

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Direktor: Prof. Dr. H. Renz  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH , Standort Marburg

**Molekulare Mechanismen der allergieprotektiven Wirkung  
von *Lactococcus lactis* im Mausmodell des akuten allergischen  
Asthma**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin



dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von  
**Stefan Christian Niesel**  
aus Bremen

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Am: 03.05.2012.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. rer. nat. H. Garn

Korreferent: PD Dr. med. C. Seifart

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Asthma bronchiale .....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Immunologische und pathophysiologische Grundlagen von Asthma .....	3
1.1.4 Bedeutung von T-Lymphozyten und Zytokinen bei der Steuerung der asthmatischen Entzündungsreaktion .....	6
1.1.5 Ursachen von Asthma.....	8
1.1.6 Mausmodelle in der Asthmaforschung.....	9
1.1.7 <i>Lactococcus lactis</i> G121.....	10
1.2 Epigenetik.....	10
1.2.1 Definition.....	10
1.2.2 Biochemie der DNA-Methylierung .....	11
1.2.3 CpG-Inseln.....	12
1.2.4 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen als Regulatoren der Genexpression .....	13
1.3 Asthma und Epigenetik .....	15
1.3.1 Epigenetik und Umwelteinflüsse.....	15
1.3.2 Epigenetische Regulation der Zytokinexpression .....	16
1.4 Fragestellung .....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1 Mausmodell des experimentellen Asthmas und Immunmodulation mittels <i>L. lactis</i> .....	19
2.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung .....	19
2.1.2 Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll.....	19
2.1.3 Exposition mit <i>L. lactis</i> .....	20
2.1.4 Systemische Sensibilisierung gegen Ovalbumin und Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion in den Atemwegen .....	21
2.2 Nachweis der bronchoalveolären Hyperreagibilität durch Head-out Body- Plethysmographie .....	21

2.3 Präparation und Probengewinnung.....	23
2.3.1 Gewinnung von Serumproben .....	24
2.3.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) .....	24
2.3.3 Präparation der Lunge .....	25
2.3.4 Präparation der Milz und der bronchialen Lymphknoten.....	26
2.4 Aufreinigung von Zellpopulationen .....	26
2.4.1 Isolation mononukleärer Zellen.....	26
2.4.2 Isolation von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen aus der Milz und bronchialen Lymphknoten .....	27
2.4.3 Analyse der Zellzahl .....	29
2.5 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen im Serum mittels ELISA .....	30
2.6 Quantitative und Qualitative Analyse der Zellpopulationen in der BAL.....	32
2.6.1 Zytozentrifugation (Cytospins).....	32
2.6.2 Färbung der Cytospins mit Diff-Quick®.....	33
2.6.3 Mikroskopische Analyse der gefärbten Cytospins .....	33
2.7 Lungenhistologie .....	33
2.7.1 Anfertigung histologischer Schnitte .....	33
2.7.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung .....	34
2.7.3 Perjodsäure-Schiff-Färbung.....	34
2.7.4 Mikroskopische Analyse der Lungenpräparate .....	35
2.8 <i>In vitro</i> Stimulation mononukleärer Zellen der Milz und der Lymphknoten und Messung von Zytokinkonzentrationen .....	35
2.8.1 <i>In vitro</i> Stimulation mononukleärer Zellen .....	35
2.8.2 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Überständen OVA-stimulierter mononukleärer Zellen .....	36
2.9 RNA-Aufreinigung.....	39
2.9.1 RNA-Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Milz und Lymphknoten ..	39
2.9.2 RNA-Aufreinigung aus Lungengewebe .....	40
2.9.3 DNase-Verdau .....	40
2.9.4 Quantifizierung der RNA und Qualitätskontrolle .....	41
2.9.5 Reverse Transkription.....	41

