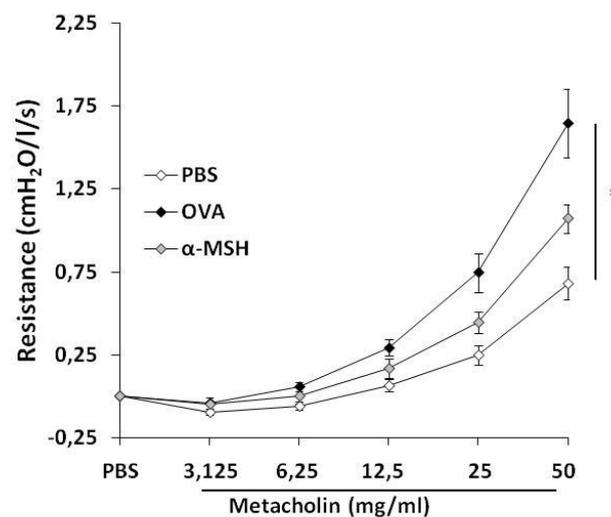


Abbildung 12: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse (n=7-8) wurden wie in 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend lokal mit dem Allergen provoziert. Die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH<sub>2</sub>O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-50 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05). Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

In der BALF der Negativkontrollgruppe (PBS) fanden sich vorwiegend Makrophagen ( $4,1 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ ) und nur wenige Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Während die Analyse in der Asthmakontrollgruppe (OVA) im Vergleich zur PBS-Gruppe einen deutlichen Influx von neutrophilen ( $1,2 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ ) und eosinophilen ( $2,9 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ ) Granulozyten sowie Lymphozyten ( $0,5 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ ) zeigte, war die Anzahl an Makrophagen ( $3,9 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz zur OVA-Gruppe kam es durch die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH zu einer signifikanten Verringerung der Lymphozyten ( $0,1 \times 10^4 \pm 0,03 \times 10^4$ ) und eosinophilen

Granulozyten ( $0,4 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) sowie einer leichten Reduktion der Makrophagen. Eine Veränderung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 13).

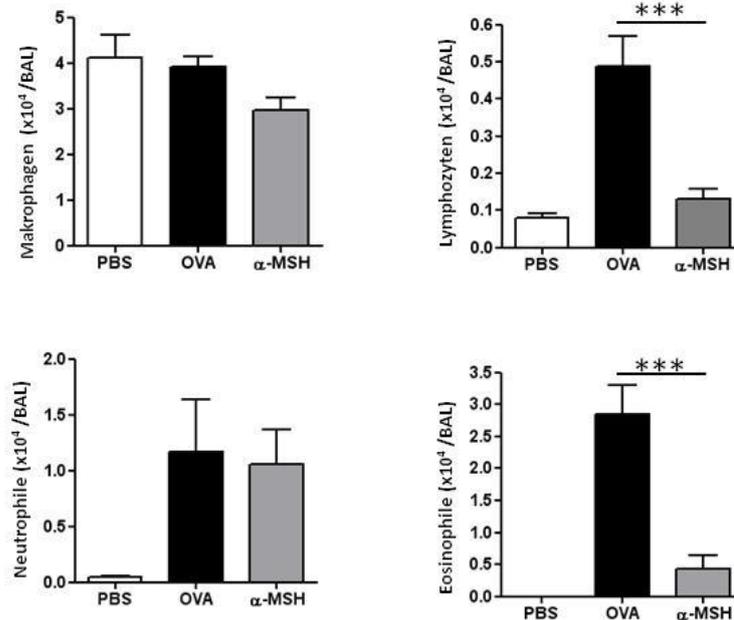


Abbildung 13: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Entzündungszellen in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) von Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

Nach Färbung der lungenhistologischen Präparate mit Hämatoxylin und Eosin (HE) zeigte sich in der OVA-Gruppe eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen vor allem um die Atemwege und die Gefäße. Im Vergleich dazu konnte in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe eine deutlich verminderte Infiltration von Entzündungszellen beobachtet werden. Die PBS-Gruppe war frei von Infiltraten. Zudem konnte mittels PAS-Färbung in der OVA-Gruppe im Gegensatz zur PBS-Kontrollgruppe eine erhöhte Anzahl an Mukus-produzierenden Becherzellen nachgewiesen werden. In der  $\alpha$ -MSH-Gruppe war die Anzahl Mukus-produzierende Zellen im Vergleich zur OVA-Gruppe deutlich reduziert (Abbildung 14).

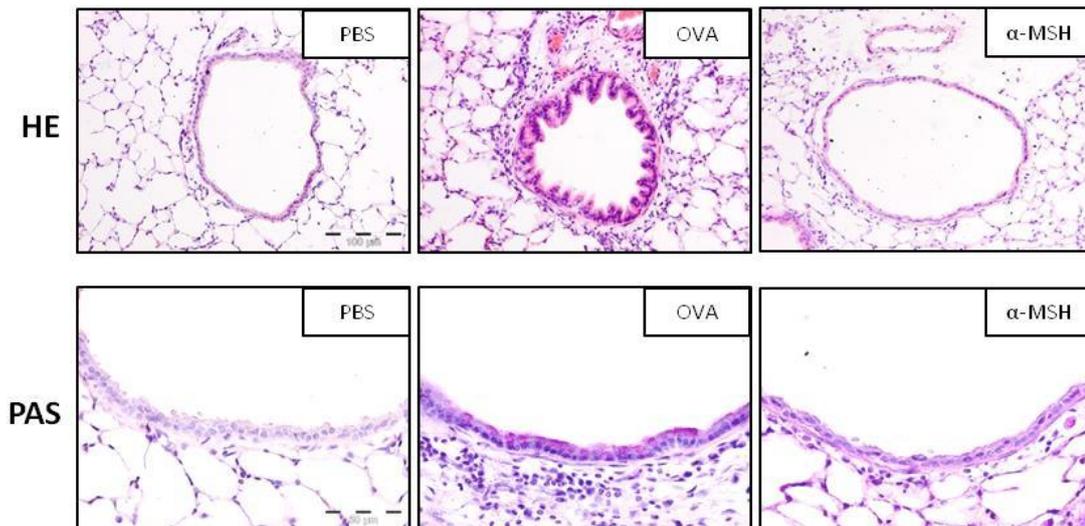


Abbildung 14: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsentzündung und die Mukusproduktion bei Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie in 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet und fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Beurteilung der Lungenmorphologie wurden die Paraffinschnitte mit HE zur Darstellung der Mukus-produzierenden Becherzellen und die Paraffinschnitte mit PAS angefärbt.

### 3.1.3 Die Neutralisierung von $\alpha$ -MSH geht mit einer leichten Verschlimmerung der Atemwegsentzündung in der Maus einher

Da in Punkt 3.1.2. gezeigt werden konnte, dass  $\alpha$ -MSH beim akuten Asthma-Modell anti-inflammatorisch wirkt, sollte in den nächsten Experimenten untersucht werden, ob durch eine Neutralisierung des von der Maus gebildeten  $\alpha$ -MSHs eventuell eine verstärkte Entzündungsreaktion auftritt. Um dies zu untersuchen, wurden weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen gemäß Protokoll 2.2.2. gegen OVA sensibilisiert und anschließend inhalativ provoziert. Die i.p. Applikation von 200  $\mu$ l des polyklonalen  $\alpha$ -MSH Antikörpers erfolgte jeweils 12 Stunden vor der OVA-Aerosol-Challenge in einer Konzentration von 3 mg/kg Körpergewicht. Nach Ende des Protokolls wurde die Atemwegsreagibilität durch Messung der Resistance in den Atemwegen bestimmt und die Entzündungszellen in der BAL sowie die Lungenhistologie näher charakterisiert.

Die Messung der Atemwegsreagibilität wurde zunächst mittels invasiver Lungenfunktionsbestimmung am Buxco Finepoint RC durchgeführt. Während die Provokation mit steigenden Konzentrationen an Metacholin bei der Negativkontrollgruppe (PBS) bei einer Metacholin-Konzentration von 50 mg/ml keine Atemwegshyperreagibilität zeigte (*Resistance*:  $0,9 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O/l/s), war bei der Asthmakontrollgruppe (OVA), die einen unspezifischen Kontroll-Antikörper bekommen hatte, eine Atemwegshyperreagibilität zu beobachten (*Resistance*:  $1,8 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O/l/s). Im Gegensatz dazu zeigte die Asthmagruppe, die den  $\alpha$ -MSH-neutralisierenden Antikörper bekommen hatte, keinen Unterschied in der Reagibilität gegenüber MCh (*Resistance*:  $1,5 \pm 0,3$  cmH<sub>2</sub>O/l/s) führt (Abbildung 15).

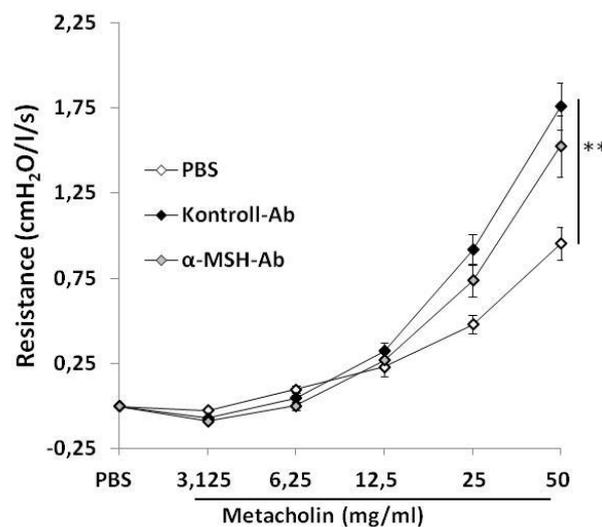


Abbildung 15: Einfluss eines  $\alpha$ -MSH-Antikörpers auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse ( $n=8$ ) wurden wie 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die Applikation des  $\alpha$ -MSH Antikörpers erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intraperitoneal (i.p). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH<sub>2</sub>O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-50 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\* $p<0,01$ ). Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der BAL ergab, dass das Infiltrat in der PBS-Gruppe hauptsächlich aus Makrophagen ( $1,6 \times 10^4 \pm 0,09 \times 10^4$ ) sowie einigen wenigen Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten bestand. In der OVA-Kontrollgruppe konnten neben einer signifikant erhöhten Anzahl an Makrophagen ( $3,4 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $0,4 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ ), eine leichte Steigerung an Lymphozyten ( $0,2 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ ) sowie eosinophilen Granulozyten ( $1,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ ) beobachtet werden. Durch die i.p. Behandlung mit dem  $\alpha$ -MSH

Antikörper ( $\alpha$ -MSH-Ab) kam es im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe zu einem Anstieg an eosinophilen Granulozyten ( $2,7 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$ ) sowie zu einer leichten Steigerung an Makrophagen ( $2,7 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ ), Lymphozyten ( $0,4 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $0,5 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ ) (Abbildung 16).

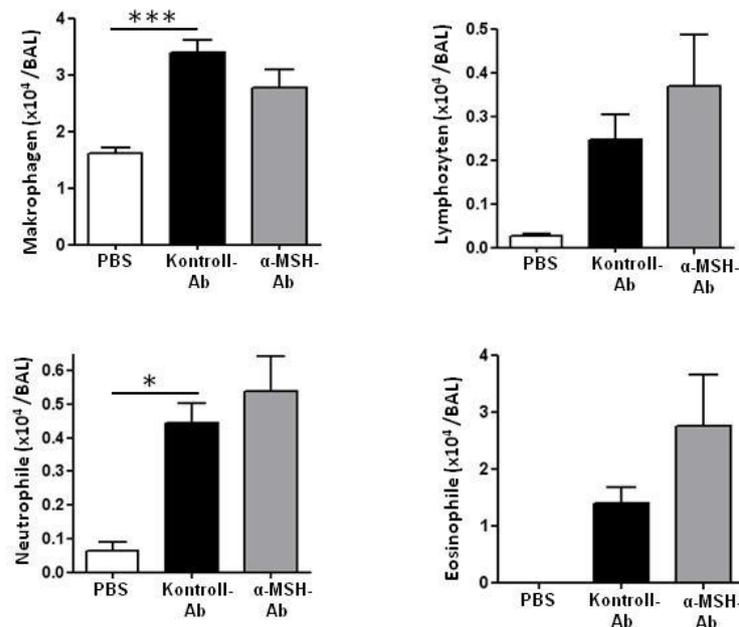


Abbildung 16: Einfluss eines  $\alpha$ -MSH-Antikörpers auf die Entzündungszellen in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) in Wildtyp-Mäusen. Wildtyp- Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die Applikation des  $\alpha$ -MSH Antikörpers erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intraperitoneal (i.p.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

In histologischen Lungenschnitten zeigte sich in der HE-Färbung eine deutliche Zunahme von infiltrierenden Entzündungszellen vor allem um die Gefäße sowie um die Atemwege in der OVA-Gruppe mit dem Kontroll-Antikörper, während in der PBS-Gruppe keine infiltrierenden Zellen zu beobachten waren. Bezogen auf die Entzündungszellen ließen sich zwischen der OVA-Gruppe und der OVA-Gruppe mit dem  $\alpha$ -MSH Antikörper keine Unterschiede feststellen. Die Mukus-produzierenden Becherzellen konnten mittels PAS-Färbung nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der Mukus-produzierenden Becherzellen in der OVA-Gruppe im Vergleich zur  $\alpha$ -MSH Antikörper-Gruppe nicht unterschiedlich war (Abbildung 17).

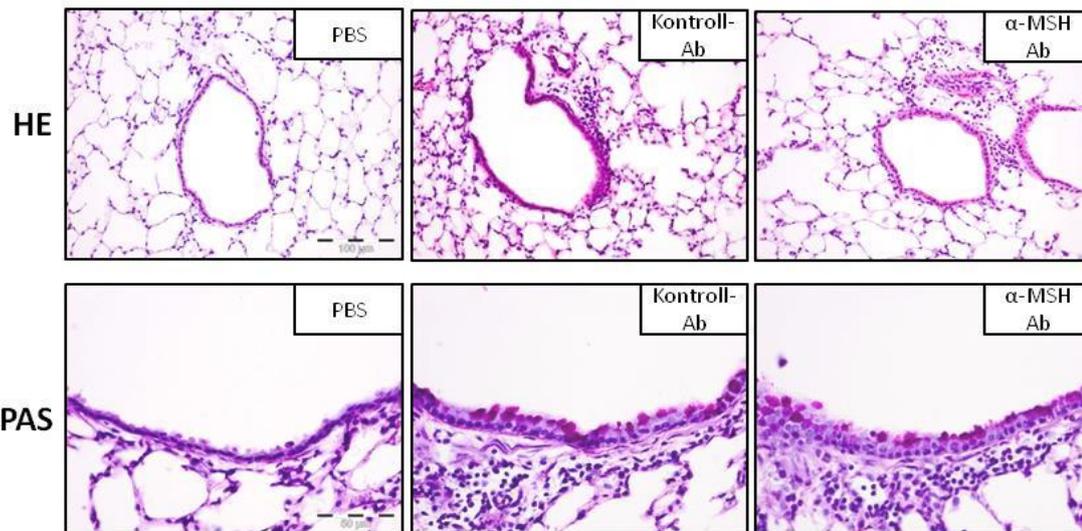


Abbildung 17: Einfluss eines  $\alpha$ -MSH Antikörpers auf die Atemwegsentzündung und die Mukusproduktion in Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die Applikation des  $\alpha$ -MSH Antikörpers erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intraperitoneal (i.p.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet und fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Beurteilung der Lungenmorphologie wurden die Paraffinschnitte mit HE, zur Darstellung der Mukus-produzierenden Becherzellen mit PAS angefärbt.

### 3.1.4 Der Melanokortinrezeptor 5 (MC5R) wird verstärkt beim experimentellen Asthma exprimiert

Durch immunhistochemische Färbungen konnten im ersten Teil der Arbeit vor allem das Atemwegsepitel sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Produzenten des  $\alpha$ -MSHs bei einer allergischen Atemwegsentzündung identifiziert werden. Wie diese Effekte des  $\alpha$ -MSHs nun vermittelt werden, sollte in den folgenden Untersuchungen geklärt werden. Dafür wurde die Expression der Melanokortinrezeptoren MC1R, MC2R, MC3R, MC4R und MC5R in den Zellen, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert sind (BAL) und in mikrodissizierten Atemwegen (AW) mit Hilfe einer Real-time PCR bestimmt und auf einem Gel aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Melanokortinrezeptoren 1 und 5 sowohl in der BAL, als auch in mikrodissizierten Atemwegen der Lunge exprimiert werden. Dabei scheint MC5R höher exprimiert zu werden als MC1R. Die Rezeptoren 2, 3 und 4 werden in der Lunge nicht exprimiert (Abbildung 18).

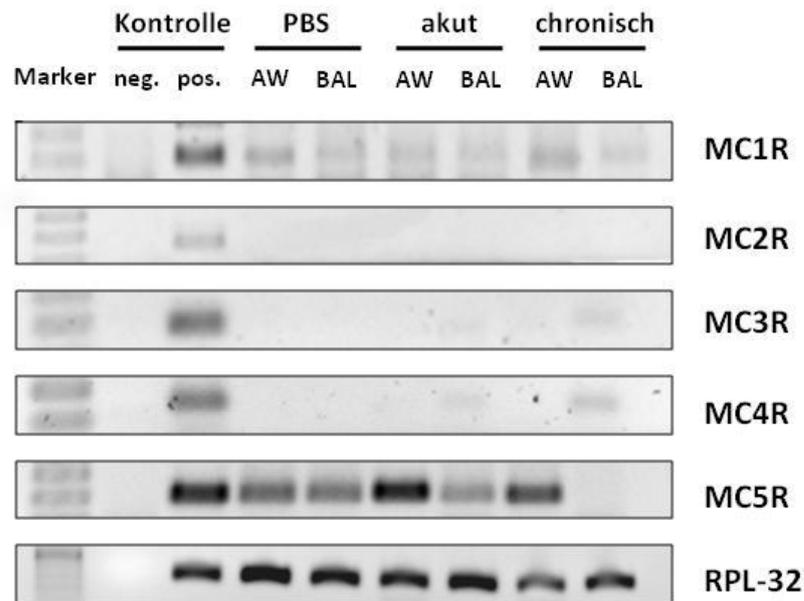


Abbildung 18: DNA-Agarose-Gelelektrophorese der PCR Amplifikationsprodukte der Melanokortinrezeptoren MC1R, MC2R, MC3R, MC4R und MC5R. Dargestellt ist die Expression der Melanokortinrezeptoren 1-5 in gesunden Mäusen (PBS) sowie Tieren mit akutem und chronischem experimentellen Asthma in mikrodisszierten Atemwegen und in BAL-Zellen. Die DNA-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O, als Positivkontrolle wurde ein Calibrator, bestehend aus murinem Ohr, Nebenniere, Gehirn und Lunge verwendet.

Um zu bestimmen, welche Zellen den Melanokortin-Rezeptor 5 (MC5R) auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden Lungenschnitte von Mäusen mit akutem und chronischem Asthma sowie PBS-Mäusen immunhistochemisch gegen MC5R gefärbt (2.6.3). Die Bilder lassen erkennen, dass der Rezeptor bei den PBS-Mäusen in geringer Konzentration vom Atemwegsepithel exprimiert wird. Bei den Mäusen mit akutem und chronischem Asthma scheint auch die Expression des Rezeptors auf dem Atemwegsepithel sowie in infiltrierenden Entzündungszellen zuzunehmen (Abbildung 19).

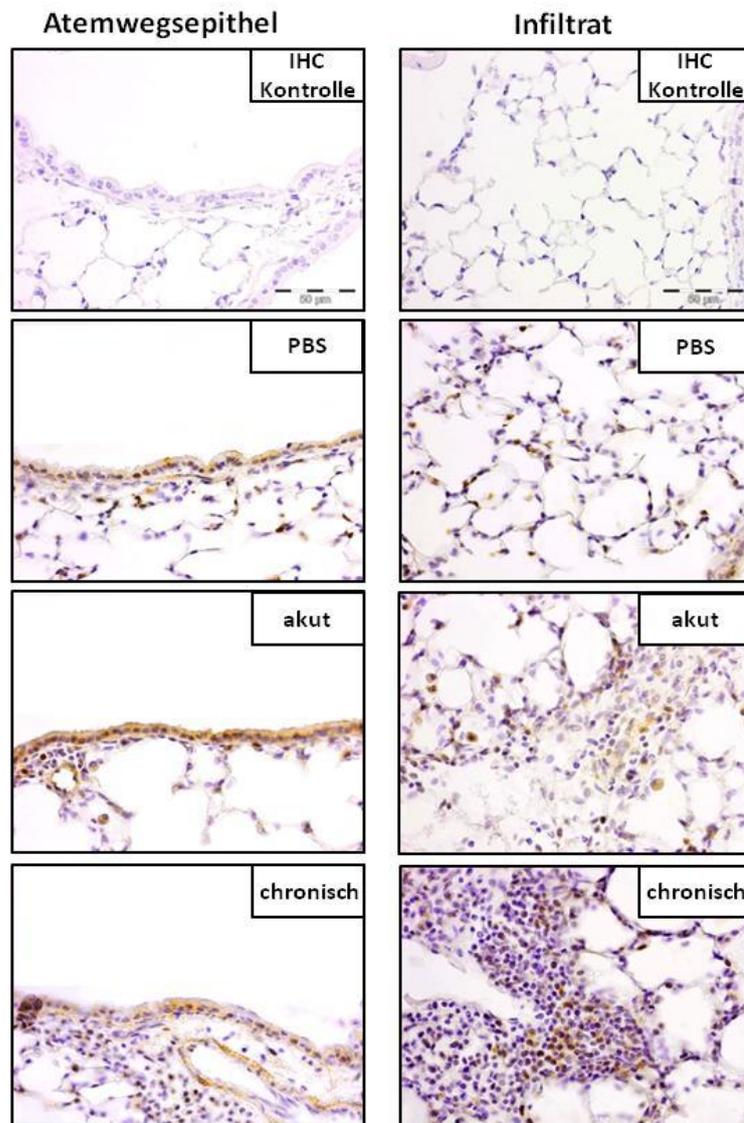


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis vom Melanokortinrezeptor 5 (MC5R) auf dem Atemwegsepithel und im Infiltrat von gesunden Mäusen (PBS) sowie Mäusen mit akutem und chronisch experimentellem Asthma. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen gegen MC5R von Formalinfixierten, mit Paraffin eingebettete (FFPE) Atemwegsschnitten. Die IHC dient als technische Kontrolle.

Die Differenzierung der Zellen, die in die asthmatische Lunge infiltriert waren, erfolgte durch die immunhistochemische Färbung gegen MC5R von Zytospins mit BAL Zellen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass der Melanokortinrezeptor 5 vor allem von Makrophagen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird.