2.9.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	42
2.10	Bisulfitbehandlung und Pyrosequenzierung .....	44
2.10.1	Isolierung und Bisulfitkonversion genomischer DNA .....	45
2.10.2	Amplifikation der bisulfitbehandelten Proben mittels Polymerasekettenreaktion .....	46
2.10.3	Qualitative Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	48
2.10.4	Pyrosequenzierung.....	49
2.11	Statistische Auswertung .....	52
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
3.1	Auswirkungen der nasalen Exposition mit <i>L. lactis</i> auf die experimentelle Atemwegsentzündung von BALB/c Mäusen .....	54
3.1.1	Atemwegsreagibilität.....	54
3.1.2	Lungenhistologie .....	55
3.1.3	mRNA-Expression von Muc5ac im Lungengewebe .....	57
3.1.4	Bronchoalveoläre Lavage .....	58
3.1.5	Immunglobulin-Konzentration im Serum .....	60
3.1.6	Zusammenfassung der Phänotypanalysen .....	62
3.2	Einfluss der <i>L. lactis</i> Exposition auf die Zytokinproduktion und –expression in mononukleären Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz.....	62
3.2.1	mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in mononukleären Zellen bronchialer Lymphknoten .....	63
3.2.2	Zytokinproduktion in mononukleären Zellen bronchialer Lymphknoten .....	64
3.2.3	mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in mononukleären Zellen der Milz .....	67
3.2.4	Zytokinproduktion in mononukleären Zellen der Milz .....	68
3.3	Einfluss der Behandlung mit <i>L. lactis</i> auf den DNA-Methylierungsstatus von IL-5, IL-10 und des IFN $\gamma$ -Promotors .....	71
3.3.1	Promotor-Methylierung von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in T-Zellen bronchialer Lymphknoten .....	71
3.3.2	Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors in T-Zellen der Milz .....	76

3.3.3 Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors zwischen CD25 <sup>-</sup> -Zellen und CD25 <sup>+</sup> -Zellen .....	77
3.3.4 Vergleich der Grund-Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors zwischen CD4 <sup>+</sup> Zellen aus bronchialen Lymphknoten und CD4 <sup>+</sup> Zellen aus der Milz.....	80
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
4.1 Intranasale Applikation von <i>L. lactis</i> schützt vor der Entstehung einer asthmatischen Entzündung im Mausmodell .....	84
4.2 Die <i>L. lactis</i> -Applikation beeinflusst die Zytokinproduktion von mononukleären Zellen.....	86
4.2.1 Lokale Effekte der <i>L. lactis</i> Exposition (Lymphknoten).....	87
4.2.2 Systemische Effekte der <i>L. lactis</i> Exposition (Milz).....	90
4.3 Die <i>L. lactis</i> -Applikation hat keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus ausgewählter Genloci .....	92
4.4 Unterschiede in der IFN $\gamma$ Grund-Methylierung .....	96
4.4.1 IFN $\gamma$ Grund-Methylierung in CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen .....	96
4.4.2 IFN $\gamma$ Grund-Methylierung in Lymphknoten und Milz.....	96
4.5 Ausblick.....	97
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
5.1 Summary.....	99
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
<b>9 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....</b>	<b>117</b>

<b>10 CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>118</b>
<b>11 DANKSAGUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>12 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>120</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Asthma bronchiale**

### **1.1.1 Definition**

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die klinisch durch anfallsweise auftretende Episoden von Giemen und Brummen sowie thorakalem Engegefühl und Atemnot charakterisiert ist. Unter Therapie, teilweise auch spontan, sind die Symptome meist reversibel (Bateman et al., 2008).

Es werden klassischerweise zwei Formen des Asthma bronchiale unterschieden: das allergenassoziierte extrinsische Asthma und das nicht-atopische intrinsische Asthma, welches auf viralen Atemwegsinfektionen oder der Inhalation chemischer Noxen beruht. Daneben wird in letzter Zeit immer deutlicher, dass möglicherweise weitere Subtypen des Asthmas mit eigenen klinischen und pathophysiologischen Charakteristika existieren, die es noch genauer zu definieren gilt (Anderson, 2008).