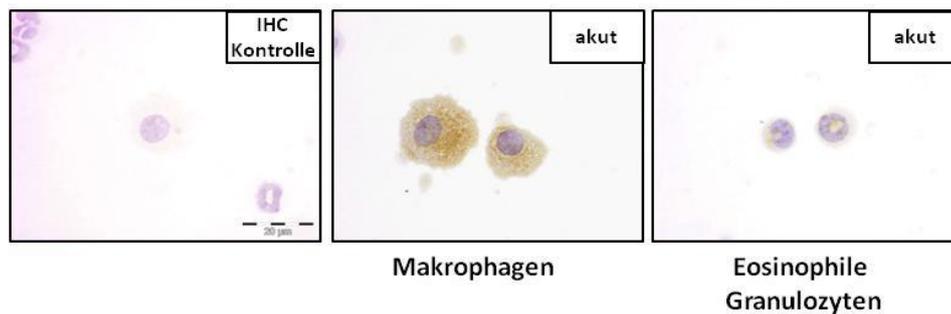


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von MC5R in BAL-Zellen von Mäusen mit akutem experimentellem Asthma. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen gegen  $\alpha$ -MSH von fixierten BAL-Zellen. Die IHC dient als technische Kontrolle.

### 3.1.5 $\alpha$ -MSH hat keine Wirkung auf das experimentelle Asthma in MC5R-defizienten Mäusen

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass lokal appliziertes  $\alpha$ -MSH die allergische Entzündungsreaktion in der Lunge signifikant reduzieren kann. Es konnte außerdem dargestellt werden, dass eine Reihe von Zellen in der Lunge, die bei der Pathogenese des Asthmas eine Rolle spielen, den MC5R exprimieren und somit auf das  $\alpha$ -MSH reagieren können. Um zu überprüfen, welche Rolle MC5R bei der Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte von  $\alpha$ -MSH in der asthmatischen Lunge spielt, wurden weibliche MC5R-defiziente Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund im Alter von 6-8 Wochen verwendet, die den Rezeptor nicht exprimieren. Die Versuchstiere wurden gemäß Protokoll 2.2.1. gegen OVA sensibilisiert und anschließend inhalativ mit einem OVA-Aerosol provoziert. Jeweils eine Stunde vor der Aerosol-Challenge wurden 100  $\mu$ l des  $\alpha$ -MSHs in einer Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht i.t. appliziert. 24 Stunden nach Ende des Protokolls wurden die typischen Merkmale des Asthmaphänotyps durch Messung der Lungenfunktion, Analyse der Entzündungszellen in der BAL und der Lungenhistologie charakterisiert.

Als erstes wurde die Atemwegsreagibilität mittels invasiver Lungenfunktionsbestimmung gemessen. Die Tiere der PBS-Kontrollgruppe wiesen bei einer MCH-Konzentration von 50 mg/ml eine Resistance von  $1,3 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O/l/s auf. Die mit OVA sensibilisierten und provozierten Mäuse zeigten im Vergleich zur Negativkontrollgruppe keine Hyperreagibilität der Atemwege (*Resistance*:  $1,4 \pm 0,1$  cmH<sub>2</sub>O/l/s). Auch die Applikation des  $\alpha$ -MSHs hatte keinen Einfluss auf die Lungenfunktion (*Resistance*:  $1,1 \pm 0,1$  cmH<sub>2</sub>O/l/s) (Abbildung 21).

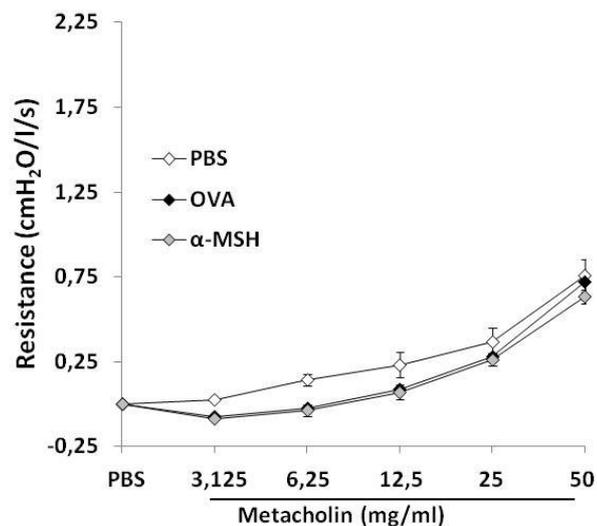


Abbildung 21: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsreagibilität in MC5R-defizienten Mäusen. MC5R-defiziente Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie in 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH<sub>2</sub>O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-50 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

Nach Analyse der Leukozytensubpopulationen in der BAL zeigten sich bei der Negativkontrollgruppe vermehrt Makrophagen ( $2,0 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ ). Bei den Tieren der Asthmakontrollgruppe kam es zu einem deutlichen Anstieg von Lymphozyten ( $0,3 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ ), neutrophilen ( $0,8 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) und vor allem eosinophilen Granulozyten ( $2,3 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ). Bei den mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere gab es im Vergleich zu der Asthmakontrollgruppe kaum Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der BAL (Makrophagen:  $2,5 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ; Lymphozyten:  $0,3 \times 10^4 \pm 0,06 \times 10^4$ , Eosinophile:  $2,7 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ , Neutrophile:  $0,9 \times 10^4 \pm 0,05 \times 10^4$ ) (Abbildung 22).

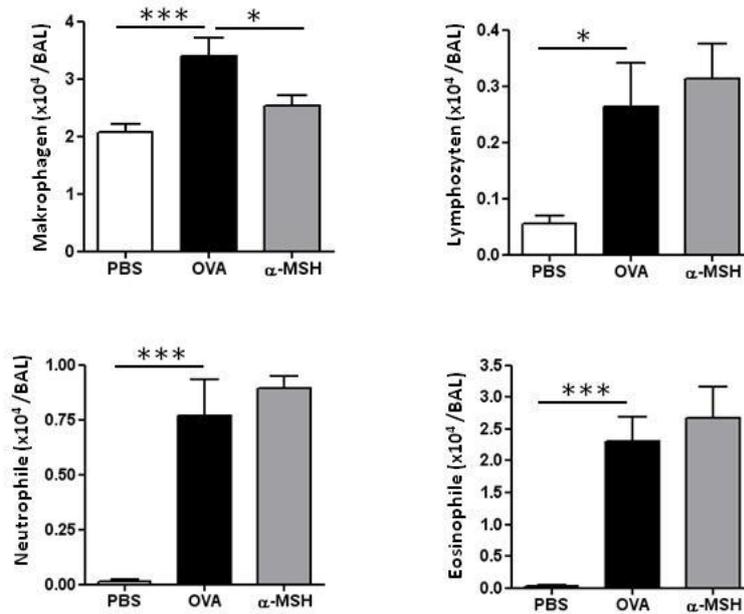


Abbildung 22: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Entzündungszellen in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) von MC5R-defizienten Mäusen. MC5R-defiziente Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die Applikation des  $\alpha$ -MSHs erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

In den HE gefärbten Lungenschnitten konnte im Lungengewebe der PBS-Gruppe keine Entzündungsreaktion beobachtet werden. Die Färbung zeigte jedoch einen Influx von inflammatorischen Zellen in der OVA-Gruppe. Auch hier ließ sich bei den mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tieren im Vergleich zu der OVA-Gruppe kein Unterschied feststellen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es nach PAS-Färbung der aufbereiteten Lungen zu keiner Verringerung der Mukus-produzierenden Becherzellen kam (Abbildung 23).

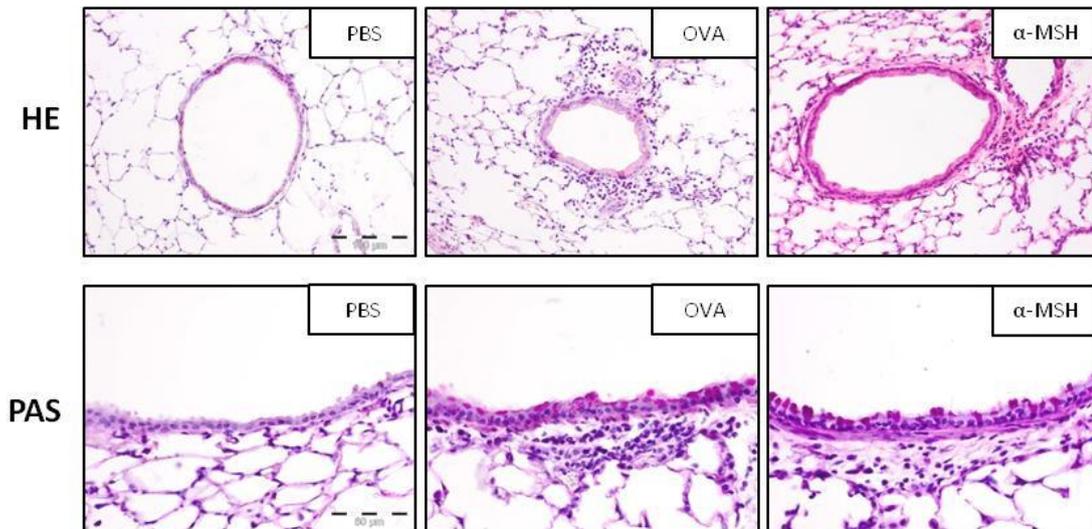


Abbildung 23: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsentzündung und die Mukusproduktion von MC5R-defizienten Mäusen. MC5R-defiziente Mäuse ( $n=7-8$ ) wurden wie in 2.2.1. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die Applikation des  $\alpha$ -MSHs erfolgte an den Tagen 26 und 27 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet und fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Beurteilung der Lungenmorphologie wurden die Paraffinschnitte mit HE, zur Darstellung der Mukosproduzierenden Becherzellen mit PAS angefärbt.

### 3.1.6 $\alpha$ -MSH beeinflusst die Produktion eosinophil-chemotaktisch wirkender Chemokine und Zytokine

Um abschließend den Wirkmechanismus von  $\alpha$ -MSH auf die Zellen in der BAL, insbesondere von eosinophilen Granulozyten, genauer zu charakterisieren, wurde der Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Produktion von eosinophil-chemotaktisch wirkenden Chemokinen und Zytokinen in der BALF untersucht. Dabei zeigte sich, dass Eotaxin-1 (Abbildung 24, links) in der  $\alpha$ -MSH Gruppe mit  $41,8 \text{ pg/ml} \pm 6,9 \text{ pg/ml}$  im Vergleich zur Asthmakontrollgruppe mit  $64,3 \text{ pg/ml} \pm 6,6 \text{ pg/ml}$  signifikant reduziert war. Die Eotaxin-1 Konzentration in der BALF der PBS-Kontrollgruppe lag bei  $52,7 \text{ pg/ml} \pm 3,3 \text{ pg/ml}$ . Auch war eine signifikant verminderte Konzentration des Interleukins-5 in der mit  $\alpha$ -MSH behandelten Gruppe ( $1,2 \text{ pg/ml} \pm 0,4 \text{ pg/ml}$ ) im Vergleich zur OVA-Gruppe ( $6,6 \text{ pg/ml} \pm 2,0 \text{ pg/ml}$ ) zu beobachten. In der PBS-Gruppe ließ sich kein IL-5 nachweisen (Abbildung 24, rechts).

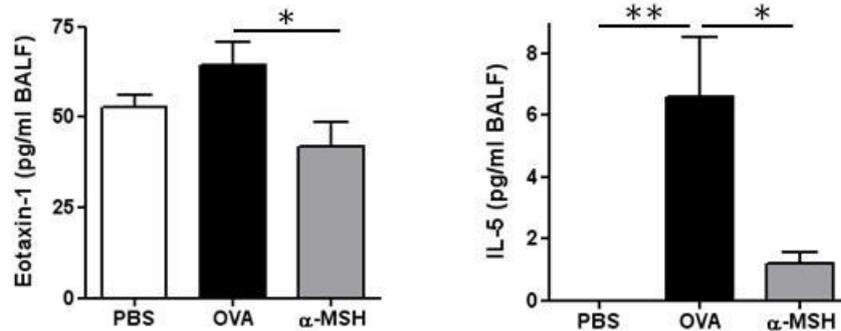


Abbildung 24: Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Applikation von  $\alpha$ -MSH. Die Konzentration von Eotaxin-1 (links) wurde mittels ELISA, die Konzentration von IL-5 (rechts) mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7-8; \*p<0,05; \*\*p<0,01).

Nach Neutralisierung des mauseigenen  $\alpha$ -MSHs mit einem  $\alpha$ -MSH-Antikörpers zeigten die Tiere signifikant verminderte Eotaxin-1 Level ( $35,6 \text{ pg/ml} \pm 4,4 \text{ pg/ml}$ ) im Vergleich zur Gruppe mit dem Kontroll-Antikörper ( $71,2 \text{ pg/ml} \pm 7,8 \text{ pg/ml}$ ). Die Eotaxin-1 Konzentration in der PBS-Gruppe lagen bei  $54,4 \text{ pg/ml} \pm 4,1 \text{ pg/ml}$  (Abbildung 25, links). Die IL-5 Konzentration in der BALF waren in der  $\alpha$ -MSH-Antikörper-Gruppe mit  $6,7 \text{ pg/ml} \pm 1,7 \text{ pg/ml}$  im Vergleich zur Kontroll-Antikörper-Gruppe bei  $4,3 \text{ pg/ml} \pm 1,0 \text{ pg/ml}$  leicht erhöht. In der PBS-Gruppe konnte kein IL-5 nachgewiesen werden (Abbildung 25, rechts).

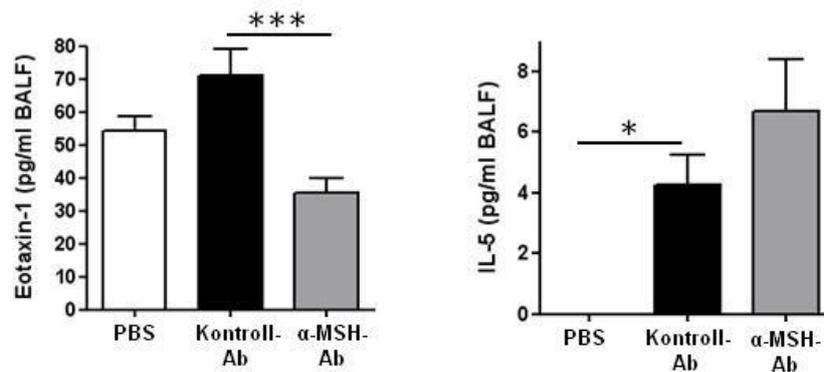


Abbildung 25: Einfluss eines  $\alpha$ -MSH Antikörpers auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Neutralisierung von  $\alpha$ -MSH. Die Konzentration von Eotaxin-1 (links) wurde mittels ELISA, die Konzentration von IL-5 (rechts) mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.(n=6-8; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass  $\alpha$ -MSH in der Lunge beim experimentellen Asthma anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. In Wildtyp-Tieren führte die intratracheale Applikation von  $\alpha$ -MSH zu einer signifikanten Reduktion der Entzündungszellen, insbesondere von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, zu einer verminderten Mukusproduktion und einer leicht verbesserten Atemwegsreagibilität. Die verminderte Anzahl an eosinophilen Granulozyten ging außerdem mit einer verringerten Konzentration des eosinophil-chemotaktisch wirkenden Zytokins Eotaxin-1 und des Zytokins IL-5 einher. Nach Neutralisierung des von der Maus gebildeten  $\alpha$ -MSH war eine in Teilaspekten schwach verstärkte Entzündungsreaktion in der Lunge zu beobachten: die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL war erhöht, ebenso die Anzahl der Lymphozyten. In MC5R-defizienten Mäusen war die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH hingegen nicht mit einer Verminderung der Entzündungszellen in der BAL, einer reduzierten AHR oder einer verminderten Mukusproduktion assoziiert. Die anti-inflammatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH scheint somit beim experimentellen Asthma über den Melanokortinrezeptor 5 vermittelt zu werden.

## **3.2 Die Rolle von ROR $\gamma$ t als Zielgen für eine therapeutische Intervention beim neutrophilen Asthma**

### **3.2.1 Das neutrophile Asthma bei der Maus geht mit einer erhöhten Anzahl an Th17 Zellen und Th17-spezifischer Entzündungsmarker einher**

Um bei der Maus ein schweres Asthma mit einer großen Anzahl an neutrophilen Granulozyten zu induzieren, wurde das in 2.2.3. beschriebene Protokoll verwendet. Dabei wurden weibliche C57BL/6J Mäuse im Alter von 8-10 Wochen an zwei Tagen gegen das Modellallergen OVA zusammen mit LPS oropharyngeal sensibilisiert und mit einem 1%igen OVA-Aerosol provoziert. 24 Stunden nach der letzten Provokation wurde der Phänotyp des neutrophilen Asthmas anhand der Messung von Lungenfunktion und der Leukozytenpopulationen in der BAL sowie durch die Analyse der Lungenhistologie, der unterschiedlichen T-Lymphozytenpopulationen und der Expression Th17-spezifischer Marker und Zytokine in der Lunge charakterisiert.

Als erstes wurde am anästhesierten Tier eine invasive Lungenfunktionsbestimmung mittels Buxco Finepoint-System durchgeführt und die Atemwegsreagibilität gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (3,125-100 mg/ml) bestimmt. Hier zeigte sich, dass die OVA-Gruppe nach Provokation mit 100 mg/ml Metacholin mit einer Resistance von  $1,91 \pm 0,27$  cmH<sub>2</sub>O/l/s im Vergleich zu PBS-Gruppe ( $1,33 \pm 0,27$  cmH<sub>2</sub>O/l/s), welche als Negativkontrollgruppe diente, eine deutlich, aber nicht signifikant erhöhte Atemwegsreagibilität aufwies (Abbildung 26).

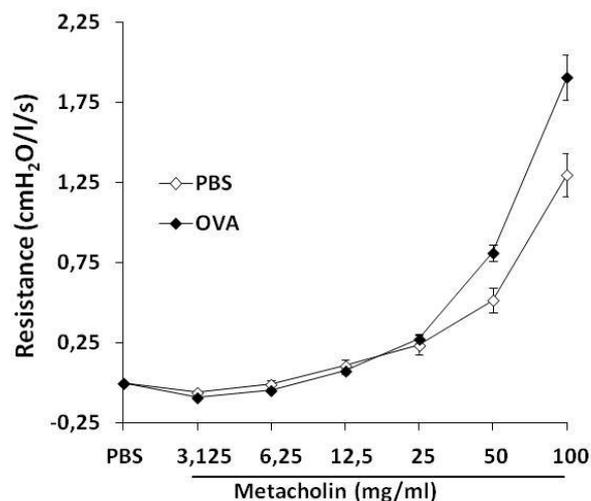


Abbildung 26: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse (n=8) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH<sub>2</sub>O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-100 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

Nach Differenzierung der Entzündungszellen in der BAL konnte gezeigt werden, dass diese in der PBS-Gruppe vor allem aus Makrophagen bestanden ( $2,1 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ ). In der OVA Gruppe konnten neben einer signifikant verstärkten Infiltration von Makrophagen ( $11,5 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ ), ein starker Influx von Lymphozyten ( $2,3 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $3,7 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4$ ) in die Lunge nachgewiesen werden. Eosinophile Granulozyten konnten nur vereinzelt beobachtet werden ( $0,1 \times 10^4 \pm 0,06 \times 10^4$ ) (Abbildung 27).

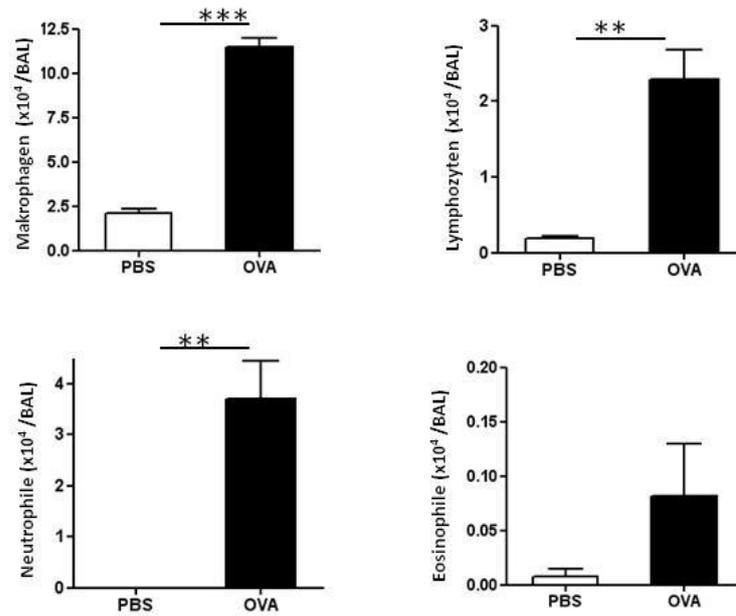


Abbildung 27: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse (n=3-4) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen in den Atemwegen und der Gefäßwand zeigte sich auch nach HE-Färbung der histologischen Präparate der Lunge. Im Vergleich zur PBS-Gruppe, welche frei von Infiltraten war, kam es nach der OVA/LPS-Sensibilisierung und OVA-Provokation zu einem starken Influx von inflammatorischen Zellen. Die Färbung für Mukus-produzierenden Becherzellen mittels PAS ergab, dass sowohl in der OVA-Gruppe, als auch in der PBS-Kontrollgruppe nur vereinzelt Mukus-produzierende Zellen auftraten (Abbildung 28).

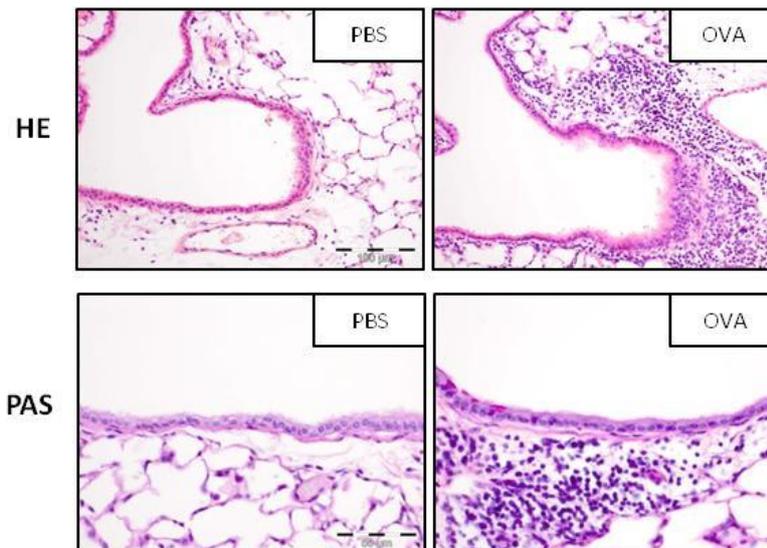


Abbildung 28: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsentzündung (HE) und die Mukusproduktion (PAS) in Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse (n=8) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet, fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Charakterisierung der Atemwegsentzündung wurden die Paraffinschnitte mit HE angefärbt. Mukus-produzierende Becherzellen wurden mittels PAS-Färbung nachgewiesen.

Die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der BAL lässt erkennen, dass es durch die OVA/LPS Sensibilisierung und anschließende Provokation zu einem Anstieg an Lymphozyten kam. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Lymphozyten um  $CD4^+$ / $IL-17A^+$  Th17 Zellen handelt, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der  $CD4^+$ / $IL-17A^+$  Lymphozyten mit  $6,2\% \pm 1,6\%$  im Vergleich zur PBS-Gruppe mit  $0,4\% \pm 0,1\%$  signifikant erhöht war (Abbildung 29).

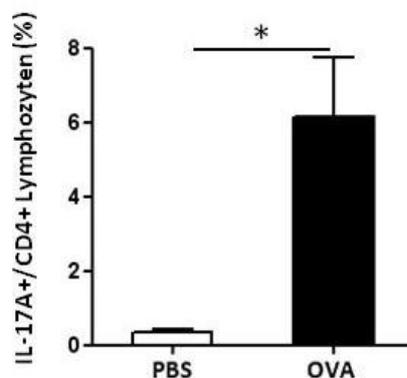


Abbildung 29: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf den Anteil  $CD4^+$ / $IL-17A^+$  Lymphozyten in Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse (n=4) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde eine FACS-Färbung durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Lymphozyten gated und anschließend der Anteil  $IL-17A^+$ / $CD4^+$  Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Zur weiteren Charakterisierung der Entzündung in der Lunge wurde wie in 2.8. beschrieben Lungenhomogenat hergestellt, die RNA daraus isoliert und anschließend die mRNA-Expression verschiedener Th17-spezifischer Entzündungsmarker und Zytokine im Vergleich zum Referenzgen RPL-32 mittels Real-time PCR bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t und des IL-23 Rezeptors in der OVA-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (PBS). Es konnte zudem in der OVA-Gruppe eine signifikant gesteigerte Expression der Th17-spezifischen Zytokine IL-17A und IL-21 sowie eine erhöhte Expression der allgemein pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und KC nachgewiesen werden. In der OVA-Gruppe konnte hingegen keine veränderte IL-6 Expression festgestellt werden (Abbildung 30).

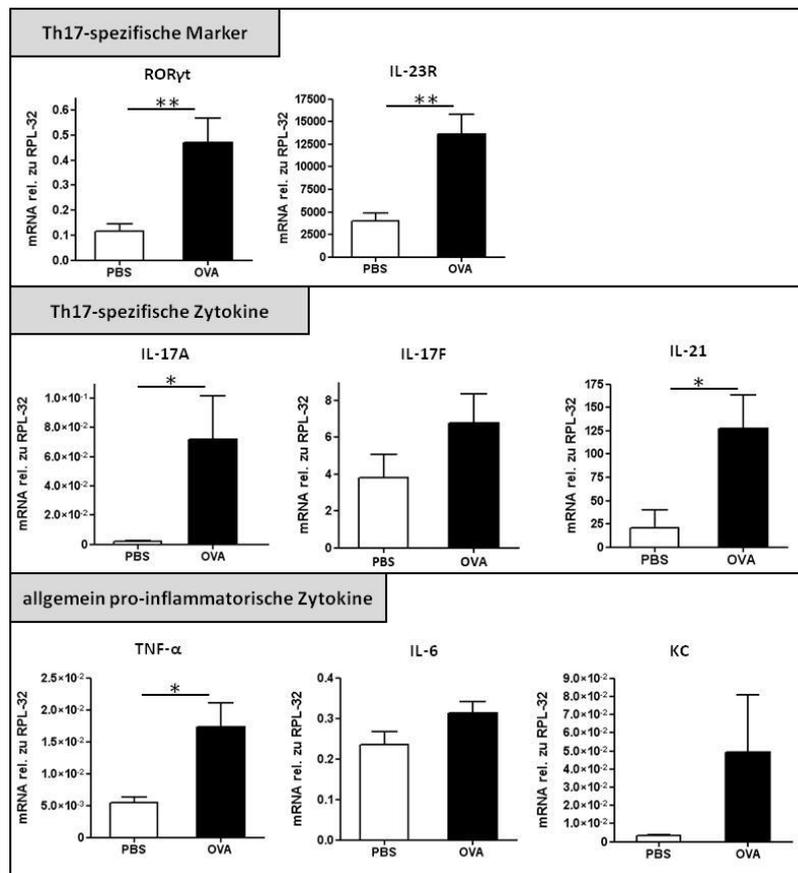


Abbildung 30: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf die Expression Th17-spezifischer Marker und Zytokine in homogenisierten Lungen. Wildtyp-Mäuse (n=4-5) wurden wie in Etablierung einer neutrophilen Atemwegsentzündung (2.2.3.) beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurden die Lungen in flüssigem Stickstoff homogenisiert, die RNA isoliert und die Expression verschiedener Marker und Zytokine mittels Real-time PCR untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01).

### 3.2.2 Ein ROR $\gamma$ t-Defizit vermindert die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge

Um zu überprüfen, ob es sich hier um eine Th17-spezifische Entzündung handelt, wurde das in 2.2.3. genannte neutrophile Asthma-Mausmodell mit weiblichen ROR $\gamma$ t transgenen (tg) Mäusen mit C57Bl/6 Hintergrund im Alter von 8-10 Wochen durchgeführt. In homozygoten ROR $\gamma$ t tg Mäusen wird das Grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des ROR $\gamma$ t-Promotors exprimiert, was einem funktionellen ROR $\gamma$ t Knockout entspricht. Da diese Tiere keine Th17 Zellen mehr bilden können<sup>68</sup>, können sie zur funktionellen Analyse der Rolle von Th17 Zellen bzw. des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t bei der Sensibilisierung in der Lunge und dem anschließenden Entzündungsgeschehen eingesetzt werden. Die Versuchstiere wurden zunächst gegen das Modellallergen OVA zusammen mit LPS sensibilisiert und anschließend provoziert. Um Rückschlüsse auf das Ausmaß der Atemwegsentzündung zu ziehen, wurde neben einer Lungenfunktionsmessung, die Leukozytenpopulationen in der BAL und die Lungenhistologie analysiert.

Zuerst wurde am anästhesierten Tier eine invasive Lungenfunktionsbestimmung mittels Buxco Finepoint-System durchgeführt. Die inhalative Provokation von Metacholin in ansteigenden Konzentrationen (3,125-100 mg/ml) führte bei den ROR $\gamma$ t-tg Tieren der OVA-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe, welche als Negativkontrollgruppe diente, zu keiner Zunahme des Atemwegswiderstands (*Resistance* bei 100 mg/ml: PBS  $1,3 \pm 0,3$  cmH<sub>2</sub>O/l/s; OVA  $1,0 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O/l/s) (Abbildung 31).

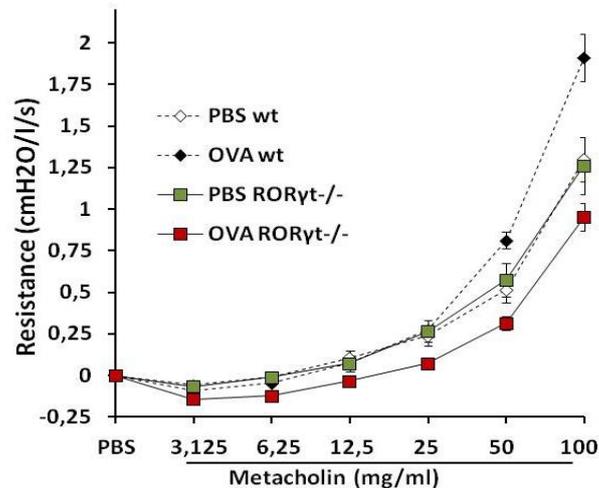


Abbildung 31: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsreagibilität in RORyt-tg (RORyt <sup>-/-</sup>) Mäusen. RORyt<sup>-/-</sup> Mäuse (n=7) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH<sub>2</sub>O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-100 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

Wie in den C57BL/6J Wildtyp-Tieren zeigte die zelluläre Zusammensetzung der BAL, dass sich in der BAL der Kontrollgruppe (PBS) neben Makrophagen noch wenige Lymphozyten und neutrophile Granulozyten befanden. Nach Sensibilisierung mit OVA/LPS und OVA-Provokation konnte ein signifikanter Anstieg an Makrophagen ( $3,5 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ), Lymphozyten ( $4,3 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $1,8 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ) in den RORyt-defizienten Tieren im Vergleich zur stamm-gleichen PBS-Kontrolle beobachtet werden. Eosinophile Granulozyten waren sowohl in der PBS- als auch in der OVA-Gruppe nur vereinzelt zu finden. Im Vergleich zu den C57BL/6 Wildtyp (wt) Mäusen waren die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der RORyt-defizienten OVA-Gruppe signifikant vermindert. Zudem kam es zu einem deutlichen, jedoch nicht signifikanten Anstieg an Lymphozyten in der BAL der RORyt-defizienten Mäuse (Abbildung: 32).

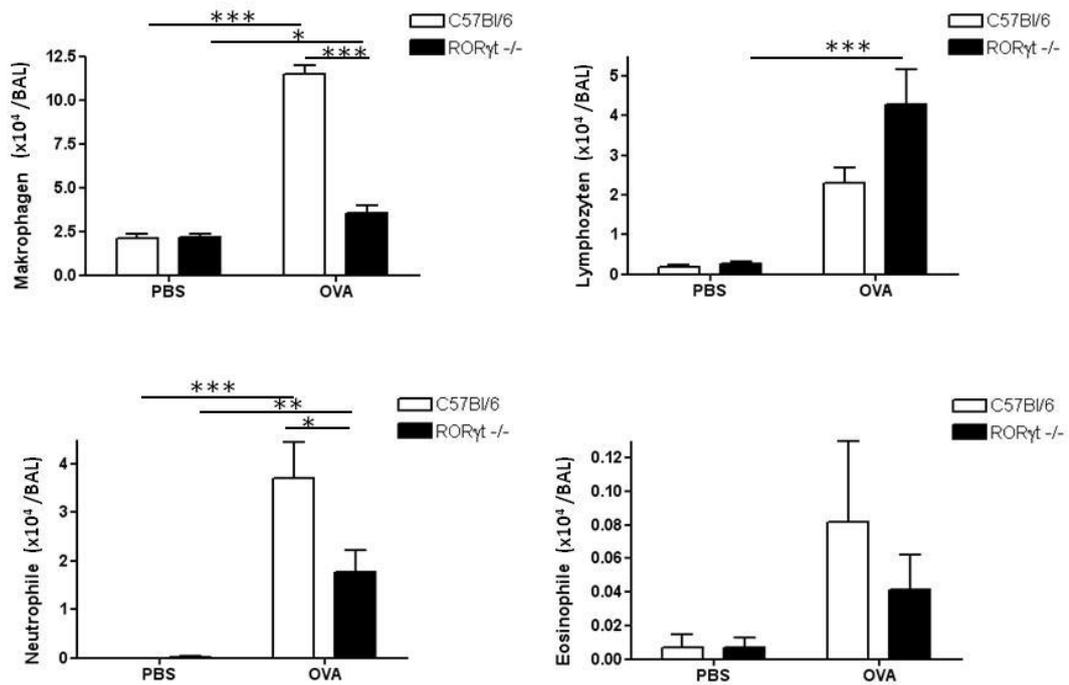


Abbildung: 32: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) in RORγt<sup>-/-</sup> Mäusen. RORγt-tg Mäuse (RORγ<sup>-/-</sup>) (n=7-8) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Die Bestimmung der RNA-Expression verschiedener Th17-spezifischer Entzündungsmarker und Zytokine im Lungenhomogenat dieser Tiere diente zur weiteren Charakterisierung der Entzündung. Im Vergleich zu den C57BL/6 Wildtyp-Tieren war die Expression der Th17-spezifischen Marker RORγt und IL-23R sowie IL-17F in der OVA-Gruppe der RORγt-defizienten Tiere signifikant vermindert. Es konnte zudem eine deutlich verringerte Expression der Zytokine IL-17A, TNF-α und KC nachgewiesen werden, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 33).

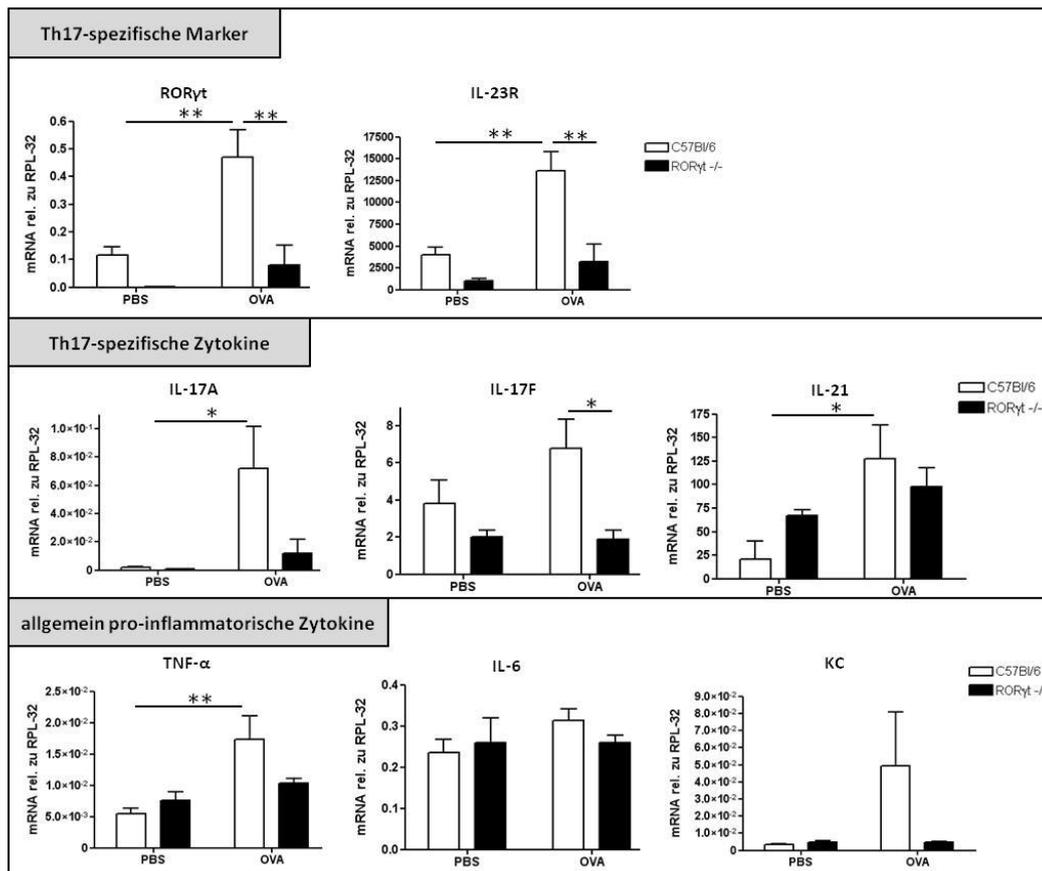


Abbildung 33: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf die Expression Th17-spezifischer Marker und Zytokine in homogenisierten Lungen RORγt-tg (RORγ<sup>-/-</sup>) Mäuse. Wildtyp- und RORγt<sup>-/-</sup> Mäuse (n=4-5) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurden die Lungen in flüssigem Stickstoff homogenisiert, die RNA isoliert und die Expression verschiedener Marker und Zytokine mittels Real-time PCR untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

Die Morphologie der Lungen sowie die Mukusproduktion wurden mittels HE- und PAS-Färbung untersucht. Während sowohl beim Wildtyp als auch bei den RORγt<sup>-/-</sup> Tieren in der OVA-Gruppe jeweils ein starker Influx von Entzündungszellen nachgewiesen werden konnte, war bei den PBS-Gruppen keine Entzündungsreaktion zu beobachten. Die PAS-Färbung der aufbereiteten Lungen zeigte, dass in den RORγt<sup>-/-</sup> wie auch in den Wildtyp-Tieren nur vereinzelt Mukus-produzierende Becherzellen detektiert werden konnten (Abbildung 34).

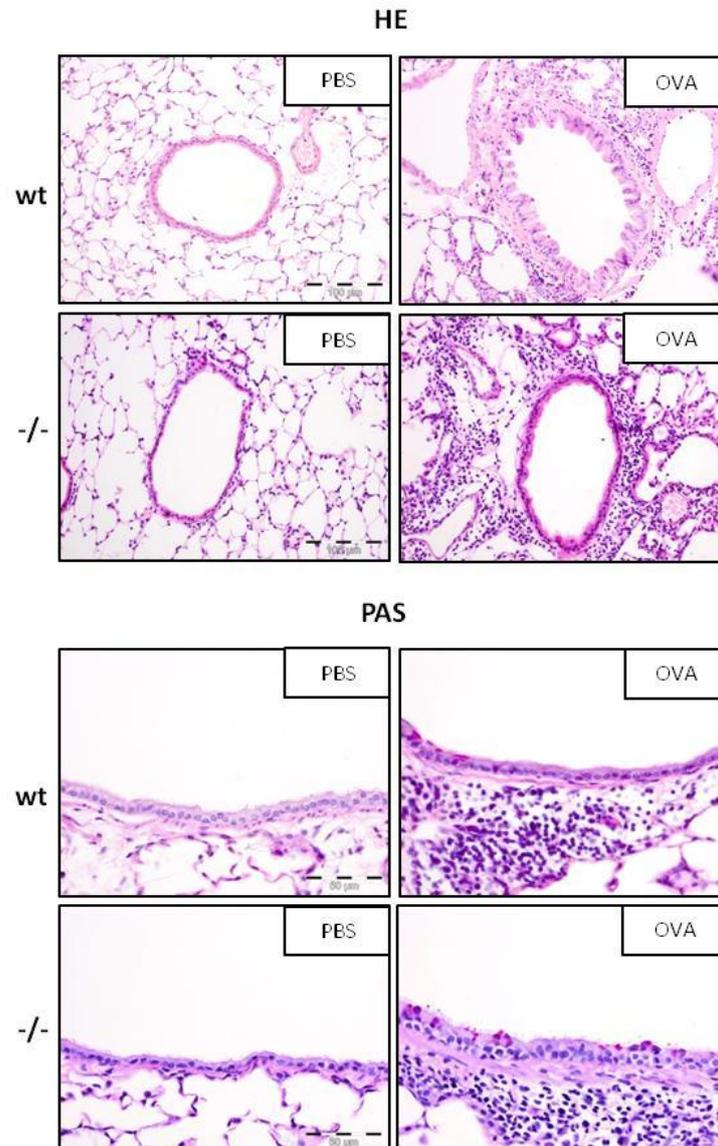


Abbildung 34: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsentzündung (HE) und die Mukusproduktion (PAS) in Wildtyp (wt) und ROR $\gamma$ t-tg (-/-) Mäusen. Die Tiere (n=7-8) wurden wie in 2.2.3. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet, fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Charakterisierung der Atemwegsentzündung wurden die Paraffinschnitte mit HE angefärbt. Mukus produzierende Becherzellen wurden mittels PAS-Färbung nachgewiesen

### 3.2.3 ROR $\gamma$ t-spezifische DNAzyme haben keinen Einfluss auf *in-vitro* generierte Th17 Zellen

Eine therapeutische Ausschaltung von Genen, die beim Asthma bronchiale eine Rolle spielen, kann durch unterschiedliche Ansätze erreicht werden. In dieser Arbeit wurden DNA-Enzyme (DNAzyme) und small interfering RNAs (siRNAs) gegen den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t eingesetzt. Um die Expression des Transkriptionsfaktors

ROR $\gamma$ t zu inhibieren und somit die pro-inflammatorisch wirkenden Th17 Zellen zu neutralisieren, wurden zunächst ROR $\gamma$ t-spezifische DNAzyme generiert und *in-vitro* getestet. DNAzyme sind katalytisch aktive DNA-Moleküle, die an ihre spezifische Zielsequenz auf mRNA-Ebene binden und diese abspalten. Wie in 2.15.1. beschrieben wurden dafür *in-vitro* generierte Th17 Zellen mit verschiedenen ROR $\gamma$ t-spezifischen DNAzymen (dROR $\gamma$ t37, dROR $\gamma$ t104, dROR $\gamma$ t112, dROR $\gamma$ t114, dROR $\gamma$ t115, dROR $\gamma$ t119, dROR $\gamma$ t123, dROR $\gamma$ t128, dROR $\gamma$ t1133, dROR $\gamma$ t136, dROR $\gamma$ t156, dROR $\gamma$ t166) mittels Elektroporation transfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisches DNAzym (dODN, Oligodesoxynucleotide) verwendet, welches nicht an die murine mRNA bindet und diese spalten kann.

Die Messung der Transfektionseffizienz erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe eines 6-Carboxyfluorescein-(FAM) markierten unspezifischen DNAzyms (FAM-dODN) am BD Accuri C6. Zur Ermittlung der Effizienz wurde ein Histogramm erstellt (Abbildung 35). Dieses zeigt, dass 48 Stunden nach der Transfektion ca. 60 % der Zellen transfiziert waren.

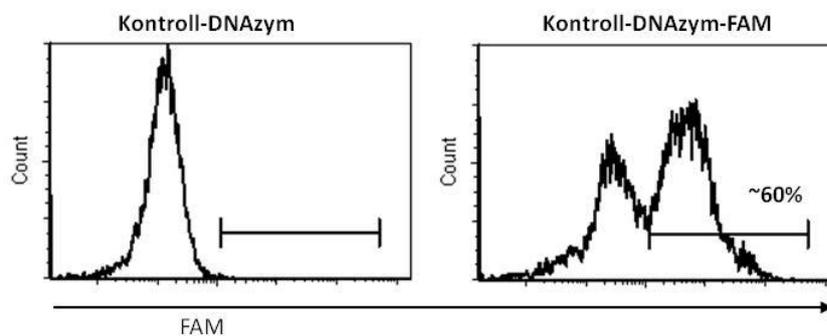


Abbildung 35: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels 6-Carboxyfluorescein (FAM)-markiertem unspezifischem DNAzym 48 Stunden nach Transfektion. Das Histogramm zeigt die FAM-Fluoreszenzintensität in FL-1 von Th17 Zellen, die mit nicht-markierten (links) und FAM-markierten (rechts) unspezifischem DNAzym transfiziert wurden. Es wurden zuvor die Lymphozyten gegatet. Die Messung erfolgte mittels BD Accuri C6.

24 und 48 Stunden nach Transfektion der Th17 Zellen mit den ROR $\gamma$ t-spezifischen DNAzymen wurde ein Teil der Zellen geerntet, die RNA isoliert und die Expression von ROR $\gamma$ t mittels Real-time PCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu den Zellen, die mit dem unspezifischen DNAzym transfiziert wurden, kein DNAzym nach 24 oder 48 Stunden einen Einfluss auf die Expression von ROR $\gamma$ t hatte (Abbildung 36).

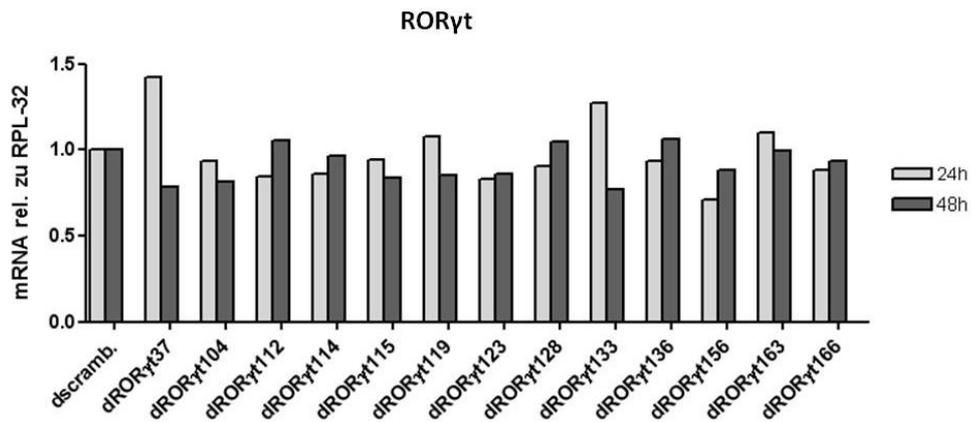


Abbildung 36: Einfluss von RORyt-spezifischen DNAzymen auf die Expression von RORyt in transfizierten Th17-Zellen nach 24 und 48 Stunden. Die RORyt-Expression wurde wie in 2.20. beschrieben mittels Real-time PCR gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Die RORyt-Expression in den mit dem Kontroll-DNAzym behandelten Th17 Zellen (dscremb.) wurde gleich 1 gesetzt.