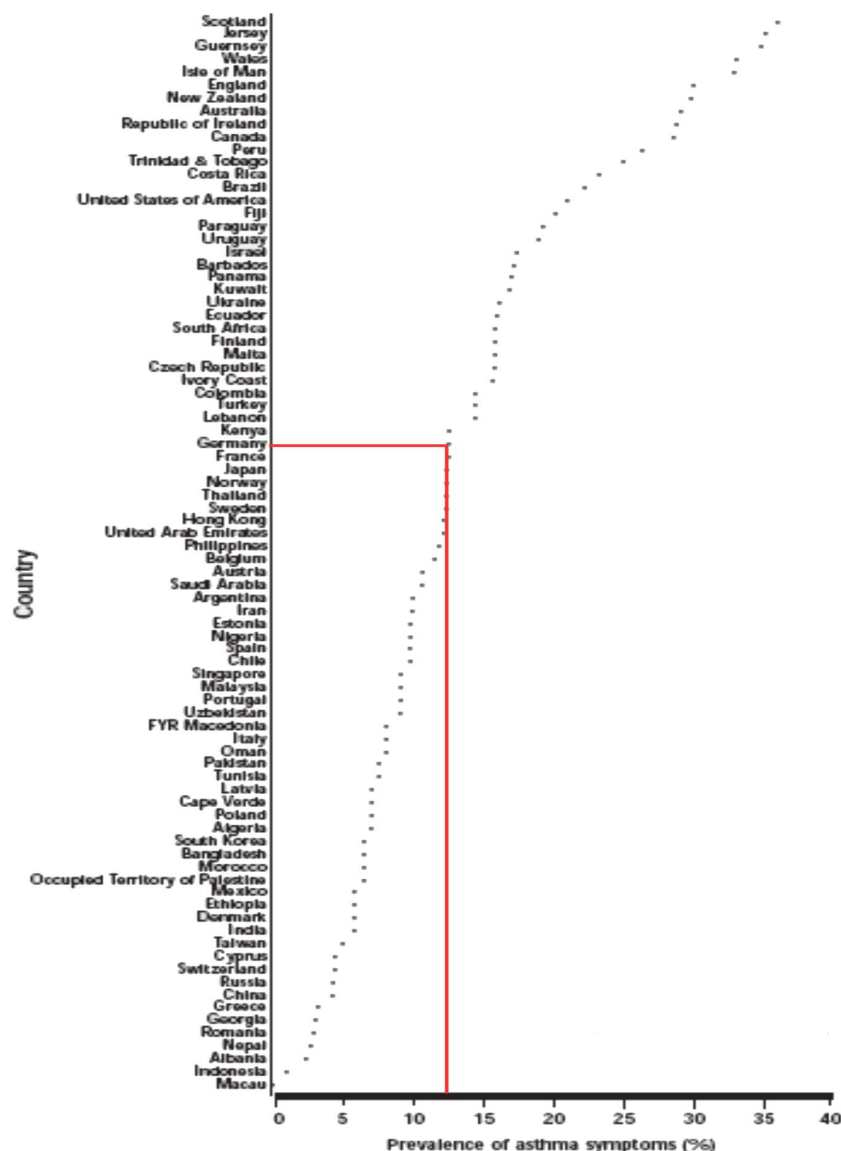
Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem extrinsischen Asthma. Dieses wird durch allergische Faktoren wie z.B. Aeroallergene hervorgerufen, zu denen Pollen, Hausstaubmilbenkot und Epithelien von Haustieren gehören. Pathogenetische Grundlage der Erkrankung bildet eine von T-Helferzellen des Typs 2 (Th2) gesteuerte bronchiale Entzündungsreaktion. Diese ist charakterisiert durch die Präsenz allergenspezifischen Immunglobulins (Ig) E sowie eosinophiler Granulozyten und Mastzellen. Die Entzündung führt zu einem Schleimhautödem, erhöhter Mukusproduktion und strukturellen Umbauvorgänge, in deren Folge ein dauerhaft hyperreagibles Bronchialsystem entsteht. Dies führt bei weiteren Allergenkontakten zur Atemwegsobstruktionen, welche die zu Beginn genannten klinischen Symptome zur Folge hat (Galli et al., 2008).