### 3.2.4 RORyt-spezifische siRNAs vermindern die Expression von RORyt und von pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen bei *in-vitro* generierten Th17 Zellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die RORyt-spezifischen DNAzyme in dem ersten Ansatz nicht den erhofften Effekt hatten, wurden in einem alternativen Ansatz RORyt-spezifische siRNAs getestet. Für die Transfektion der Th17 Zellen wurde das in 2.15.2. beschriebene Protokoll verwendet. Zunächst wurden *in-vitro* generierte Th17 Zellen mittels Elektroporation mit den RORyt-spezifischen siRNAs transfiziert (RORyt400, RORyt40 und RORyt44). Bei den verwendeten siRNAs handelte es sich um kurze doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle, die, ähnlich wie die DNAzyme, an die mRNA von RORyt binden und diese nach Aktivierung durch den RNA-Induced Silencing Complex (RISC) spalten. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle eine siRNA verwendet, die nicht an die mRNA bindet. Diese unspezifische siRNA wurde als „scrambled siRNA“ bezeichnet. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente eine unspezifische siRNA, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa555 markiert war (scrambled siRNA-Alexa Fluor555). Auch hier wurde 48 Stunden nach der Transfektion die Transfektionseffizienz mittels BD Accuri C6 überprüft und in einem Histogramm dargestellt. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu den Zellen mit der nicht-markierten siRNA ca. 60% der Lymphozyten mit der Alexa Fluor555-markierten unspezifischen siRNA transfiziert wurden (Abbildung 37).

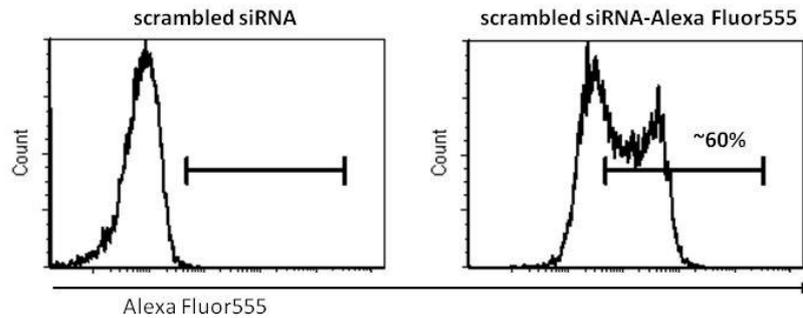


Abbildung 37: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Alexa Fluor555-markierter unspezifischer siRNA 48 Stunden nach Transfektion. Das Histogramm zeigt die Alexa Fluor555-Fluoreszenzintensität in FL-2 von Th17 Zellen, die mit nicht-markierter (links) und Alexa Fluor555-markierter (rechts) unspezifischer siRNA transfiziert wurden. Es wurden zuvor die Lymphozyten gegatet. Die Messung erfolgte am BD Accuri C6.

Des Weiteren wurde 24 und 48 Stunden nach der Transfektion ein Teil der Th17 Zellen geerntet und die RNA isoliert. Im Anschluss wurde mittels Real-time PCR die Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t sowie der Th17-spezifischen Zytokinen IL-17A und IL-17F bestimmt. Während die ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNAs ROR $\gamma$ t40 und ROR $\gamma$ t44 im Vergleich zur scrambled siRNA keine Wirkung auf die Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t zeigten, konnte durch den Einfluss der siRNA ROR $\gamma$ t40 schon 24 Stunden nach der Transfektion eine verminderte Expression, 48 Stunden später sogar eine signifikante Reduktion der Expression um ca. 65% beobachtet werden. Auch bei den ROR $\gamma$ t-spezifischen Zytokinen IL-17A und IL-17F zeigte sich, dass die Expression im Vergleich zur scrambled siRNA durch den Einfluss von ROR $\gamma$ t40 signifikant vermindert war. Eine leicht verminderte Expression von IL-17F konnte auch nach Transfektion mit der siRNA ROR $\gamma$ t44 nachgewiesen werden (Abbildung 38).

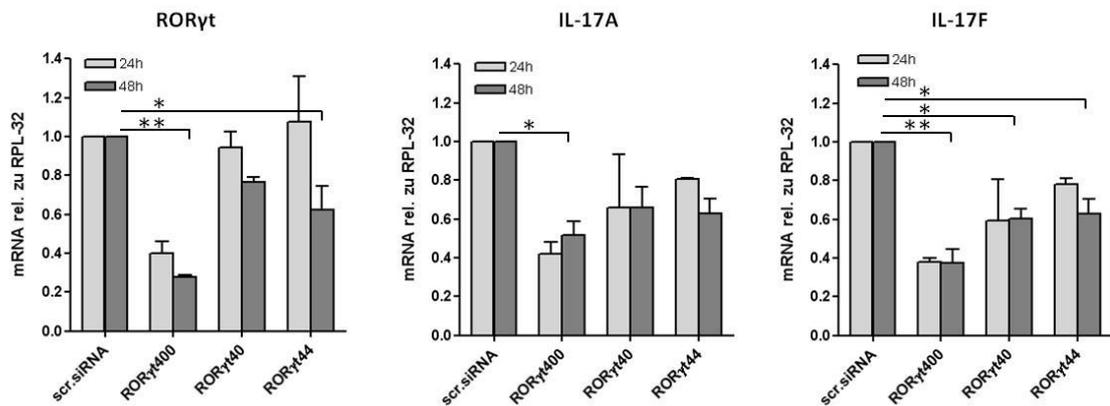


Abbildung 38: Einfluss von RORγt-spezifischer siRNA auf die Expression von RORγt sowie IL-17A und IL-17F in transfizierten Th17-Zellen nach 24 und 48 Stunden. Die RORγt- (links) IL-17A- (mitte) und IL-17F- (rechts) Expression wurde wie in 2.15.2. beschrieben mittels Real-time PCR gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Expression in den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen (scr.siRNA) wurde gleich 1 gesetzt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### 3.2.5 Die lokale Applikation von RORγt-spezifischer siRNA lindert neutrophiles Asthma bei der Maus

Aus insgesamt drei theoretisch funktionierenden RORγt-spezifischen siRNAs für die murine RORγt-mRNA wurde mittels Expressionsanalysen die *in-vitro* aktivste siRNA ausgewählt. Es handelte sich um die RORγt-spezifische siRNA400 (RORγt400). In den nächsten Experimenten wurde nun die therapeutische Wirksamkeit dieser siRNA in einem Mausmodell des neutrophilen Asthma untersucht. Dafür wurden weibliche C57BL/6J Mäuse im Alter von 8-10 Wochen nach Protokoll 2.2.4. gegen das Modelallergen Ovalbumin zusammen mit LPS als Adjuvans sensibilisiert und anschließend mit einem 1%-igen OVA-Aerosol provoziert. Die intratracheale Applikation der siRNA erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 jeweils vor der OVA-Challenge. Als Kontrolle wurde auch hier eine unspezifische „scrambled siRNA“ verwendet. 24 Stunden nach der letzten OVA Provokation erfolgte die Analyse. Um den Phänotyp des neutrophilen Asthmas in der Maus zu charakterisieren, wurden neben der Atemwegsreagibilität, verschiedene Leukozytensubpopulationen in der BAL, die Lungenhistologie sowie pro-inflammatorische Zytokine in der BAL Flüssigkeit analysiert.

Als erstes wurde am anästhesierten Tier eine invasive Lungenfunktionsbestimmung mittels Buxco Finepoint-System durchgeführt und die Atemwegsreagibilität gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin bestimmt. Als Negativkontrollgruppen dienten die Versuchstiere der PBS- (i.t. Applikation von PBS), der PBS-Kontroll-siRNA (i.t. Applikation einer unspezifischen siRNA) und der PBS-ROR $\gamma$ t400-Gruppe (i.t. Applikation der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA). Hierbei zeigt sich, dass keine der Gruppen nach Provokation mit 100 mg/ml Metacholin eine Atemwegshyperreagibilität aufwies (*Resistance*: PBS  $1,3 \pm 0,2$  cmH $_2$ O/l/s; PBS-Kontrolle  $1,6 \pm 0,4$   $1,3 \pm 0,2$  cmH $_2$ O/l/s; PBS-ROR $\gamma$ t  $1,3 \pm 0,3$   $1,3 \pm 0,2$  cmH $_2$ O/l/s). Im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppen war bei den Gruppen, die als Positivkontrollgruppen dienten (*Resistance*: OVA  $1,9 \pm 0,3$ ; OVA-Kontroll-siRNA:  $2,2 \pm 0,4$  cmH $_2$ O/l/s), eine erhöhte Atemwegsreagibilität zu beobachten. In der OVA-Gruppe, die mit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA (OVA-ROR $\gamma$ t400) behandelt wurde, konnte im Vergleich zu den OVA-Kontrollgruppen eine deutliche, jedoch nicht signifikant verminderte AHR gemessen werden (*Resistance*:  $1,3 \pm 0,3$  cmH $_2$ O/l/s) (Abbildung 39).

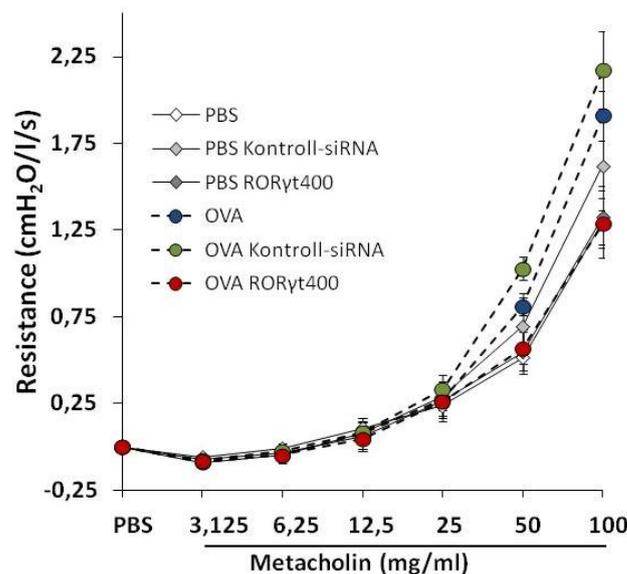


Abbildung 39: Einfluss von ROR $\gamma$ t400 auf die Atemwegsreagibilität. Wildtyp-Mäuse (n=5-8) wurden wie in 2.2.4. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation der siRNAs erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Resistance (angegeben als cmH $_2$ O/l/s) gegenüber steigenden Konzentrationen an Metacholin (0,3125-100 mg/ml) mittels Buxco Finepoint RC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Mittelwerte wurden zum Zeitpunkt der PBS-Vernebelung gleich 0 gesetzt.

Bei der Differenzierung der Leukozytenpopulationen in der BAL zeigt sich, dass diese in den PBS-Negativkontrollgruppen überwiegend aus Makrophagen (PBS:  $2,1 \times 10^4 \pm$

$0,06 \times 10^4$ ; PBS-Kontrolle:  $2,0 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ; PBS-ROR $\gamma$ t400:  $2,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ ) und nur ganz wenigen eosinophilen Granulozyten bestand. Im Vergleich zu den Negativkontrollgruppen konnte in der BAL der Asthmakontrollgruppe (OVA) sowie der OVA-Gruppe mit der Kontroll-siRNA (OVA-Kontrolle) eine erhöhte Anzahl an Makrophagen (OVA:  $5,0 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ ; OVA-Kontrolle:  $3,6 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) als auch an Lymphozyten (OVA:  $2,0 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ ; OVA-Kontrolle:  $1,6 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ ) und neutrophilen Granulozyten (OVA:  $7 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$ ; OVA-Kontrolle:  $6,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ ) detektiert werden. Während die Makrophagen in der OVA-ROR $\gamma$ t400 keine Veränderungen in der Zellzahl ( $3,8 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ ) zeigten, konnte im Vergleich zu den OVA-Kontrollgruppen eine deutlich verminderte Anzahl an Lymphozyten ( $1 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ ) sowie eine signifikant verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten ( $1,6 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ ) beobachtet werden. Eosinophile Granulozyten waren in den OVA-Gruppen nur vereinzelt zu finden (Abbildung 40).

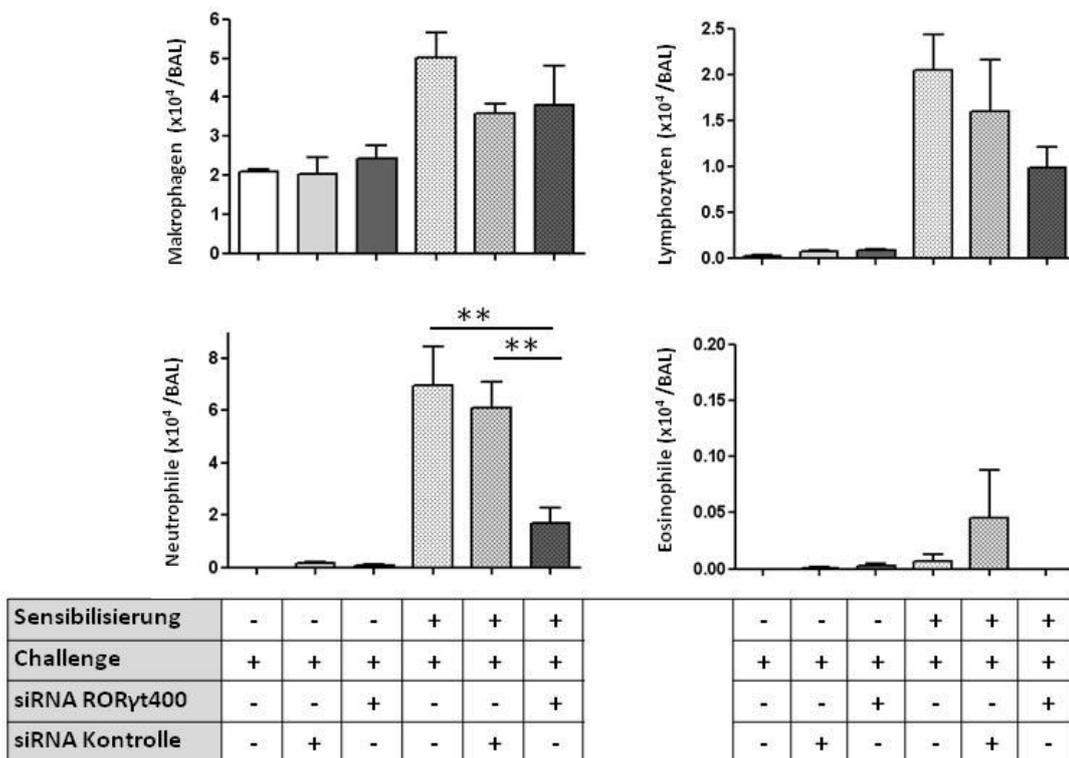


Abbildung 40: Einfluss von ROR $\gamma$ t400 auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL). Wildtyp-Mäuse (n=3-6) wurden wie in 2.2.4. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation der siRNAs erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*p<0,01).

Auch in lungenhistologischen Präparaten der OVA- und der OVA-Kontroll-Gruppe zeigten sich in der HE-Färbung eine deutlich erhöhte Anzahl an infiltrierenden Zellen um die Atemwege und die Gefäßwand. In der OVA-RORyt400-Gruppe hingegen war der Influx von Entzündungszellen stark verringert. Die Atemwege und Gefäße der PBS-Kontrollgruppen waren ebenfalls frei von infiltrierenden Entzündungszellen (Abbildung 41). Da in diesem Mausmodell nur vereinzelt Mukus-produzierende Becherzellen beobachtet werden konnten (Abbildung 28), wurde auf eine PAS-Färbung verzichtet.

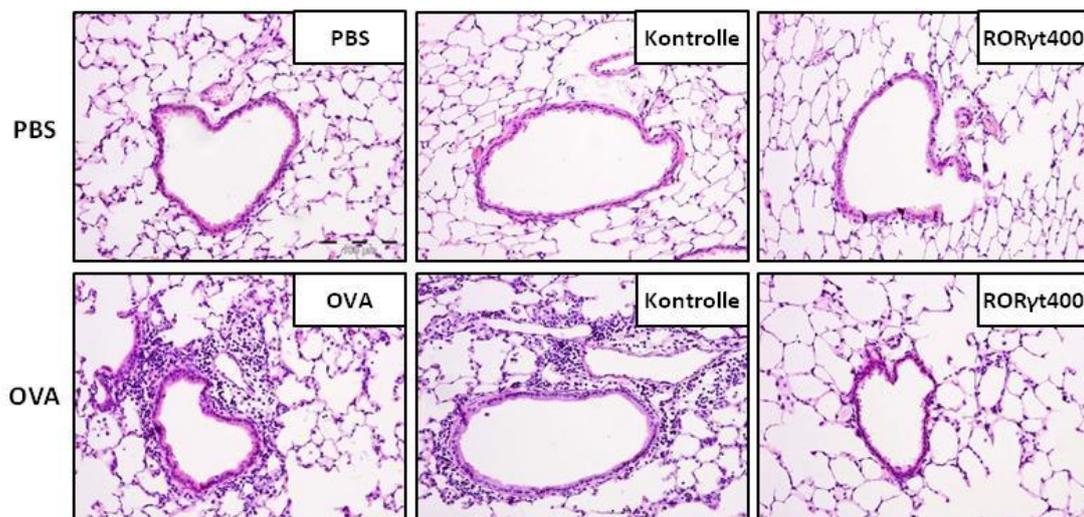


Abbildung 41: Einfluss von RORyt400 auf die Atemwegsentzündung Wildtyp-Mäuse (n=6) wurden wie in 2.2.4. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation der siRNAs erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 des Protokolls intratracheal (i.t.). 24 Stunden nach der letzten Challenge wurde die Lungen mittels Formalin entfaltet, fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Charakterisierung der Atemwegsentzündung wurden die Paraffinschnitte mit HE angefärbt.

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der Entzündung in der Lunge wurden verschiedene pro-inflammatorische Zytokine in der BALF mittels CBA untersucht. Dafür wurde die Konzentration der Th17-spezifischen Zytokine IL-17A und TNF- $\alpha$  sowie von KC gemessen, welches mitverantwortlich ist für die chemotaktische Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge. Während in der BALF der Versuchstiere aus der OVA- und der OVA-Kontrollgruppe im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppen erhöhte Konzentrationen an IL-17A (OVA:  $440,9 \pm 120,2$  fg/ml; OVA-Kontrolle:  $427,9 \pm 184,7$  fg/ml), TNF- $\alpha$  (OVA:  $98,5 \pm 83,7$  pg/ml; OVA-Kontrolle:  $78,1 \pm 46,2$  pg/ml) und KC (OVA:  $34,6 \pm 17,5$  pg/ml; OVA-Kontrolle:  $34,4 \pm 17,9$  pg/ml) gemessen werden konnte, waren die IL-17A Level in der BALF der OVA-RORyt400-Gruppe mit  $30,2 \pm 10,5$  fg/ml im Vergleich zur OVA-Gruppe signifikant vermindert. Auch bei TNF- $\alpha$  ( $1,5 \pm 0,3$  pg/ml) und

KC ( $4,9 \pm 2,0$  pg/ml) konnten in der der OVA-RORyt400-Gruppe eine tendentiell verminderte Konzentrationen detektiert werden (Abbildung 42).

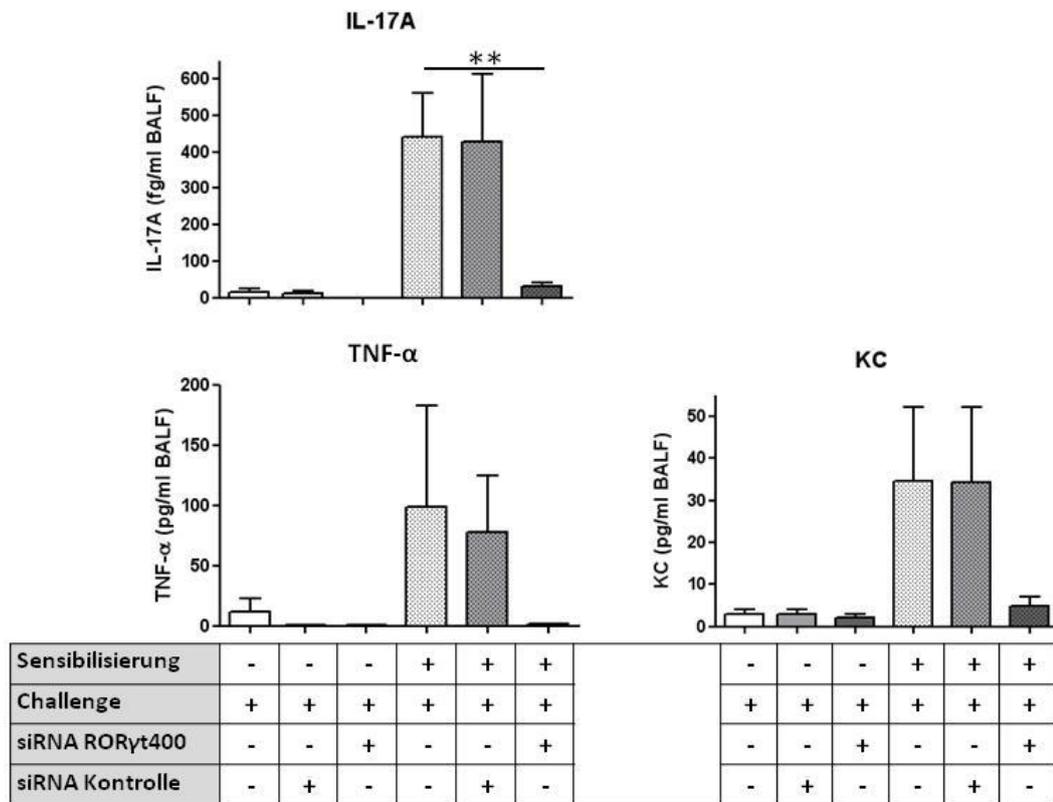


Abbildung 42: Einfluss von RORyt400 auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Wildtyp-Mäuse ( $n=3-6$ ) wurden wie in 2.2.4. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend provoziert. Die lokale Applikation der siRNAs erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 des Protokolls intratracheal (i.t.). Die IL-17A, TNF- $\alpha$  und KC Level wurden mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\* $p<0,01$ ).

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Targets für die therapeutische Behandlung des Asthma bronchiale zu identifizieren. Dabei wurde der Fokus auf zwei Mediatoren gelegt, die innerhalb der Immunpathogenese des Asthmas auf unterschiedliche Weise einen Einfluss auf die Entzündung und damit möglicherweise auf die Ausbildung des eosinophilen oder neutrophilen Asthmas haben.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Peptidhormons  $\alpha$ -MSH auf die Pathogenese des eosinophil-dominierten experimentellen Asthmas untersucht. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass  $\alpha$ -MSH *in-vivo* eine immunsuppressive Wirkung auf die Entzündung bei experimentell induzierter Gehirnhautentzündung, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Schuppenflechte und allergischen Hautentzündungen ausübt<sup>45-48</sup>. Neben dem natürlich-vorkommenden Melanokortin  $\alpha$ -MSH zeigen auch synthetisch hergestellte  $\alpha$ -MSH Analoga ähnliche anti-inflammatorische Effekte im Tiermodell<sup>69,70</sup>. Als Peptidhormon mit anti-inflammatorischer Wirkung scheint  $\alpha$ -MSH somit als potentieller Regulator zu agieren, der das Ungleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischen Entzündungsfaktoren, das im Zuge der Entzündung entsteht, ausgleichen kann.

Aufgrund der Annahme, dass  $\alpha$ -MSH als natürlicher Modulator eine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt, wurde die Hypothese überprüft, dass  $\alpha$ -MSH auch in der Lunge beim experimentellen Asthma bronchiale gebildet wird. Dafür wurden die  $\alpha$ -MSH Level in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von unbehandelten Mäusen sowie Mäusen mit akutem oder chronischem, experimentellem Asthma gemessen. Nach akuter sowie nach chronischer Allergenexposition kam es bei den Tieren zu einem signifikanten Anstieg der endogenen  $\alpha$ -MSH Konzentration in der BALF. Eine ebenfalls erhöhte Produktion von  $\alpha$ -MSH wurde bisher unter anderem bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen<sup>71</sup>, Herzinsuffizienz<sup>72</sup> und myalgischer Enzephalomyelitis<sup>73</sup> (chronic fatigue syndrom, CFS) gemessen. Diese Studien zeigten, dass die erhöhten  $\alpha$ -MSH Konzentrationen generell mit einem reduzierten Fortschreiten der Erkrankungen assoziiert waren. Auch Raap et al. konnten in der BALF von unbehandelten Mäusen und Mäusen mit experimentellem Asthma noch 1 bis 16 Tage nach der letzten Allergen-Challenge  $\alpha$ -MSH nachweisen.

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten sich dort in der Asthmagruppe jedoch keine erhöhten, sondern reduzierte  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der Lunge<sup>50</sup>. Während  $\alpha$ -MSH ursprünglich als Neurohormon der Hypophyse beschrieben wurde, ist inzwischen bekannt, dass unterschiedlichste Zelltypen das Vorläuferhormon POMC produzieren und  $\alpha$ -MSH freisetzen können. In der Haut wird das Peptidhormon unter anderem in Keratinozyten, Melanozyten, Endothelzellen, T-Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten exprimiert<sup>74</sup>. Welche Zellen in der Lunge für die  $\alpha$ -MSH Produktion verantwortlich sind, ist bisher nicht genau bekannt gewesen. Um zu untersuchen, welche Zellen an der Produktion von  $\alpha$ -MSH beteiligt sind, wurden Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma sowie die infiltrierenden Zellen der broncho-alveolären Lavage immunhistochemisch gegen  $\alpha$ -MSH gefärbt. Es stellte sich heraus, dass  $\alpha$ -MSH in der asthmatischen Lunge insbesondere von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie vom Atemwegsepithel produziert wird. Gerade im Atemwegsepithel war bei den Tieren mit chronischem Asthma eine deutlich vermehrte  $\alpha$ -MSH Produktion zu beobachten. Die Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH beim Asthma bronchiale gebildet wird, kann somit bestätigt werden. Die erhöhten Konzentrationen deuten darauf hin, dass dieses Peptid entweder zu einer kompensatorischen Reaktion befähigt ist, wodurch die Entzündung verringert werden könnte oder aber auch zur Pathogenese beiträgt. Die Wirkung von  $\alpha$ -MSH in der Lunge sowie der Mechanismus, über den das Peptidhormon wirkt, sind bisher nicht vollständig geklärt und sollten in den folgenden Studien untersucht werden.

Die Beobachtung, dass das anti-inflammatorisch wirkende Peptidhormon in der Lunge von Mäusen mit experimentellem Asthma nachgewiesen wurde und dort im Vergleich zu unbehandelten Mäusen stark erhöht ist, führt nun zunächst zu der Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH einen protektiven Einfluss auf die Ausbildung des Asthma bronchiale hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Mäusen mit experimentellem Asthma  $\alpha$ -MSH an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils vor der Aerosol-Challenge intratracheal appliziert. Als Asthmakontrollgruppe dienten Mäuse, die nur PBS appliziert bekamen. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH die Anzahl der in die Lunge eingewanderten eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten signifikant verringert hat.  $\alpha$ -MSH hatte zudem einen protektiven Einfluss auf die AHR und die Mukusproduktion bei diesen

Tieren. Die Daten stützen somit die Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH einen protektiven Einfluss auf die Ausbildung des Asthma bronchiale hat.

Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung von  $\alpha$ -MSH im Mausmodell für das experimentelle Asthma, sollte anschließend untersucht werden, ob dieser Effekt durch eine Neutralisierung von  $\alpha$ -MSH ausbleibt und somit eine verstärkte Entzündungsreaktion auftritt. Dafür wurde den Mäusen jeweils vor der Aerosol-Challenge ein polyklonaler anti- $\alpha$ -MSH Antikörper intraperitoneal appliziert. Als Asthmakontrollgruppe dienten Mäuse, die einen Kontroll-Antikörper appliziert bekamen. Hier zeigte sich, dass im Vergleich zur Asthmakontrollgruppe keine Unterschiede in der AHR und der Mukusproduktion beobachtet werden konnten. Dennoch kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Lymphozyten sowie der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in der BAL. Da sich das experimentelle Asthma durch die Applikation des  $\alpha$ -MSH Antikörpers nicht verbessert hat, widersprechen diese Daten der Hypothese, dass die erhöhten  $\alpha$ -MSH Spiegel zur Pathogenese beitragen. Das endogen gebildete  $\alpha$ -MSH scheint jedoch nur einen leichten Einfluss auf die Entzündungszellen zu haben. Die Daten lassen vermuten, dass die  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL der Mäuse nicht ausreichen, um das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren auszugleichen und den Asthma-Phänotyp zu verbessern. Eine kompensatorische Wirkung kann jedoch durch die lokale Gabe von  $\alpha$ -MSH erreicht werden.

Auch die in der Literatur beschriebenen Wirkungen von  $\alpha$ -MSH auf die Lunge stehen im Einklang mit einer Einordnung von  $\alpha$ -MSH als anti-inflammatorischer Faktor. So führte die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH bei einer durch Bleomycin-induzierten Lungenschädigung im Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine in der BALF und einer verminderten Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in die Lunge<sup>75</sup>. Tatsächlich gibt es schon erste Hinweise darauf, dass  $\alpha$ -MSH auch beim Asthma bronchiale die Entzündung in der Lunge vermindert. So konnte in einem Mausmodell für das experimentelle Asthma nach systemischer Applikation von  $\alpha$ -MSH eine verringerte Konzentration von Th2 Zytokinen sowie eine verminderte Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Lunge nachgewiesen werden<sup>50</sup>.

Ein weiteres bedeutendes Merkmal der allergischen Entzündung in der Lunge ist eine erhöhte Anzahl Mukus-produzierender Becherzellen (Becherzellhyperplasie) im Atemwegsepithel. Eine Becherzellhyperplasie kann sowohl bei Asthmatikern mit einem milden, als auch mit einem moderaten und schweren Asthma-Phänotyp nachgewiesen werden, wenngleich die Häufigkeit dieser Zellen beim schweren Asthma deutlich stärker ausgeprägt ist<sup>76</sup>. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass insbesondere die Th2 Zytokine IL-4<sup>77,78</sup>, IL-9<sup>79</sup> und IL-13<sup>80-82</sup> die Expression von Muzinen (MUC) in der Lunge regulieren und mit einer gesteigerten Mukusproduktion und -hypersekretion assoziiert sind. Auch TNF- $\alpha$  kann die Expression von Muzin-Genen, darunter MUC5AC, welches hauptsächlich vom Atemwegsepithel produziert wird, induzieren und so die Mukusproduktion stimulieren<sup>83-86</sup>. Die Expression von MUC5AC wird zudem durch die neutrophile Elastase<sup>87,88</sup> und das von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Wasserstoffperoxid<sup>89</sup> induziert. Die Behandlung der Mäuse mit  $\alpha$ -MSH ging mit einer deutlich verminderten Mukusproduktion einher.  $\alpha$ -MSH hat eine immunmodulatorische Wirkung auf unterschiedliche Zelltypen und inhibiert die Produktion einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$ <sup>90</sup>, IL-4 und IL-13<sup>50</sup>. Die verminderte Mukusproduktion in  $\alpha$ -MSH-behandelten Tieren könnte somit auf die durch  $\alpha$ -MSH verminderte Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 zurückzuführen sein.

Zur Beurteilung des Asthma bronchiale beim Menschen und zur Diagnose einer AHR ist die Messung der Lungenfunktion eine der wichtigsten klinischen Parameter. Eine AHR wird definiert als gesteigerte Empfindlichkeit der Atemwege auf unspezifische Reize, auf die sie mit Konstriktion reagieren. Die Stimulation kann unter anderem vermittelt werden durch die direkte Provokation mit Acetylcholin, Metacholin oder Histamin, aber auch durch physikalische Reize wie kalte Luft oder Anstrengung<sup>91</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Atemwegsreagibilität der Atemwegswiderstand nach Inhalation von MCh mittels Finepoint System RC gemessen. Hier konnte durch die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH in Vergleich zur Asthmakontrollgruppe eine verminderte Atemwegsreagibilität nachgewiesen werden, die jedoch nicht signifikant war. Beim Asthma scheint es einen Zusammenhang zwischen der eosinophilen Entzündung und dem Schweregrad einer AHR zu geben<sup>92,93</sup>. Verschiedene Studien zeigen, dass die eosinophilen Granulozyten durch die Freisetzung von

oxidativen Produkten und Proteinen über ihre Granula mit zur Entwicklung einer AHR beitragen. Bei den Proteinen handelt es sich insbesondere um die eosinophile Peroxidase (EPO), das *major basic protein* (MBP), das eosinophile kationische Protein (ECP) und das *eosinophil-derived* Neurotoxin (EDN). Diese können toxisch auf das Atemwegsepithel wirken und es schädigen<sup>94-96</sup>. Dass  $\alpha$ -MSH einen direkten Einfluss auf die Granula-Proteine der eosinophilen Granulozyten hat, ist bisher nicht beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten eher darauf hin, dass  $\alpha$ -MSH die Aktivität oder das Überleben der eosinophilen Granulozyten an sich beeinflusst. Es gibt jedoch auch Studien, die den direkten Zusammenhang von eosinophilen Granulozyten und der Entwicklung einer AHR widerlegen<sup>66,97,98</sup>. Neben den eosinophilen Granulozyten scheinen auch die Th2 Zytokine IL-4<sup>98</sup> und IL-13<sup>80,81,99</sup> sowie TNF- $\alpha$ <sup>100,101</sup> eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer AHR zu spielen.

$\alpha$ -MSH vermittelt seine Wirkung über die Melanokortinrezeptoren 1-5. Die Rezeptoren unterscheiden sich bezüglich ihrer Bindungsaffinität gegenüber den verschiedenen POMC-Peptiden und werden je nach Gewebe und Zelltyp unterschiedlich exprimiert<sup>37,38</sup>.

Die Frage, über welche Melanokortinrezeptoren  $\alpha$ -MSH seine Wirkung in der Lunge vermittelt, wurde mit Hilfe von Expressionsanalysen sowie immunhistochemischen Färbungen untersucht. Die Expressionswerte der verschiedenen Melanokortinrezeptoren zeigen, dass in der murinen Lunge in geringen Mengen MC1R und insbesondere der MC5R exprimiert wird. Die Melanokortinrezeptoren 2-4 konnten weder in mikrodisszierten Atemwegen, noch in Zellen der BAL nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen der Lungenschnitten lassen erkennen, dass MC5R sowohl vom Atemwegsepithel, als auch von den im Infiltrat vorhandenen Zellen gebildet wird. Während MC5R in den Lungenschnitten unbehandelter Mäuse nur sehr schwach exprimiert wird, scheint die Expression des Rezeptors mit Chronifizierung des Asthmas zuzunehmen. Die Daten zur Rezeptorexpression stehen im Einklang mit den Ergebnissen zur Produktion von  $\alpha$ -MSH, dass umso mehr  $\alpha$ -MSH produziert wird, desto länger die allergische Atemwegsentzündung anhält.

Studien an MC5R-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass dieser Rezeptor möglicherweise bei der Thermoregulation eine wichtige Rolle spielt<sup>102</sup>. Die Bedeutung des MC5Rs beim Asthma bronchiale wurde bisher noch nicht untersucht.

Aufgrund der Beobachtung, dass lokal appliziertes  $\alpha$ -MSH die Entzündungsreaktion in der Lunge reduziert und dass dort insbesondere MC5R exprimiert wird, sollte zunächst überprüft werden, welche Rolle MC5R bei der Vermittlung der anti-inflammatorischen Wirkung in der Lunge spielt. Um dies zu untersuchen, wurde MC5R-defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma an zwei hintereinander folgenden Tagen  $\alpha$ -MSH lokal in die Lunge appliziert. Nach Applikation von  $\alpha$ -MSH konnte in diesen Tieren jedoch kein Unterschied in der Anzahl der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie der Mukusproduktion beobachtet werden. Erstaunlicherweise konnte in den Mäusen trotz OVA-Sensibilisierung und anschließender OVA-Provokation auch keine AHR induziert werden. Der Befund, dass durch das Fehlen des MC5Rs die Entzündung in der Lunge nach  $\alpha$ -MSH Applikation nicht vermindert wird, macht deutlich, dass es sich bei dem MC5R höchstwahrscheinlich um den Rezeptor handelt, der die anti-inflammatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH in der Lunge vermittelt.

In Wildtyp-Mäusen führte die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH zu einer signifikanten Reduktion von Entzündungszellen, insbesondere von eosinophilen Granulozyten. Mäuse, denen ein polyklonaler Antikörper gegen das endogen gebildete  $\alpha$ -MSH appliziert wurde, zeigten hingegen eine verstärkte Entzündung mit einer leicht erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten. Um abschließend den Wirkmechanismus von  $\alpha$ -MSH auf diese Zellen zu untersuchen, wurde der Frage nachgegangen, ob  $\alpha$ -MSH einen Einfluss auf die Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten hat.

Dafür wurde die Produktion eosinophil-chemotaktisch wirkender Chemokine und Zytokine in der BALF dieser Tiere gemessen. Die Reduktion der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL könnte unterschiedliche Gründe haben: Zum einen könnte sie auf eine verringerte Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten in die Lunge durch verminderte Eotaxin-1 Level zurückzuführen sein. Eotaxin-1 wird in der asthmatischen Lunge insbesondere von dem Atemwegsepithel, den Muskelzellen, den Makrophagen sowie von eosinophilen Granulozyten selbst nach Stimulation durch Th2 Zytokine produziert und fördert die Migration von Eosinophilen in das Lungengewebe<sup>103</sup>. Tatsächlich war die verringerte Anzahl der eosinophilen Granulozyten nach Behandlung mit  $\alpha$ -MSH mit einer signifikanten Reduktion des Chemokins Eotaxin-1 verbunden. Die immunhistochemischen Färbungen der Lungenschnitte lassen

erkennen, dass MC5R wie auch Eotaxin-1 vor allem vom Atemwegsepithel produziert wird. Die verminderte Eotaxin-Produktion könnte somit auf den Effekt von  $\alpha$ -MSH auf eben diese Zellen beruhen. Die Daten unterstützen somit die Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH zumindest indirekt einen Einfluss auf die Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten in die Lunge hat. Allerdings waren auch in der BALF der mit dem  $\alpha$ -MSH-Antikörper behandelten Tiere verminderte Eotaxin-1 Konzentrationen nachzuweisen. Dies wiederum würde den Schluss zulassen, dass weniger eosinophile Granulozyten in die Lunge infiltrieren. Möglicherweise ist die erhöhte Infiltration von eosinophilen Granulozyten jedoch nicht auf Eotaxin-1, sondern auf weitere eosinophil-chemotaktisch wirkende Zytokine wie GM-CSF oder RANTES zurückzuführen. Während GM-CSF die eosinophilen Granulozyten aktiviert und ihr Überleben fördert, wirkt RANTES chemotaktisch auf die Zellen<sup>104</sup>. Leider konnten die Zytokine nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gemessen werden. Auch in der unbehandelten PBS-Gruppe konnte das Chemokin Eotaxin-1 in der BALF nachgewiesen werden. Die Tiere in dieser Gruppe zeigten weder eine Entzündung in der Lunge, noch eine AHR. Nach Blick in die Literatur hat sich jedoch gezeigt, dass in den Lungen von PBS-Kontrollgruppen je nach verwendetem Maus-Stamm und Protokoll durchaus erhöhte Eotaxin-Level nachzuweisen sind<sup>105,106</sup>.

Alternativ könnte die verminderte Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL durch eine vermehrte Apoptose oder ein verringertes Überleben dieser Zellen in der Peripherie verursacht werden. Daher wurde der Frage nachgegangen, ob  $\alpha$ -MSH einen Einfluss auf das Überleben der eosinophilen Granulozyten hat. Hier spielt das Th2 Zytokin IL-5 eine essentielle Rolle. IL-5 wird fast ausschließlich von Th2 Zellen produziert und ist sowohl für die Reifung der eosinophilen Granulozyten, als auch für die Aktivierung und das Überleben dieser Zellen verantwortlich<sup>107-109</sup>. Die Behandlung der Mäuse mit  $\alpha$ -MSH führte zu einer signifikanten Reduktion von IL-5. Mäusen, denen ein polyklonaler Antikörper gegen das endogen gebildete  $\alpha$ -MSH appliziert wurde, zeigten hingegen erhöhte IL-5 Konzentrationen in der BALF. Die erhöhten IL-5 Level gingen wiederum mit einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten einher. Es ist somit wahrscheinlich, dass  $\alpha$ -MSH auch auf die Th2 Zellen -direkt oder indirekt- einwirkt und ihre IL-5 Produktion hemmt. Die Befunde unterstützen somit auch die Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH das Überleben der eosinophilen Granulozyten beeinflusst. Die

Ergebnisse legen nun auch nahe, dass die verminderte Anzahl dieser Zellen in der Lunge sowohl durch die verminderte Rekrutierung, als auch durch die vermehrte Apoptose bzw. verringertes Überleben verursacht worden sein kann.

Klinische Studien zur Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH beim Menschen existieren nur sehr wenige. Es ist bekannt, dass das Peptidhormon  $\alpha$ -MSH in der Haut aus dem Vorläuferhormon POMC produziert wird und dort nach Bindung an den MC1R die Pigmentierung reguliert, indem es die Melanozyten zur Melaninproduktion aktiviert<sup>110,111</sup>. Der klinische Einsatz von  $\alpha$ -MSH oder  $\alpha$ -MSH Analoga ist daher bislang auf die Dermatologie beschränkt<sup>112</sup>.

Die biologische Funktion von  $\alpha$ -MSH in der humanen Lunge sowie die Expression von Melanokortinrezeptoren in der Lunge oder den Leukozyten der BAL sind bisher noch nicht bekannt. In den Experimenten des ersten Teils dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH als anti-inflammatorischer Regulator in der murinen Lunge Einfluss auf die allergischen Entzündungsprozesse nimmt und dass diese Wirkung hauptsächlich über MC5R vermittelt wird. Auch konnte beobachtet werden, dass dieser Rezeptor umso mehr vom Atemwegsepithel und den infiltrierenden Entzündungszellen gebildet wird, je länger die Atemwegsentszündung anhält. Die kompensatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH scheint die Entzündung zu reduzieren. Daher ist es denkbar, dass  $\alpha$ -MSH bzw. MC5R (z.B. über künstliche Agonisten mit höherer Rezeptoraffinität) durchaus auch als mögliche therapeutische Ziele bei der Behandlung des allergischen Asthma eingesetzt werden könnten. Die Funktion von  $\alpha$ -MSH in der humanen Lunge sowie die Expression der Rezeptoren muss jedoch noch untersucht werden.

Es ist bekannt, dass bei bestimmten Asthma-Phänotypen nicht nur eosinophile, sondern auch neutrophile Granulozyten in die Lunge infiltrieren und das Entzündungsgeschehen beeinflussen<sup>113-115</sup>. Eine Neutrophilie wird insbesondere bei Asthmatikern mit Übergewicht, bei Rauchern, mit akuten und chronischen Infektionen<sup>116</sup> sowie während akuter Exazerbationen<sup>113</sup> und bei Patienten mit schwerem Asthma<sup>117</sup> beobachtet. Neutrophiles Asthma zeichnet sich nicht nur durch anhaltende Beschwerden, sondern durch die persistierende Atemwegsobstruktion auch einer deutlichen Verschlechterung der Lungenfunktion aus<sup>15</sup>.

Die kompensatorische Produktion von z.B.  $\alpha$ -MSH scheint hier nicht mehr auszureichen, um die Entzündungsprozesse zu regulieren.

Klinische Studien haben gezeigt, dass die Verschlimmerung des Asthma-Phänotyps mit einer gesteigerten Infiltration von IL-17A produzierenden Th17 Zellen einhergeht. Die IL-17A Produktion ist insbesondere bei Asthmatikern mit einem schweren Phänotyp stark erhöht<sup>118,119</sup>, deren Symptome trotz hoch dosierter inhalativer Kortikosteroidtherapie nur sehr schlecht kontrolliert werden können<sup>119</sup>. Es ist daher denkbar, dass die vermehrte Beteiligung von Th17 Zellen zur weiteren Verschiebung des oben genannten Gleichgewichts beiträgt. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der mögliche Einfluss des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t auf die Pathogenese des experimentellen neutrophilen Asthmas untersucht. ROR $\gamma$ t gilt als „Masterregulator“ der Th17 Zellen und ist maßgeblich sowohl an der Differenzierung dieser Zellen, als auch an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt<sup>61,62</sup>. Während die i.p. Sensibilisierung mit Alum als Adjuvans bei der Maus seit Jahren zur Induktion und Charakterisierung der Th2-vermittelten Immunantwort genutzt wird, haben Wilson et al. ein Modell entwickelt, bei dem Mäuse durch lokale Applikation von OVA und LPS als Adjuvans über die Atemwege sensibilisiert werden<sup>120</sup>. Dieses Asthma-Modell zeichnet sich durch eine große Anzahl an Th17 Zellen sowie neutrophilen Granulozyten in der Lunge aus. Um zu überprüfen, ob ROR $\gamma$ t bei der Entwicklung einer neutrophilen Entzündungsreaktion beteiligt ist, wurde das von Wilson et al. beschriebene Modell für das neutrophile Asthma<sup>120</sup> adaptiert, angewendet und charakterisiert. Dafür wurde zunächst bei Wildtyp-Mäusen durch Sensibilisierung gegen OVA zusammen mit LPS als Adjuvans und anschließender OVA-Provokation ein neutrophiles Asthma induziert. In dem von Wilson et al. beschriebenen Modell wurden die Mäuse 7 Tage nach der letzten Sensibilisierung einmalig mit einem OVA-Aerosol provoziert und anschließend direkt analysiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die OVA-Provokation an zwei aufeinander folgenden Tagen, die Analyse 24 Stunden nach der letzten OVA-Provokation. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse verwendet, denen nur PBS in die Atemwege appliziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensibilisierung mit LPS als Adjuvans sowohl einen Einfluss auf die Anzahl der Entzündungszellen, als auch auf die AHR hat. Weiterhin kam es zu einer erhöhten Produktion von Th17 Zellen in der Lunge und einer vermehrten Expression Th17-

spezifischer und allgemein pro-inflammatorischer Zytokine im Lungenhomogenat dieser Tiere. Ein Einfluss auf die Mukusproduktion war nicht zu beobachten.

Nach Differenzierung der Leukozyten in der BAL konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Makrophagen, der Lymphozyten und der neutrophilen Granulozyten in der Lunge signifikant gesteigert war. Die Ergebnisse sind im Einklang mit den Daten von Wilson et al.<sup>120</sup>. Eisenbach et al. haben zudem gezeigt, dass LPS dosisabhängig unterschiedliche experimentelle Asthma-Phänotypen induzieren kann. Während in der Arbeit von Eisenbach et al. geringe Mengen LPS essentiell für die Ausbildung einer Th2-Antwort waren, führte eine Applikation von erhöhten Mengen LPS zu einer Th1-assoziierten Immunantwort, bei der neutrophile Granulozyten in der Lunge dominierten<sup>121</sup>.

Neutrophile Granulozyten spielen eine essentielle Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Pilzen und Bakterien. Sie können jedoch nach ihrer Aktivierung über reaktive Sauerstoffspezies und Granulaproteine auch Einfluss auf die Entzündungsreaktion in der Lunge nehmen und zur Zerstörung der Gewebe beitragen. Die Granula dieser Zellen enthalten neben Myeloperoxidasen und Defensinen, eine Reihe verschiedener Proteasen wie die neutrophile Elastase<sup>122</sup>. Verschiedene Studien zeigten, dass die neutrophile Elastase maßgeblich an der Epithelschädigung<sup>123</sup> sowie an der erhöhten vaskulären Permeabilität<sup>124,125</sup> beim Asthma bronchiale beteiligt ist.

Neben den eosinophilen Granulozyten scheinen auch neutrophile Granulozyten einen Einfluss auf die Entwicklung einer AHR zu haben. So konnte in Asthma-Modellen mit einer Neutrophilen-dominierten Entzündungsreaktion eine AHR nachgewiesen werden<sup>120,126</sup>. *In-vitro* und *in-vivo* Studien deuten darauf hin, dass die Wirkung der neutrophilen Granulozyten auf die Atemwegsreagibilität insbesondere durch die neutrophile Elastase<sup>127</sup> sowie durch die freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies<sup>128</sup> vermittelt wird. Zudem konnte in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass auch das im OVA enthaltende LPS die Entwicklung einer AHR verstärken kann. Die verstärkte AHR war dabei mit einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten assoziiert<sup>129</sup>. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Ergebnissen der oben genannten Studien. Die mit LPS als Adjuvans gegen OVA sensibilisierten Mäuse entwickelten eine leichte AHR, die bei der zur Verfügung stehenden Tierzahl allerdings nicht den Level der Signifikanz erreicht hat.

Die bisher in der Literatur beschriebene Wirkung von LPS auf die Mukusproduktion hängt stark von der eingesetzten Menge sowie dem Zeitpunkt der Analyse ab. Während die Sensibilisierung mit geringen Mengen LPS (0,1 µg) die Mukusproduktion im experimentellen Asthma-Modell stimuliert, sind nach Sensibilisierung mit hohen Mengen LPS (100 µg) keine Mukus-produzierenden Zellen nachzuweisen<sup>121</sup>. In nicht-asthmatischen Tieren führte die lokale Applikation von 100 µg LPS zu einer erhöhten Expression des Muzins MUC5AC mit einer maximalen Expression an Tag 4 nach LPS-Applikation. Eine erhöhte Mukusproduktion in den Atemwegen war jedoch erst 7 Tage nach der LPS-Gabe zu beobachten<sup>130</sup>. Die Tatsache, dass bei den in der vorliegenden Arbeit mit LPS sensibilisierten Mäuse nur vereinzelt Mukus-produzierende Zellen nachzuweisen waren, könnte daran liegen, dass zur Sensibilisierung dieser Tiere eine LPS-Dosis von 15 µg eingesetzt wurde, die zwischen den in der ersten Studie genannten Mengen lag. Dennoch stehen die Ergebnisse nicht im Einklang mit den von Wilson et al. beobachteten Effekte. Nach oropharyngealer Sensibilisierung mit 15 g LPS und OVA sowie anschließender OVA-Provokation konnte diese Arbeitsgruppe im Gegensatz zu den Daten der hier vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Anzahl an Mukus-produzierenden Zellen nachweisen<sup>66</sup>. Die Gründe für diese Diskrepanz sind unklar.

Für die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in die Lunge sind verschiedene Chemokine und Zytokine von Bedeutung. Bei der Maus wird die Rekrutierung im Wesentlichen über KC (CXCL1), IL-6 und TNF-α reguliert<sup>131</sup>. Klinische Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration dieser neutrophil-chemotaktischen Zytokine und Chemokine auch bei Asthmatikern mit einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten assoziiert ist<sup>132</sup>. Zudem konnte bei diesen Patienten eine erhöhte IL-17A Produktion in der BALF und im Sputum nachgewiesen werden<sup>132,133</sup>. Die Hypothese, dass auch IL-17A zu einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beitragen kann, wurde *in-vitro* sowie *in-vivo* überprüft. Die Rekrutierung und Akkumulation der neutrophilen Granulozyten wird dabei indirekt durch IL-17A reguliert. Es ist bekannt, dass IL-17A die Strukturzellen der Atemwege zur Sekretion pro-inflammatorischen Zytokine und Neutrophilen-aktivierender Zytokine stimuliert<sup>55,134,135</sup>. Des Weiteren ist die IL-17A-induzierte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten mit einer Zunahme proteolytische Enzyme wie der neutrophile Elastase und unterschiedlicher Matrix-

Metalloproteasen (MMP) assoziiert<sup>59,136</sup>. Die Expression sowohl von TNF- $\alpha$  und KC, als auch der Th17-spezifischen Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-21 war im Lungenhomogenat der OVA/LPS sensibilisierten Mäuse stark erhöht.

IL-17A hat jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Atemwegsentzündung, sondern auch auf die Atemwegsreagibilität. So ist der Transfer von IL-17A-überexprimierenden Adenoviren in einem Mausmodell für das experimentelles Asthma mit einem signifikanten Anstieg des Atemwegswiderstandes nach MCh-Provokation verbunden<sup>137</sup>. IL-17A-defiziente Mäuse entwickelten dagegen keine AHR<sup>138</sup>. Kudo et al. konnten außerdem zeigen, dass IL-17A die Entwicklung einer AHR durch die direkte Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur vermittelt<sup>139</sup>. Zudem stimuliert IL-17A die Expression von Muzinen wie MUC5AC und MUC5B, die von Mukus-produzierenden Becherzellen gebildet werden, *in-vitro* in murinen und humanen Bronchialepithelzellen<sup>140,141</sup>.

Neben den Th17-assoziierten Zytokinen IL-17A und IL-17F zeichnen sich Th17 Zellen noch durch weitere zellspezifische Marker aus, die bei der Differenzierung dieser Zellen eine Rolle spielen. Einer dieser Marker ist der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t. Die OVA/LPS sensibilisierten Mäuse zeigten im Vergleich zu den PBS-Mäusen eine erhöhte Expression von ROR $\gamma$ t im Lungenhomogenat. Tatsächlich konnte auch in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Expression von ROR $\gamma$ t in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) von Asthmatikern erhöht ist<sup>142,143</sup>.

Aufgrund der gesteigerten Expression Th17-spezifischer Zytokine und Marker und der erhöhten Anzahl an Th17 Zellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ROR $\gamma$ t als spezifischer Transkriptionsfaktor der Th17 Zellen die Ausbildung einer neutrophilen Entzündung in der Lunge reguliert.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden homozygote ROR $\gamma$ t tg Mäuse verwendet. In diesen Tieren wird GFP unter der Kontrolle des ROR $\gamma$ t-Promotors exprimiert, was einem funktionellen ROR $\gamma$ t Knockout gleicht<sup>68</sup>. ROR $\gamma$ t-tg Tiere sind daher nicht fähig, reife, pro-inflammatorische Th17 Zellen zu generieren. Bei diesen Tieren war es nicht möglich, nach lokaler Applikation von OVA eine AHR auszulösen. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeichnete sich das experimentelle Asthma durch eine leicht verminderte Anzahl an Entzündungszellen aus. Während die Makrophagen und

neutrophilen Granulozyten in der BAL signifikant reduziert waren, war eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten zu beobachten. Der funktionelle ROR $\gamma$ t Knockout ging zudem mit einer verminderten Expression von Th17-assoziierten Markern und Zytokinen sowie allgemein pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen einher. Wie auch bei den Wildtyp-Tieren konnten bei den ROR $\gamma$ t-tg Mäusen nur vereinzelt Mukusproduzierende Zellen detektiert werden.

Über die genaue Rolle von ROR $\gamma$ t beim experimentellen Asthma ist noch nicht viel bekannt. In einem Mausmodell für das eosinophil-dominierte allergische Asthma ging eine Überexpression von ROR $\gamma$ t mit einer gesteigerten Infiltration von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten sowie IL-17A, TNF- $\alpha$  und KC Konzentration in die Lunge einher<sup>65</sup>. ROR $\gamma$ t-tg Mäuse entwickelten dagegen einen Asthma-Phänotyp, der sich im Vergleich zum Wildtyp durch eine gesteigerte Anzahl an Lymphozyten und eine verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten auszeichnet<sup>64</sup>. Der Atemwegswiderstand wurde in keiner der beiden Studien durch ROR $\gamma$ t beeinflusst. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Ergebnissen der letztgenannten Studie, wobei hier keine AHR ausgelöst werden konnte. Die Beobachtung, dass ein (funktioneller) ROR $\gamma$ t Knockout zu einer verminderten Expression allgemein pro-inflammatorischer und Th17-assoziiierter Zytokine und Marker sowie einer verminderten Anzahl neutrophiler Granulozyten führt, zeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale einnimmt und ein Zielgen für die Behandlung des neutrophilen Asthmas darstellen könnte.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Behandlungsstrategie für das neutrophile Asthma entwickelt, mit der ROR $\gamma$ t und somit die pro-inflammatorischen Th17 Zellen neutralisiert werden sollte. Die hier verwendete Behandlungsstrategie beruht auf der Antisense-Technologie. Dabei handelt es sich um eine Technik, bei der Antisense-Moleküle spezifisch an die mRNA der Zielsequenz binden und die Expression dieses Gens durch Zerschneiden oder Degradation der mRNA inhibieren<sup>144</sup>. Zur ROR $\gamma$ t-spezifischen Inhibierung wurden DNAsyme und siRNAs verwendet.

Auf Grundlage der gewonnenen Daten wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass sich die pro-inflammatorische Wirkung der Th17 Zellen durch die Verringerung der ROR $\gamma$ t-Produktion *in-vitro* als auch *in-vivo* neutralisieren lässt.

Um die RORyt-Produktion zu inhibieren, wurden zunächst 13 RORyt-spezifische DNAzyme generiert und bezüglich ihrer Wirksamkeit *in-vitro* getestet. Dafür wurden OVA-spezifische Th17 Zellen *in-vitro* mit den DNAzymen transfiziert. Als Kontrolle wurde ein unspezifisches DNAzym verwendet, das nicht an die murine RNA bindet. DNAzyme sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die die katalytische Aktivität besitzen, RNA zu spalten. Sie wurden erstmals 1994 von Breaker und Joyce beschrieben<sup>145</sup>. In den folgenden Jahren wurde ein sogenanntes 10-23 DNAzym entwickelt, welches eine Magnesium ( $Mg^{2+}$ )-abhängige RNA-spaltende Aktivität besitzt und in biologischen Systemen eingesetzt werden konnte. 10-23 DNAzyme bestehen aus einer 15-Nukleotid-langen katalytischen Domäne mit zwei Seitenarmen, die spezifisch an die Ziel-mRNA binden können. Nach Bindung der Seitenarme an die mRNA durch Watson-Crick-Basenpaarbindung erfolgt die Spaltung der RNA-Phosphoester vorzugsweise zwischen einem Purin und Pyrimidin<sup>146</sup>. Das Einbringen der DNAzyme erfolgte mittels Elektroporation. Die Elektroporation ermöglicht es, fremde DNA oder RNA in eine Zelle einzuschleusen, indem die Zellmembran dieser Zelle durch einen kurzen elektrischen Impuls vorübergehend permeabel gemacht wird<sup>147</sup>. Durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten DNAzymen konnte nach Transfektion der *in-vitro* generierten Th17 Zellen zudem die Transfektionseffizienz gemessen werden. Trotz der recht hohen Transfektionsrate von 60% konnte jedoch keine Verminderung der RORyt Expression nachgewiesen werden. DNAzyme sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die zunächst *in-silico* anhand von möglichen Schnitt- und Bindungsstellen entworfen werden. Die Funktionalität dieser DNAzyme muss darauf in der Zelle, wo die Ziel-RNA in sekundärer und tertiärer Struktur vorliegt, erst überprüft werden. Ist die sterische Zugänglichkeit des DNAzyms zu seiner Zielsequenz behindert, kann keine Bindung an die RNA erfolgen. Eben diese Struktur der zellulär vorliegenden RNA wird wahrscheinlich der Hauptgrund gewesen sein, weshalb keine Wirkung zu beobachten war.

Um die RORyt-Produktion dennoch in *in-vitro* generierten Th17 Zellen zu vermindern, wurde die siRNA-Technik als weitere Antisense-Strategie getestet. Dafür wurden OVA-spezifische Th17 Zellen mit drei verschiedenen RORyt-spezifischen siRNAs transfiziert. Auch hier wurde zur Kontrolle eine unspezifische siRNA verwendet, die nicht an die murine RNA binden kann. Bei siRNAs handelt es sich um 21-23 Nukleotid-lange doppelsträngige RNA (dsRNA)-Moleküle, die sich in der Zelle mit einem

Multiproteinkomplex (RNA-induced silencing complex: RISC) zusammenlagern. Durch Aktivierung des RISC-Komplexes wird die dsRNA entwunden und in Einzelstränge überführt. Der Strang, der komplementär zur Ziel-mRNA ist, kann nun an die Ziel-mRNA binden und diese spalten<sup>144,148</sup>. siRNAs wurden in der Vergangenheit schon häufig erfolgreich zum Knockdown krankheitsrelevanter Gene eingesetzt. Auch die Isoform ROR $\gamma$  konnte schon durch spezifische siRNAs erfolgreich *in-vitro* vermindert werden<sup>149</sup>.

Tatsächlich führte die Transfektion der Zellen mit den siRNAs zu einer Verringerung der ROR $\gamma$ t Expression in den Zellen. Dabei erwies sich die siRNA ROR $\gamma$ t400 als die wirksamste siRNA. Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass ROR $\gamma$ t400 nicht nur einen Einfluss auf die Expression von ROR $\gamma$ t, sondern auch auf die Expression der Th17 assoziierten Zytokine IL-17A und IL-17F hat. ROR $\gamma$ t ist als Th17-spezifischer Transkriptionsfaktor wesentlich für die Differenzierung von Th17 Zellen verantwortlich<sup>61</sup>. Der Knockdown von ROR $\gamma$ t führt dazu, dass keine reifen, pro-inflammatorischen Th17 Zellen mehr generiert werden können<sup>68</sup>. Die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-17A oder IL-17F wird somit inhibiert. Die verminderte Expression dieser Zytokine nach Transfektion mit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA kann demnach auf die Neutralisation der Th17 Zellen zurückgeführt werden.

Die Hypothese, dass ROR $\gamma$ t die pro-inflammatorische Wirkung von Th17 Zellen neutralisiert bzw. vermindert, kann somit zumindest *in-vitro* durch den Einsatz spezifischer siRNAs bestätigt werden. DNAsyme scheinen dagegen keinen Einfluss auf die Wirkung dieser Zellen zu haben.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Therapieansätze, die zur Behandlung des schweren Asthma bronchiale, das mit einer hohen Anzahl an Th17 Zellen assoziiert ist, in Betracht gezogen werden, beziehen sich auf die Inhibierung von Th17-spezifischen Differenzierungsfaktoren, Th17-assoziierten Zytokinen oder IL-17 Rezeptoren. Viele dieser Therapieansätze wurden bereits in klinischen Studien bei Autoimmunerkrankungen sowie beim Asthma bronchiale eingesetzt<sup>53</sup>. So wurde erst vor kurzem in einer klinischen Studie ein IL-17 Rezeptor-Antikörper bei Personen mit moderatem bis schwerem Asthma getestet, der jedoch keine Wirkung zeigte<sup>150</sup>.

Während die eben genannten Behandlungsmethoden jeweils nur einzelne Zytokine bzw. Rezeptoren inhibieren, ist die hier verwendete Behandlungsstrategie mit der

ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA gegen die allgemein pro-inflammatorische Wirkung der Th17 Zellen gerichtet.

Im experimentellen eosinophilen und neutrophilen Asthma-Modell ist bisher noch kein Inhibitor eingesetzt worden, der die ROR $\gamma$ t Aktivität neutralisiert. Da gezeigt werden konnte, dass die *in-vitro* verwendete siRNA ROR $\gamma$ t400 die Expression von ROR $\gamma$ t sowie der Th17 assoziierten Zytokine IL-17A und IL-17F verringert, wurde diese anschließend in einem *in-vivo* Versuch eingesetzt. Um die Wirksamkeit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA *in-vivo* zu testen, wurde das in 2.2.4. beschriebene Protokoll zur Induktion eines neutrophilen Asthmas verwendet. Zusätzlich wurde den Mäusen an drei aufeinander folgenden Tagen, beginnend 24 Stunden vor der ersten OVA-Challenge, die ROR $\gamma$ t-spezifische siRNA lokal appliziert. Die Kontrollgruppen wurden mit einer unspezifischen, sogenannten scrambled siRNA behandelt, die nicht an die murine siRNA bindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Mäuse mit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA eine signifikante Reduktion der Entzündungszellen zur Folge hatte. Die Behandlung ging zudem mit einer verminderten Konzentration von pro-inflammatorischen Mediatoren in der BALF sowie einer verringerten AHR einher. Ferner führte die Behandlung mit der scrambled und ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA in den Kontrollgruppen zu keiner Erhöhung von Entzündungsmediatoren.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass durch die Behandlung der Mäuse mit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA der Phänotyp des experimentellen neutrophilen Asthmas deutlich verbessert wurde. In verschiedenen Studien wurde bereits belegt, dass ROR $\gamma$ t wesentlich an der Differenzierung der Th17 Zellen beteiligt ist<sup>61,62</sup>. Die verwendete siRNA wurde so konstruiert, dass sie spezifisch an die mRNA von ROR $\gamma$ t bindet und diese theoretisch spaltet. Dies hätte zur Folge, dass in der Maus weniger reife Th17 Zellen ausgebildet bzw. dass die Zellen in ihrer Funktion ganz neutralisiert werden. Die Wirkung der siRNA auf die ROR $\gamma$ t Expression und die Anzahl der Th17 Zellen in der Lunge konnte nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die Konzentrationen der Th17-assoziierten Zytokine IL-17A und TNF- $\alpha$  in der BALF der behandelten Tiere deutlich reduziert waren. Th17 Zellen vermitteln ihre Wirkung vor allem durch das Sezernieren verschiedener Zytokine. Neben den Effektorzytokinen IL-17A und IL-17F werden auch TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-21 und IL-22 von Th17 Zellen freigesetzt<sup>52,53</sup>. Des Weiteren

ist bekannt, dass IL-17A indirekt die Produktion von KC regulieren kann, indem es die Strukturzellen in der Lunge zur KC-Produktion anregt<sup>55</sup>. Die verminderte Konzentration von KC in der BALF der behandelten Mäuse ist somit möglicherweise auf die verringerten IL-17A Level zurückzuführen. In der Maus wird die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten im Wesentlichen über KC, IL-6 und TNF- $\alpha$  reguliert<sup>131</sup>. Tatsächlich konnte bei den Mäusen, die mit der ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA behandelt wurden, eine signifikant verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL detektiert werden. Zudem konnte die Lungenfunktion dieser Tiere durch die Behandlung deutlich verbessert werden. Die Daten bestätigen somit den zweiten Teil der Hypothese, dass sich die pro-inflammatorische Aktivität der Th17 Zellen *in-vivo* beim neutrophilen Asthma durch die Verringerung der ROR $\gamma$ t-Produktion vermindern lässt.

Neben ROR $\gamma$ t sind in den letzten Jahren schon andere Transkriptionsfaktoren, die bei der Pathogenese des eosinophil-dominierten Asthma bronchiale eine wesentliche Rolle spielen, identifiziert und therapeutisch inhibiert worden. Zwei dieser Transkriptionsfaktoren sind das „*GATA binding protein 3*“ (GATA-3) und der „*signal transducer and activator of transcription-6*“ (STAT-6). Beide sind wichtig für die Differenzierung und Aktivierung von Th2 Zellen beim allergischen Asthma. So verhinderte die i.n. Applikation eines GATA-3-spezifischen DNAzyms in einem experimentellen Modell einer Atemwegserkrankung die Ausbildung der Atemwegsentzündung, AHR und reduzierte die Mukusproduktion<sup>151</sup>. Mc Cusker et al. konnten zeigen, dass die i.n. Behandlung mit einem inhibitorischen STAT-6-Peptid mit einer verminderten Atemwegsentzündung, AHR, Mukusproduktion und Produktion Th2-spezifischer Zytokine in der BALF assoziiert ist<sup>152</sup>. Auch gegen ROR $\gamma$ t bzw. ROR $\gamma$  wurden schon inhibitorische Moleküle eingesetzt. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass Digoxin, Ursolsäure und der ROR $\gamma$ -Ligand SR1001 die ROR $\gamma$ t-Aktivität inhibiert und den Schweregrad einer EAE vermindert<sup>149,153,154</sup>.

Die hier verwendete siRNA inhibiert den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, der nicht nur in Th17 Zellen, sondern auch in anderen IL-17 produzierenden Immunzellen wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen<sup>155</sup> und verschiedenen „*innate lymphoid cells*“ (ILCs)<sup>156</sup> exprimiert wird, die beim Asthma eine Rolle spielen können. Mit Hilfe dieser Behandlungsstrategie kann somit frühzeitig in die Pathogenese des neutrophilen Asthmas eingegriffen werden.

Die Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ROR $\gamma$ t bei der Regulation der Entzündung eine wichtige Rolle einnimmt und ein potentielles Ziel für die Behandlung des neutrophilen Asthmas darstellt.

Die gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen der Dissertation machen deutlich, dass  $\alpha$ -MSH und ROR $\gamma$ t unterschiedlich auf die Entzündung in der Lunge einwirken können. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die anti-inflammatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH in der Lunge über den MC5R vermittelt wird. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass ROR $\gamma$ t zur Entwicklung einer neutrophilen Entzündung in der Lunge beiträgt und somit deutlich pro-inflammatorisch wirkt. Ich glaube, dass die Erkenntnisse, sowohl in Bezug auf  $\alpha$ -MSH, als auch auf ROR $\gamma$ t zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus beigetragen und zukünftig als Grundlage für die Entwicklung von neuen Therapieformen genutzt werden können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Eder, W., Ege, M. J. & von Mutius, E. The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2226–2235 (2006).
2. Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. & Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* **59**, 469–478 (2004).
3. Global Initiative for Asthma (GINA) 2014. Global Burden of Asthma.
4. Barnett, S. B. L. & Nurmagambetov, T. A. Costs of asthma in the United States: 2002-2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 145–152 (2011).
5. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Global Atlas of Asthma*. (2013).
6. Gillissin, A. & Welte, T. *Weißbuch Lunge 2014*. (Frischtexte Verlag, 2014).
7. Böcking, C., Renz, H. & Pfefferle, P. I. [Prevalence and socio-economic relevance of allergies in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **55**, 303–307 (2012).
8. Ito, K., Chung, K. F. & Adcock, I. M. Update on glucocorticoid action and resistance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**, 522–543 (2006).
9. WENZEL, S. E. *et al.* Bronchoscopic Evaluation of Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 737–743 (1997).
10. Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* **372**, 1107–1119 (2008).
11. Lötvall, J. *et al.* Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 355–360 (2011).
12. Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* **18**, 716–725 (2012).
13. Meyer, E. H., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. T Cells and NKT Cells in the Pathogenesis of Asthma. *Annual Review of Medicine* **59**, 281–292 (2008).
14. Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A. & Lee, J. J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1313–1320 (2007).
15. Chung, K. F. *et al.* International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* **43**, 343–373 (2014).
16. Mishra, A., Yao, X. & Levine, S. J. From bedside to bench to clinic trials: identifying new treatments for severe asthma. *Dis. Model. Mech.* **6**, 877–888 (2013).
17. Holgate, S. T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunological Reviews* **242**, 205–219 (2011).

18. Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* **18**, 673–683 (2012).
19. Galli, S. J. & Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* **18**, 693–704 (2012).
20. Marone, G., Triggiani, M., Genovese, A. & De Paulis, A. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv. Immunol.* **88**, 97–160 (2005).
21. Busse, W. W. & Lemanske, R. F. Asthma. *New England Journal of Medicine* **344**, 350–362 (2001).
22. Kariyawasam, H. H. & Robinson, D. S. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Current Opinion in Immunology* **19**, 681–686 (2007).
23. Nakagome, K., Matsushita, S. & Nagata, M. Neutrophilic Inflammation in Severe Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* **158**, 96–102 (2012).
24. Alcorn, J. F., Crowe, C. R. & Kolls, J. K. TH17 Cells in Asthma and COPD. *Annual Review of Physiology* **72**, 495–516 (2010).
25. Wegmann, M. in *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 427–441 (15) (Bentham Science Publishers, 2011).
26. Shannon, J. *et al.* Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma\*. *Chest* **133**, 420–426 (2008).
27. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223–246 (2003).
28. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* **118**, 3546–3556 (2008).
29. Schaub, B., Lauener, R. & von Mutius, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 969–977; quiz 978 (2006).
30. Cohn, L., Homer, R. J., Niu, N. & Bottomly, K. T Helper 1 Cells and Interferon- $\gamma$  Regulate Allergic Airway Inflammation and Mucus Production. *J Exp Med* **190**, 1309–1318 (1999).
31. Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H. & Yoshida, S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* **177**, 573–576 (1993).
32. Hofstra, C. L. *et al.* Differential Effects of Endogenous and Exogenous Interferon- $\gamma$  on Immunoglobulin E, Cellular Infiltration, and Airway Responsiveness in a Murine Model of Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**, 826–835 (1998).
33. Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* **103**, 175–183 (1999).
34. Randolph, D. A., Carruthers, C. J. L., Szabo, S. J., Murphy, K. M. & Chaplin, D. D. Modulation of Airway Inflammation by Passive Transfer of Allergen-Specific Th1 and Th2 Cells in a Mouse Model of Asthma. *J Immunol* **162**, 2375–2383 (1999).

35. Prakash, Y. *et al.* Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med* **4**, 395–411 (2010).
36. Böhm, M., Luger, T. A., Tobin, D. J. & García-Borrón, J. C. Melanocortin Receptor Ligands: New Horizons for Skin Biology and Clinical Dermatology. *J Invest Dermatol* **126**, 1966–1975 (2006).
37. Brzoska, T., Luger, T. A., Maaser, C., Abels, C. & Böhm, M.  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone and Related Tripeptides: Biochemistry, Antiinflammatory and Protective Effects in Vitro and in Vivo, and Future Perspectives for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Endocrine Reviews* **29**, 581–602 (2008).
38. Maaser, C., Kannengiesser, K. & Kucharzik, T. Role of the Melanocortin System in Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**, 123–134 (2006).
39. Kalden, D.-H., Scholzen, T., Brzoska, T. & Luger, T. A. Mechanisms of the Antiinflammatory Effects of  $\alpha$ -MSH: Role of Transcription Factor NF- $\kappa$ B and Adhesion Molecule Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **885**, 254–261 (1999).
40. Moustafa, M. *et al.* Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulated NF $\kappa$ B/p65 in Human Keratinocytes by  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone and Adrenocorticotrophic Hormone Peptides. *Journal of Investigative Dermatology* **119**, 1244–1253 (2002).
41. Delgado, R. *et al.* Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* **63**, 740–745 (1998).
42. Jung, E.-J. *et al.* Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone on Pancreas Islet Cell Against Peripheral Blood Mononuclear Cell-Mediated Cytotoxicity In Vitro. *Transplantation Proceedings* **39**, 1604–1606 (2007).
43. Manna, S. K., Sarkar, A. & Sreenivasan, Y.  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. *Eur. J. Immunol.* **36**, 754–769 (2006).
44. Bhardwaj, R. S. *et al.* Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol* **156**, 2517–2521 (1996).
45. Han, D., Tian, Y., Zhang, M., Zhou, Z. & Lu, J. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant adeno-associated virus-mediated  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone-transduced PLP139-151-specific T cells. *Gene Ther* **14**, 383–395 (2006).
46. Auriemma, M. *et al.*  $\alpha$ -MSH-Stimulated Tolerogenic Dendritic Cells Induce Functional Regulatory T Cells and Ameliorate Ongoing Skin Inflammation. *J Invest Dermatol* **132**, 1814–1824 (2012).
47. Etori, M. *et al.* Melanocortin Receptors 1 and 5 Might Mediate Inhibitory Effects of  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone on Antigen-Induced Chronic Allergic Skin Inflammation in IgE Transgenic Mice. *J Invest Dermatol* **132**, 1925–1927 (2012).

48. Rajora, N., Boccoli, G., Catania, A. & Lipton, J. M.  $\alpha$ -MSH Modulates Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Peptides* **18**, 381–385 (1997).
49. Kokot, A. *et al.*  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: Melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma? *Arthritis & Rheumatism* **60**, 592–603 (2009).
50. Raap, U. *et al.*  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits Allergic Airway Inflammation. *J Immunol* **171**, 353–359 (2003).
51. Steinman, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* **13**, 139–145 (2007).
52. Schmidt-Weber, C. B., Akdis, M. & Akdis, C. A. TH17 cells in the big picture of immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 247–254 (2007).
53. Morishima, Y. *et al.* Th17-Associated Cytokines as a Therapeutic Target for Steroid-Insensitive Asthma. *Clin Dev Immunol* **2013**, (2013).
54. Qiu, Z. *et al.* Interleukin-17 regulates chemokine and gelatinase B expression in fibroblasts to recruit both neutrophils and monocytes. *Immunobiology* **214**, 835–842 (2009).
55. Laan, M. *et al.* Neutrophil Recruitment by Human IL-17 Via C-X-C Chemokine Release in the Airways. *J Immunol* **162**, 2347–2352 (1999).
56. Laan, M. *et al.* A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF- $\alpha$ . *Eur Respir J* **21**, 387–393 (2003).
57. Kawaguchi, M. *et al.* Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**, 804–809 (2001).
58. Hennessy, S. *et al.* IL-17A augments TNF- $\alpha$ -induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**, 958–964 (2004).
59. Prause, O., Bozinovski, S., Anderson, G. & Linden, A. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* **59**, 313–317 (2004).
60. Bullens, D. M. *et al.* IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* **7**, 135 (2006).
61. Ivanov, I. I., Zhou, L. & Littman, D. R. Transcriptional Regulation of Th17 Cell Differentiation. *Semin Immunol* **19**, 409–417 (2007).
62. Huh, J. R. & Littman, D. R. Small molecule inhibitors of ROR $\gamma$ t: Targeting Th17 cells and other applications. *European Journal of Immunology* **42**, 2232–2237 (2012).
63. Yang, X. O. *et al.* T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
64. Suzukawa, M. *et al.* Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J. Immunol.* **189**, 3641–3652 (2012).

65. Ano, S. *et al.* Transcription Factors GATA-3 and ROR $\gamma$ t Are Important for Determining the Phenotype of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma. *J Immunol* **190**, 1056–1065 (2013).
66. Wilson, R. H. *et al.* Allergic Sensitization through the Airway Primes Th17-dependent Neutrophilia and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 720–730 (2009).
67. Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. & Möller, P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* **159**, 301–317 (1990).
68. Eberl, G. *et al.* An essential function for the nuclear receptor ROR $\gamma$ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* **5**, 64–73 (2004).
69. Kannengiesser, K. *et al.* Melanocortin-derived tripeptide KPV has anti-inflammatory potential in murine models of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 324–331 (2008).
70. Ichiyama, T. *et al.* Systemically administered  $\alpha$ -melanocyte-stimulating peptides inhibit NF- $\kappa$ B activation in experimental brain inflammation. *Brain Research* **836**, 31–37 (1999).
71. Catania, A. *et al.* The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules. *Neuroimmunomodulation* **1**, 321–328 (1994).
72. Yamaoka-Tojo, M. *et al.* Central Neurotranspeptide, Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH) is Upregulated in Patients with Congestive Heart Failure. *Internal Medicine* **45**, 429–434 (2006).
73. Shishioh-Ikejima, N. *et al.* The increase of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the plasma of chronic fatigue syndrome patients. *BMC Neurology* **10**, 73 (2010).
74. Brzoska, T., Scholzen, T., Becher, E. & Luger, T. A. in *Skin Cancer and UV Radiation* (eds. Altmeyer, P. D. P., Hoffmann, D. K. & Stücker, D. M.) 227–237 (Springer Berlin Heidelberg, 1997). at <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60771-4\\_27](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60771-4_27)>
75. Xu, P., Mao, Y., Meng, H., Tian, Y. & Deng, X. STY39, a Novel Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Analogue, Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice: *Shock* **35**, 308–314 (2011).
76. Shifren, A., Witt, C., Christie, C. & Castro, M. Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways. *Journal of Allergy* **2012**, e316049 (2012).
77. Dabbagh, K. *et al.* IL-4 Induces Mucin Gene Expression and Goblet Cell Metaplasia In Vitro and In Vivo. *J Immunol* **162**, 6233–6237 (1999).
78. Kopf, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* **362**, 245–248 (1993).
79. Louahed, J. *et al.* Interleukin-9 Upregulates Mucus Expression in the Airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**, 649–656 (2000).

80. Zhu, Z. *et al.* Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 779–788 (1999).
81. Wills-Karp, M. *et al.* Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. *Science* **282**, 2258–2261 (1998).
82. Zhen, G. *et al.* IL-13 and Epidermal Growth Factor Receptor Have Critical but Distinct Roles in Epithelial Cell Mucin Production. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 244–253 (2007).
83. Hauber, H.-P. *et al.* Niflumic acid and MSI-2216 reduce TNF- $\alpha$ -induced mucin expression in human airway mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 266–271 (2005).
84. Song, K. S. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induce MUC5AC Overexpression through a Mechanism Involving ERK/p38 Mitogen-activated Protein Kinases-MSK1-CREB Activation in Human Airway Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 23243–23250 (2003).
85. Levine, S. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**, 196–204 (1995).
86. Busse, P. J. *et al.* Chronic exposure to TNF- $\alpha$  increases airway mucin gene expression in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 1256–1263 (2005).
87. Voynow, J. A. *et al.* Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **276**, L835–L843 (1999).
88. Fischer, B. M. & Voynow, J. A. Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Gene Expression in Airway Epithelium via a Pathway Involving Reactive Oxygen Species. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 447–452 (2002).
89. Takeyama, K. *et al.* Oxidative Stress Causes Mucin Synthesis Via Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor: Role of Neutrophils. *J Immunol* **164**, 1546–1552 (2000).
90. Hiltz, M. E., Catania, A. & Lipton, J. M. Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha and endogenous pyrogen but not that caused by LTB<sub>4</sub>, PAF and rIL-8. *Cytokine* **4**, 320–328 (1992).
91. Berend, N., Salome, C. M. & King, G. G. Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology* **13**, 624–631 (2008).
92. Ferguson, A. C. & Wong, F. W. BRonchial hyperresponsiveness in asthmatic children. correlation with macrophages and eosinophils in bronchial lavage fluid. *Chest* **96**, 988–991 (1989).

93. Wardlaw, A. J., Dunnette, S., Gleich, G. J., Collins, J. V. & Kay, A. B. Eosinophils and Mast Cells in Bronchoalveolar Lavage in Subjects with Mild Asthma: Relationship to Bronchial Hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* **137**, 62–69 (1988).
94. Kita, H., Abu-Ghazaleh, R. I., Sur, S. & Gleich, G. J. Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J Immunol* **154**, 4749–4758 (1995).
95. Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. & Gleich, G. J. Toxicity of Eosinophil Cationic Proteins for Guinea Pig Tracheal Epithelium In Vitro. *Am Rev Respir Dis* **139**, 801–805 (1989).
96. Ayars, G. H., Altman, L. C., Gleich, G. J., Loegering, D. A. & Baker, C. B. Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **76**, 595–604 (1985).
97. Wilder, J. A. *et al.* Dissociation of Airway Hyperresponsiveness from Immunoglobulin E and Airway Eosinophilia in a Murine Model of Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 1326–1334 (1999).
98. Corry, D. B. *et al.* Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* **183**, 109–117 (1996).
99. Mattes, J. *et al.* IL-13 Induces Airways Hyperreactivity Independently of the IL-4R $\alpha$  Chain in the Allergic Lung. *J Immunol* **167**, 1683–1692 (2001).
100. Sukkar, M. B., Hughes, J. M., Armour, C. L. & Johnson, P. R. A. Tumour necrosis factor- $\alpha$  potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* **6**, 199–203 (2001).
101. Anticevich, S. Z., Hughes, J. M., Black, J. L. & Armour, C. L. Induction of human airway hyperresponsiveness by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. J. Pharmacol.* **284**, 221–225 (1995).
102. Chen, W. *et al.* Exocrine Gland Dysfunction in MC5-R-Deficient Mice: Evidence for Coordinated Regulation of Exocrine Gland Function by Melanocortin Peptides. *Cell* **91**, 789–798 (1997).
103. Conroy, D. M. & Williams, T. J. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respiratory Research* **2**, 150 (2001).
104. Shakoory, B., Fitzgerald, S. M., Lee, S. A., Chi, D. S. & Krishnaswamy, G. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **24**, 271–281 (2004).
105. Kim, J. *et al.* Eotaxin Represents the Principal Eosinophil Chemoattractant in a Novel Murine Asthma Model Induced by House Dust Containing Cockroach Allergens. *J Immunol* **167**, 2808–2815 (2001).
106. Wu, A. Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of high-dose montelukast in an animal model of acute asthma. *Clinical & Experimental Allergy* **33**, 359–366 (2003).
107. Hogan, S. P. Recent Advances in Eosinophil Biology. *International Archives of Allergy and Immunology* **143**, 3–14 (2007).

108. Wardlaw, A. J. Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med* **1**, 214–218 (2001).
109. Takatsu, K. & Nakajima, H. IL-5 and eosinophilia. *Current Opinion in Immunology* **20**, 288–294 (2008).
110. Cone, R. D. *et al.* The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**, 287–317; discussion 318 (1996).
111. Slominski, A., Szczesniowski, A. & Wortsman, J. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Detection of Corticotropin-Releasing Hormone and Proopiomelanocortin-Derived Peptides in Human Skin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**, 3582–3588 (2000).
112. Böhm, M., Ehrchen, J. & Luger, T. a. Beneficial effects of the melanocortin analogue Nle4-D-Phe7- $\alpha$ -MSH in acne vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **28**, 108–111 (2014).
113. Fahy, J. V., Kim, K. W., Liu, J. & Boushey, H. A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 843–852 (1995).
114. Wenzel, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet* **368**, 804–813 (2006).
115. Bhakta, N. R. & Woodruff, P. G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. *Immunological Reviews* **242**, 220–232 (2011).
116. Haldar, P. & Pavord, I. D. Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1043–1052 (2007).
117. WENZEL, S. E. *et al.* Evidence That Severe Asthma Can Be Divided Pathologically into Two Inflammatory Subtypes with Distinct Physiologic and Clinical Characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1001–1008 (1999).
118. Chakir, J. *et al.* Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 1293–1298 (2003).
119. Al-Ramli, W. *et al.* TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 1185–1187 (2009).
120. Wilson, R. H. *et al.* Allergic Sensitization through the Airway Primes Th17-dependent Neutrophilia and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 720–730 (2009).
121. Eisenbarth, S. C. *et al.* Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J Exp Med* **196**, 1645–1651 (2002).
122. Monteseirín, J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* **19**, 340–354 (2009).

123. Amitani, R. *et al.* Effects of Human Neutrophil Elastase and Pseudomonas aeruginosa Proteinases on Human Respiratory Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 26–32 (1991).
124. Goldman, G. *et al.* Reactive oxygen species and elastase mediate lung permeability after acid aspiration. *Journal of Applied Physiology* **73**, 571–575 (1992).
125. Peterson, M. W., Walter, M. E. & Nygaard, S. D. Effect of neutrophil mediators on epithelial permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**, 719–727 (1995).
126. Stein, J. *et al.* Non-eosinophilic airway hyperreactivity in mice, induced by IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lung T cells, is responsive to steroid treatment. *Scand J Immunol* n/a–n/a (2014). doi:10.1111/sji.12217
127. Suzuki, T. *et al.* Aerosolized human neutrophil elastase induces airway constriction and hyperresponsiveness with protection by intravenous pretreatment with half-length secretory leukoprotease inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 1405–1411 (1996).
128. Rabe, K. F., Dent, G. & Magnussen, H. Hydrogen peroxide contracts human airways in vitro: role of epithelium. *Am. J. Physiol.* **269**, L332–338 (1995).
129. Tsuchiya, K., Siddiqui, S., Risse, P.-A., Hirota, N. & Martin, J. G. The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **303**, L54–L63 (2012).
130. Yanagihara, K., Seki, M. & Cheng, P.-W. Lipopolysaccharide Induces Mucus Cell Metaplasia in Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 66–73 (2001).
131. Balamayooran, G., Batra, S., Fessler, M. B., Happel, K. I. & Jeyaseelan, S. Mechanisms of Neutrophil Accumulation in the Lungs Against Bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**, 5–16 (2010).
132. Matsunaga, K. *et al.* Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: Correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**, 84–90 (2006).
133. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**, 430–438 (2001).
134. HOSHINO, H., LÖTVALL, J., SKOOGH, B.-E. & LINDÉN, A. Neutrophil Recruitment by Interleukin-17 into Rat Airways In Vivo. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 1423–1428 (1999).
135. Jovanovic, D. V. *et al.* IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by Human Macrophages. *J Immunol* **160**, 3513–3521 (1998).

136. Hoshino, H. *et al.* Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 143–149 (2000).
137. McKinley, L. *et al.* TH17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol* **181**, 4089–4097 (2008).
138. Nakae, S. *et al.* Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity* **17**, 375–387 (2002).
139. Kudo, M. *et al.* IL-17A produced by  $\alpha\beta$  T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med* **18**, 547–554 (2012).
140. Chen, Y. *et al.* Stimulation of Airway Mucin Gene Expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 Paracrine/Autocrine Loop. *J. Biol. Chem.* **278**, 17036–17043 (2003).
141. Fujisawa, T. *et al.* Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 $\beta$  and IL-17A; the NF- $\kappa$ B Paradigm. *J Immunol* **183**, 6236–6243 (2009).
142. Hamzaoui, A. *et al.* Transcriptional characteristics of CD4+ T cells in young asthmatic children: RORC and FOXP3 axis. *J Inflamm Res* **4**, 139–146 (2011).
143. Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y. & Guo, W. Th17 Immunity in Patients with Allergic Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* **151**, 297–307 (2010).
144. Scherer, L. J. & Rossi, J. J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotech* **21**, 1457–1465 (2003).
145. Breaker, R. R. & Joyce, G. F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology* **1**, 223–229 (1994).
146. Santoro, S. W. & Joyce, G. F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *PNAS* **94**, 4262–4266 (1997).
147. Chen, C., Smye, S. W., Robinson, M. P. & Evans, J. A. Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput* **44**, 5–14 (2006).
148. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146–1150 (2001).
149. Solt, L. A. *et al.* Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* **472**, 491–494 (2011).
150. Busse, W. W. *et al.* Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Study of Brodalumab, a Human Anti-IL-17 Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate to Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 1294–1302 (2013).
151. Sel, S. *et al.* Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 910–916.e5 (2008).

152. McCusker, C. T. *et al.* Inhibition of Experimental Allergic Airways Disease by Local Application of a Cell-Penetrating Dominant-Negative STAT-6 Peptide. *J Immunol* **179**, 2556–2564 (2007).
153. Huh, J. R. *et al.* Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t activity. *Nature* **472**, 486–490 (2011).
154. Xu, T. *et al.* Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR $\gamma$ t Protein. *J Biol Chem* **286**, 22707–22710 (2011).
155. Lochner, M. *et al.* In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR $\gamma$ t+ T cells. *J Exp Med* **205**, 1381–1393 (2008).
156. Spits, H. & Di Santo, J. P. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* **12**, 21–27 (2011).

## 6 Anhang

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Mäuse

Stamm	Herkunft
MC5R +/- (B6.129S4-Mc5rtm1Cone/Mmcd)	Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), University of California Davis, Davis, USA
OT-II (C57BL/6-Tg(TcraTcrb) 425Cbn/Crl	Charles River , Frankreich
RORyt +/- (B6.129P2(Cg)-Rorctm2Litt/J)	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
Wildtyp Balb/c und C57BL/6J	Charles River, Sulzfeld, Deutschland

#### 6.1.2 Betäubungsmittel

Name	Hersteller
Ketamin 10%	Bela-Pharm, Vechta, Deutschland
Pakoroniumbromid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Rompun 2%	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Sevofluoran	Ecuphar GmbH, Greifswald, Deutschland
Terbutalin	Sigma, Steinheim, Deutschland

#### 6.1.3 Geräte

Name	Hersteller
BD Accuri C6	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Brutschrank Heracell 150	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Countess	Invitrogen, Carlsbad, USA
DAKO Medimaschine	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Digitalkamera DP-25	Olympus, Tokyo, Japan
FinePoint RC	Buxco Research Systems, Wilmington, USA
Gel-Dokumentationsstation	Intas, Göttingen, Deutschland
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop BX-51	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotom (HM355 S)	Microm, Walldorf, Deutschland

Nanophotometer	Implen, München, Deutschland
Nucleofector I	Lonza AG, Basel, Schweiz.
PARI Generator	PARI® Master, Pari, Starnberg, Deutschland)
Photometer Tecan	Tecan, Männedorf, Schweiz
Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars	Weiss Labortechnik, Heroldsberg, Deutschland
Thermocycler (Mastercycler gradient)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

### 6.1.4 Software

Name	Hersteller
BD Accuri C6	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FCS Express 4 Flow Software	De Novo Software, Los Angeles, USA
GraphPad Prism 4 Software	GraphPad Software, Inc. San Diego, USA
Olympus cell^A Software	Olympus, Tokyo, Japan
Magellan 7.1 Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
FCAP Array™ v3.0.1 Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

### 6.1.5 Antikörper

#### 6.1.5.1 FACS

Name	Fluoreszenz	Klon	Hersteller
CD16/CD32	-	2.4G2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD4	FITC	RM4-5	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IL-17A	PE	TC11-18H10	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

#### 6.1.5.2 Weitere Antikörper

Name	Klon	Hersteller
IFN- $\gamma$ Functional Grade Purified	XMG1.2	eBioscience, Inc., San Diego, USA
IL-4 Functional Grade Purified	11B11	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Isotyp-Kontroll-Antikörper (Rabbit IgG Isotype control)		Biorbyt, Cambridge, England
$\alpha$ -MSH-Antikörper (Rabbit, polyklonal)		Biorbyt, Cambridge, England

### 6.1.6 Peptide

Name	Hersteller
OVA <sub>323-339</sub> -Peptid	MOBITec GmbH, Göttingen, Deutschland
α-MSH (free acid)	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz

### 6.1.7 Zytokine

Name	Hersteller
Rekombinantes humanes TGF-β	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Rekombinantes Maus IL-6	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Rekombinantes Maus IL-23	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Rekombinantes Maus GM-CSF	Peptotech, Hamburg, Deutschland

### 6.1.8 Kits

Name	Hersteller
Amaya <sup>®</sup> Mouse TCell Nucleofector Kit	Lonza Cologne AG, Köln, Deutschland
CBA enhanced sensitivity Flex Set Mouse IL17A (Bead C5)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CBA Mouse KC Flex Set (Bead A9)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CBA Mouse TNF-α enhanced sensitivity Flex Set (Bead C8)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, USA
Cytofix/ Cytoperm <sup>™</sup> Fixation/Permeabilisation Solution mit GolgiPlug <sup>™</sup>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eotaxin-1 Mouse ELISA	Abcam, Cambridge, England
Fixation and Permeabilization Solution Kit with GolgiPlug	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
α-MSH Mouse ELISA	Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Deutschland

### 6.1.9 Primer/ siRNAs/DNAzyme

Name	Hersteller
BLOCK-IT <sup>™</sup> Alexa FluorR Red Fluorescent Control (Alexa555)	Ambion/Lifetechnologies, Carlsbad, USA

DNAzyme (in-vitro)	MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland
Primer für Real-time PCR	MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland
Stealth RNAi™ siRNAs ( <i>in-vitro</i> )	Life Technologies, Carlsbad, USA
Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, med. GC	Life Technologies, Carlsbad, USA
Stealth RNAi™ siRNAs für in-vivo Applikationen	Life Technologies, Carlsbad, USA

### 6.1.10 Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Sigma, Steinheim, Deutschland
ABC-Komplex	Vector Lab, Burlingame, USA
Accutase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Agar (Agar-Agar)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumhydroxyd (Al(OH) <sub>3</sub> ) (Imject Alum)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Diff-Quick-Lösung	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
DNA-Größenmarker, 50 Basenpaar	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose, no Glutamine	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GolgiPlug	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Histofix	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ionomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
LPS (0111:B4)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Metacholin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9%	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM	Sigma, Steinheim, Deutschland

OVA (Endotoxinfrei)	Hyglos, Bernried, Deutschland
Ovalbumin Grade V (Aerosol)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ovalbumin Grade VI (Sensibilisierung)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Penicilin/Streptomycin Stammlösung 10000 Units/ml Penicilin, 10 mg/ml Streptomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Pronase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protease-Inhibitor, Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
SyBR Green Master Mix	Roche, Basel, Schweiz
TriReagent	Ambion, New York, USA
Triton-X100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypan Blau 0,4%	Life Technologies, Carlsbad, USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	Vector Lab, Burlingame, USA

### 6.1.11 Verbrauchsgegenstände

Name	Hersteller
24-Well Flachbodenplatte	Corning Inc., Corning, USA
96-Well Zellkulturplatte	Corning Inc., Corning, USA
Coverplates	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Deckgläser (24 mm x 60 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Biorad, München, Deutschland
Falcons (15 ml/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter-Zytospins	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Knopfkanüle (1428 LL)	Acufirm, Dreieich, Deutschland
LS Columns	Miltenyi Biotech, USA
Medicons (35 µm)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Microlanzette (20G)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Microsprayer (PAK-MSA)	Pen-Century, Inc., Wyndmoor, USA
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotech, USA
MS-Columns	Miltenyi Biotech, USA

---

Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus (75 mm x 25 mm)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotech, USA
Spritze (1 ml/5 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning, USA
Trachealkanüle (1.0 mm)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb (40 µm)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

---

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout/defizient
Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropin
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxid
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AW	Atemwegsepithel
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
Balb/c	Bagg albino Stamm c
BALF	Broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit
BMDCs	<i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>
Bp	Basenpaar
C57Bl/6	<i>C57 black 6</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFS	<i>chronic fatigue syndrom</i> , myalgischer Enzephalomyelitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCs	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAzym	Desoxyribozym
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dODN	Oligodesoxynucleotide
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EDN	<i>Eosinophil-derived Neurotoxin</i>
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPO	eosinophile Peroxidase
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> / Durchflusszytometer
FAM	Fluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
Fc <sub>ε</sub> RI-Rezeptor	Hochaffiner IgE-Rezeptor

---

<b>FFPE</b>	<i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GATA-3</b>	<i>GATA binding protein 3</i>
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>HE</b>	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase / Meerrettichperoxidase</i>
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.t.</b>	intratracheal
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgE</b>	Immunglobulin Typ E
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-23R</b>	Interleukin 23 Rezeptor
<b>ILC</b>	<i>Innate lymphoid cells</i>
<b>KC</b>	<i>keratinocyte chemoattractant</i> , Keratinozyten Chemoattractant
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MACS</b>	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
<b>MBP</b>	<i>Major basic protein</i>
<b>MCh</b>	$\beta$ -Methyl-Acetylcholin
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>MC-R</b>	Melanocortin-Rezeptoren
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium
<b>MHC II</b>	<i>Major Histocompatibility Complex II /</i> Haupthistokompatibilitätskomplex II
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloprotease
<b>MNC</b>	Mononukleäre Zellen
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MSH</b>	Melanozyten-stimulierendes Hormon
<b>MUC</b>	Mucin
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>o.A.</b>	oropharyngeale Aspiration
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PAS</b>	Perjodsäure-Schiff-Färbung
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PC</b>	Prohormonkonvertasen
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion

---

<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>Pen-Strep</b>	Penicillin-Streptomycin
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>POMC</b>	Proopiomelanokortin
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
<b>rel.</b>	relativ
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RORyt</b>	<i>Retinoid-related orphan receptor gamma t</i>
<b>RPL-32</b>	<i>Ribosomal Protein L32</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>scr.</b>	<i>scrambled</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean / Standardfehler des Mittelwertes</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SSC</b>	<i>Sideward Scatter</i>
<b>STAT-6</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription-6</i>
<b>TAE</b>	Tri-Acetat-EDTA
<b>tg</b>	transgen
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
<b>Th</b>	T-Helfer Zelle
<b>Th0</b>	naive T-Helfer Zellen
<b>Th1</b>	T-Helfer Zelle Typ 1
<b>Th17</b>	T-Helfer Zelle Typ 17
<b>Th2</b>	T-Helfer Zelle Typ 2
<b>TLR</b>	<i>Toll-like</i> Rezeptor
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>VEGF</b>	<i>Vascular-Endothelial Growth Factor</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>
<b>Wt</b>	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Prävalenz von Asthma bronchiale	4
Abbildung 2: Immunregulation beim Asthma bronchiale	10
Abbildung 3: Synthese der natürlich vorkommenden Melanokortine	11
Abbildung 4: Th17 vermittelte Entzündung beim Asthma bronchiale	13
Abbildung 5: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung sowie Immunmodulation durch das Peptidhormon $\alpha$ -MSH.	19
Abbildung 6: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung sowie Immunmodulation durch einen $\alpha$ -MSH Antagonisten während der Immunantwort	20
Abbildung 7: Protokoll zur Sensibilisierung und Induktion einer neutrophilen Atemwegsentszündung	21
Abbildung 8: Protokoll zur Sensibilisierung, Induktion einer neutrophilen Atemwegsentszündung und therapeutische Behandlung mit ROR $\gamma$ t-spezifischer siRNA	22
Abbildung 9: $\alpha$ -MSH Level in der Broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von gesunden Mäusen (PBS) und Mäusen mit akutem und chronischem Asthma	42
Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -MSH in gesunden Mäusen (PBS) sowie Mäusen mit akutem und chronisch experimentellem Asthma	43
Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -MSH in der Broncho-alveolären Lavage von Mäusen mit akutem experimentellem Asthma	44
Abbildung 12: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen	45
Abbildung 13: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Entzündungszellen in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) von Wildtyp-Mäusen	46
Abbildung 14: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsentszündung und die Mukusproduktion in Wildtyp-Mäusen	47
Abbildung 15: Einfluss eines $\alpha$ -MSH-Antikörpers auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen	48
Abbildung 16: Einfluss eines $\alpha$ -MSH-Antikörpers auf die Entzündungszellen in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) in Wildtyp-Mäusen	49
Abbildung 17: Einfluss eines $\alpha$ -MSH Antikörpers auf die Atemwegsentszündung und die Mukusproduktion in Wildtyp-Mäusen	50
Abbildung 18 DNA-Agarose-Gelelektrophorese der PCR Amplifikationsprodukte der Melanokortinrezeptoren MC1R, MC2R, MC3R, MC4R und MC5R	51
Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis vom Melanokortinrezeptor 5 (MC5R) auf dem Atemwegsepithel und im Infiltrat von gesunden Mäusen (PBS) sowie Mäusen mit akutem und chronisch experimentellem Asthma	52

---

Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von MC5R in BAL-Zellen von Mäusen mit akutem experimentellem Asthma	53
Abbildung 21: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsreagibilität in MC5R-defizienten Mäusen.	54
Abbildung 22: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von MC5R-defizienten Mäusen	55
Abbildung 23: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Atemwegsentzündung und die Mukusproduktion von MC5R-defizienten Mäusen	56
Abbildung 24: Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Applikation von $\alpha$ -MSH.	57
Abbildung 25: Einfluss eines $\alpha$ -MSH Antikörpers auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Neutralisierung von $\alpha$ -MSH	57
Abbildung 26: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsreagibilität von Wildtyp-Mäusen	59
Abbildung 27: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von Wildtyp-Mäusen	60
Abbildung 28: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsentzündung (HE) und die Mukusproduktion (PAS) in Wildtyp-Mäusen	61
Abbildung 29: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf den Anteil CD4+/IL-17A+ Lymphozyten in Wildtyp-Mäusen.	61
Abbildung 30: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf die Expression Th17-spezifischer Marker und Zytokine in homogenisierten Lungen	62
Abbildung 31: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsreagibilität in ROR $\gamma$ t-tg Mäusen	64
Abbildung 32: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) in ROR $\gamma$ t-tg Mäusen	65
Abbildung 33: Einfluss der OVA/LPS Sensibilisierung auf die Expression Th17-spezifischer Marker und Zytokine in homogenisierten Lungen ROR $\gamma$ t-tg (ROR $\gamma$ -/-) Mäuse.	66
Abbildung 34: Einfluss der OVA/LPS-Sensibilisierung auf die Atemwegsentzündung (HE) und die Mukusproduktion (PAS) in Wildtyp (wt) und ROR $\gamma$ t-tg (-/-) Mäusen	67
Abbildung 35: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels 6-Carboxyfluorescein (FAM)-markiertem unspezifischem DNAzym 48 Stunden nach Transfektion.	68
Abbildung 36: Einfluss von ROR $\gamma$ t-spezifischen DNAzymen auf die Expression von ROR $\gamma$ t in transfizierten Th17-Zellen nach 24 und 48 Stunden	69
Abbildung 37: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Alexa Fluor555-markierter unspezifischer siRNA 48 Stunden nach Transfektion	70
Abbildung 38: Einfluss von ROR $\gamma$ t-spezifischer siRNA auf die Expression von ROR $\gamma$ t sowie IL-17A und IL-17F in transfizierten Th17-Zellen nach 24 und 48 Stunden	71
Abbildung 39: Einfluss von ROR $\gamma$ t400 auf die Atemwegsreagibilität	72

---

Abbildung 40: Einfluss von RORyt400 auf die Entzündungszellen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL)	73
Abbildung 41: Einfluss von RORyt400 auf die Atemwegsentzündung.	74
Abbildung 42: Einfluss von RORyt400 auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der für die <i>in-vivo</i> Versuche verwendeten siRNAs	22
Tabelle 2: Vorbehandlung der Lungenschnitte und BAL-Zellen für die immunhistochemische Färbung	28
Tabelle 3: Zytokine und Antikörper für die Differenzierung von Th17 Zellen	35
Tabelle 4: Sequenzen der für die Transfektion generierten DNAzyme	36
Tabelle 5: Sequenzen der für die Transfektion generierten Stealth RNAi <sup>TM</sup> siRNAs	37
Tabelle 6: Sequenzen der in der Real-time-PCR eingesetzten Primer	40

## Publikationsverzeichnis aus der Dissertation

### Vorträge:

Wegmann M, **Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H. The  $\alpha$ -MSH/MCR axis in the immuno-pathogenesis of allergic bronchial asthma.  
Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der DGP 2012, Münster

**Webering S**, Lunding L, Christina Vock, Fehrenbach H, Wegmann M. The  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone – melanocortin receptor axis in the pathogenesis of allergic bronchial asthma. *Allergy*, **68**, Suppl.97, 26 (2013).  
EAACI Congress 2013, Milano, Italien

**Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H, Wegmann M. ROR $\gamma$ t-specific RNAi decreases allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse model of neutrophilic asthma.  
ERS Lung Science Conference 2014, Estoril, Portugal  
(ERS Travel Grant/William MacNee-Award-Session)

**Webering S**, Lunding L, Behrends J, Fehrenbach H, Wegmann M. ROR $\gamma$ t-specific RNAi decreases allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse model of neutrophilic asthma. *Pneumologie*; **68** - A5 (2014)  
DZL-Symposium 2014, Hannover

**Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H, Wegmann M. LSC 2014 abstract: ROR $\gamma$ t-specific RNAi decreases allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse model of neutrophilic asthma.  
ERS International Congress 2014, München

### Poster:

Wegmann M, **Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H. The  $\alpha$ -MSH/MCR axis in the immuno-pathogenesis of allergic bronchial asthma.  
DZL Annual Meeting 2012, Bad Nauheim

**Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H, Wegmann M. Treatment of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness using ROR $\gamma$ t specific RNAi.  
Norddeutsche Immunologen Tagung 2013, Borstel

**Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H, Wegmann M. Treatment of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness using ROR $\gamma$ t specific RNAi.  
DZL Annual Meeting 2014, Heidelberg

**Webering S**, Lunding L, Fehrenbach H, Wegmann M. Treatment of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness using ROR $\gamma$ t specific RNAi. *Pneumologie* **68**, S49 (2014)

DGP Jahreskongress 2014, Bremen

**Webering S**, Lunding L, Vock C, Fehrenbach H, Wegmann M.  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) acts as an anti-inflammatory regulator in allergic bronchial asthma. *Pneumologie* **68**, S49 (2014)

DGP Jahreskongress 2014, Bremen

**Webering S**, Lunding L, Christina Vock, Fehrenbach H, Wegmann M. The  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone regulates allergic airway inflammation through melanocortin receptor 5. *AJRCCM* **189**, A4172 (2014)

ATS 2014 International Conference, San Diego, USA.

## Zusammenfassung

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine heterogene Erkrankung der Atemwege mit variierenden Phänotypen. Die noch immer steigende Prävalenz ist mit hohen Gesundheitsproblemen verbunden. Derzeitige Therapien basieren auf einer Kombination von Kortikosteroiden und  $\beta_2$ -Agonisten. Diese Therapieform ist jedoch bei einigen Asthmatikern nur unzureichend wirksam und häufig mit starken Nebenwirkungen verbunden. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten daher neue Targets für die therapeutische Behandlung unterschiedlicher Phänotypen des Asthma bronchiale identifiziert und daraus neue Therapieansätze entwickelt werden. Dafür wurden zwei Zielmoleküle gewählt, die möglicherweise einen Einfluss auf die Entzündungsantwort und auf die Ausbildung der verschiedenen Asthma-Phänotypen haben. Ein potentieller Mediator mit anti-inflammatorischen Eigenschaften beim eosinophil-dominierten Asthma könnte das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) darstellen.  $\alpha$ -MSH zeigt *in-vitro* sowie bei einer Reihe von experimentellen Entzündungserkrankungen im Tiermodell anti-inflammatorische Eigenschaften. Studien belegen, dass die Wirkung von  $\alpha$ -MSH über die Melanokortinrezeptoren (MC-R) 1-5 vermittelt wird. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus in der Lunge ist jedoch bisher noch nicht bekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher die anti-inflammatorische Wirkung von  $\alpha$ -MSH beim eosinophilen Asthma bronchiale untersucht werden. Des Weiteren sollte aufgeklärt werden, über welche Rezeptoren diese Wirkung in der Lunge vermittelt wird. In Wildtyp-Mäusen mit experimentellem Asthma führte die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH zu einer Reduktion der Entzündung, die sich durch eine Verminderung der Atemwegshyperreagibilität (AHR), der Mukusproduktion und der Anzahl an infiltrierenden Entzündungszellen in der broncho-alveolären Lavage (BAL) auszeichnete. Die intraperitoneale (i.p.) Applikation eines polyklonalen  $\alpha$ -MSH-Antikörpers zur Neutralisation des endogen gebildeten  $\alpha$ -MSHs führte zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Entzündungszellen, hatte jedoch keine Auswirkung auf die AHR und die Mukusproduktion. Expressionsanalysen und Immunhistologische Färbungen zeigten, dass in der Lunge hauptsächlich der MC5R

gebildet wird. In MC5R-defizienten Mäusen hatte die lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH hin keine Verminderung der Entzündungsreaktion zur Folge. Diese Ergebnisse zeigen, dass dieser Rezeptor bei der Vermittlung der anti-inflammatorischen Wirkung von  $\alpha$ -MSH in der Lunge eine wichtige Rolle einnimmt.

Es ist bekannt, dass bei bestimmten Asthma-Phänotypen nicht nur eosinophile, sondern auch neutrophile Granulozyten in die Lunge infiltrieren und das Entzündungsgeschehen beeinflussen. Ursache dieser erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten könnte die Beteiligung von T Helfer 17 (Th17) Zellen sein. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Th17 Zytokins Interleukin (IL)-17A insbesondere bei Patienten mit einem schweren Asthma-Phänotyp stark erhöht ist. Mit ihren pro-inflammatorischen Zytokinen scheinen Th17 Zellen maßgeblich an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge beteiligt zu sein. Die pro-inflammatorische Wirkung dieser Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor *retinoid-related orphan receptor  $\gamma$*  (ROR $\gamma$ t) vermittelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Wirkung von ROR $\gamma$ t auf die Ausbildung des von Neutrophilen dominierten Asthmas untersucht und ein Therapieansatz geprüft, der auf der Inhibierung von ROR $\gamma$ t durch den Einsatz einer ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA basiert. In Wildtyp-Mäusen konnte durch die oropharyngeale Sensibilisierung mit Ovalbumin (OVA) und einem Lipopolysaccharid (LPS) ein neutrophiles Asthma ausgelöst werden, das sich durch eine erhöhte AHR sowie die Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten auszeichnete. Daneben war dieses Modell mit einer erhöhten Anzahl an Th17 Zellen und einer verstärkten Expression von ROR $\gamma$ t sowie pro-inflammatorischer und Th17-spezifischer Zytokine in der Lunge assoziiert. Bei Mäusen mit einem funktionellen ROR $\gamma$ t Knockout konnte hingegen kein neutrophiles Asthma induziert werden. Zur Inhibierung der ROR $\gamma$ t-Expression *in-vitro* wurden ROR $\gamma$ t-spezifische DNAsen und siRNAs eingesetzt. Die Transfektion von *in-vitro* generierten Th17 Zellen mit den siRNAs, nicht jedoch mit den DNAsen, führte zu einer verringerten Expression von ROR $\gamma$ t, IL-17A und IL-17F in den Zellen. Durch die intratracheale Applikation der effizientesten ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA im neutrophilen Mausmodell konnte nicht nur die Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen

Granulozyten, sondern auch die AHR und die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine in der BAL-Flüssigkeit vermindert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass  $\alpha$ -MSH und ROR $\gamma$ t unterschiedlich auf die Entzündung in der Lunge einwirken können.  $\alpha$ -MSH wurde dabei als ein potentieller Mediator mit anti-inflammatorischen Eigenschaften beim eosinophil-dominierten Asthma identifiziert, dessen Wirkung über MC5R vermittelt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ROR $\gamma$ t zur Entwicklung einer neutrophilen Entzündung beiträgt und somit deutlich pro-inflammatorisch wirkt. Die Applikation einer ROR $\gamma$ t-spezifischen siRNA könnte hier einen neuen Therapieansatz für das neutrophile Asthma darstellen.

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation zum Thema „Zur Rolle des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -MSH) und des *retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t* (ROR $\gamma$ t) bei der Immunpathogenese des Asthma bronchiale“ in der FG Experimentelle Pneumologie unter Anleitung von Prof. Dr. H. Fehrenbach ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, den 14.10.2014

Sina Webering

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie am Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach angefertigt. Ihm möchte ich zu allererst für die anregenden Diskussionen danken und der Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Gruppe durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Wegmann, der durch seine außerordentlich intensive wissenschaftliche Betreuung und den vielen Ideen und konstruktiven Diskussionen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meinem Zweitbetreuer Dr. Christoph Hölscher möchte ich mich für die kritische Begutachtung der Daten und die Denkanstöße bedanken.

Franziska Beyersdorf, Linda Lang und Juliane Artelt möchte ich für die ständige technische Unterstützung danken. Ohne eure außerordentliche Hilfsbereitschaft im Labor und bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche wäre diese Arbeit sicherlich so nicht möglich gewesen.

Ebenso geht mein Dank an Dr. Lars Lunding, Dr. Christina Vock, Stephanie Papenmeier und Alexandra Schröder für die Unterstützung und die zahlreichen wissenschaftlichen und auch weniger wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie, Mausmodelle des Asthma und Invertebratenmodelle für die tolle Zusammenarbeit sowie das angenehme und herzliche Arbeitsklima in den vergangenen Jahren bedanken.

Markus, dir danke ich, dass du mit viel Geduld meine Launen, insbesondere während des Schreibprozesses, ertragen hast. Deine stete Unterstützung hat mir während der gesamten Zeit viel Kraft gegeben.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich in meinem schulischen und beruflichen Werdegang bedingungslos unterstützt haben und in allen Situationen hinter mir stehen.