### **1.1.2 Epidemiologie**

An Asthma bronchiale leiden weltweit ungefähr 300 Millionen Menschen (Masoli et al., 2004). Eine globale Studie (Global Burden of Disease) der WHO kommt zu dem Ergebnis, dass Asthma zu ähnlich starken Einschränkungen der Lebensqualität führt wie Diabetes mellitus oder Leberzirrhose (World Health Organization, 2008). Zudem bewirkt Asthma eine starke ökonomische Belastung der Gesellschaft durch direkte

Behandlungskosten im Gesundheitssystem und indirekte Kosten durch Krankschreibungen und Ausfall von Arbeitskraft (Bahadori et al., 2009).

Bei Betrachtung der weltweiten Asthmaprävalenzen fallen große Unterschiede in der regionalen Verteilung auf. Bevölkerungen mit einem westlichen Lebensstil, vor allem englischsprachige Industrienationen, sind besonders von Asthma betroffen, während in Entwicklungsländer weniger Menschen erkrankt sind. So findet man in Schottland mit 18,4% Erkrankten die weltweit höchste Prävalenz, in Indonesien dagegen eine der niedrigsten mit 1,1%. In Deutschland sind 6,9% der Bevölkerung betroffen (Masoli et al., 2004).



**Abbildung 1: Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome bei 13- bis 14-jährigen Jugendlichen**

In Staaten mit westlichem Lebensstil finden sich die höchsten Asthmaprävalenzen, während diese in Entwicklungsländern geringer ausfallen. (Nach: The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report; Allergy 2004; Volume 59, Issue 5; pp. 469 – 478)

Neben den regionalen Unterschieden zeigte sich in großen epidemiologischen Studien bei Erwachsenen (ECHRS-Studie: European Community Respiratory Health Survey) und Kindern (ISAAC-Studie Phase I und III: International Study of Asthma and Allergy in Childhood), dass die Asthmaprävalenz in den letzten Jahrzehnten besonders in den Industrienationen extrem zugenommen hat, wobei prognostiziert wird, dass die Zahl der Asthmaerkrankten bis 2025 weltweit um weitere 100 Millionen Betroffene steigen wird. Besonders stark nahm die Erkrankung in der Gruppe der 6- bis 7-jährigen Kinder zu (Masoli et al., 2004; Asher et al., 2006). Dies zeigt sich auch in Deutschland, wo zur Zeit etwa 10% aller Kinder erkrankt sind, was Asthma zur häufigsten chronischen Erkrankung im Kindesalter macht (Maziak et al., 2003).

### **1.1.3 Immunologische und pathophysiologische Grundlagen von Asthma**

Im Rahmen der ständigen Auseinandersetzung des menschlichen Organismus mit der Umwelt ist es Aufgabe des Immunsystems, pathogene Keime gezielt abzuwehren sowie apathogene Antigene zu erkennen und die Immunantwort zur Vermeidung chronischer Entzündungszustände entsprechend herunterzuregulieren (Lloyd and Hawrylowicz, 2009). Bei Menschen mit einer Atopie, einer Prädisposition, allergische Reaktionen zu entwickeln, kommt es zu einer übersteigerten Immunantwort auf apathogene Antigene. Diese werden als Allergene bezeichnet und sind meist Proteine, oft mit proteolytischer Aktivität (Georas et al., 2010).

In der Lunge wird beim ersten Kontakt mit einem Aeroallergen eine Sensibilisierung ausgelöst, die zunächst symptomlos bleibt. Erneuter Kontakt führt zu einer entzündlichen Frühreaktion, gefolgt von einer Spätreaktion. Bei häufigen Allergenkontakten findet im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion ein Umbauprozess (so genanntes „Remodeling“) der Atemwege statt.

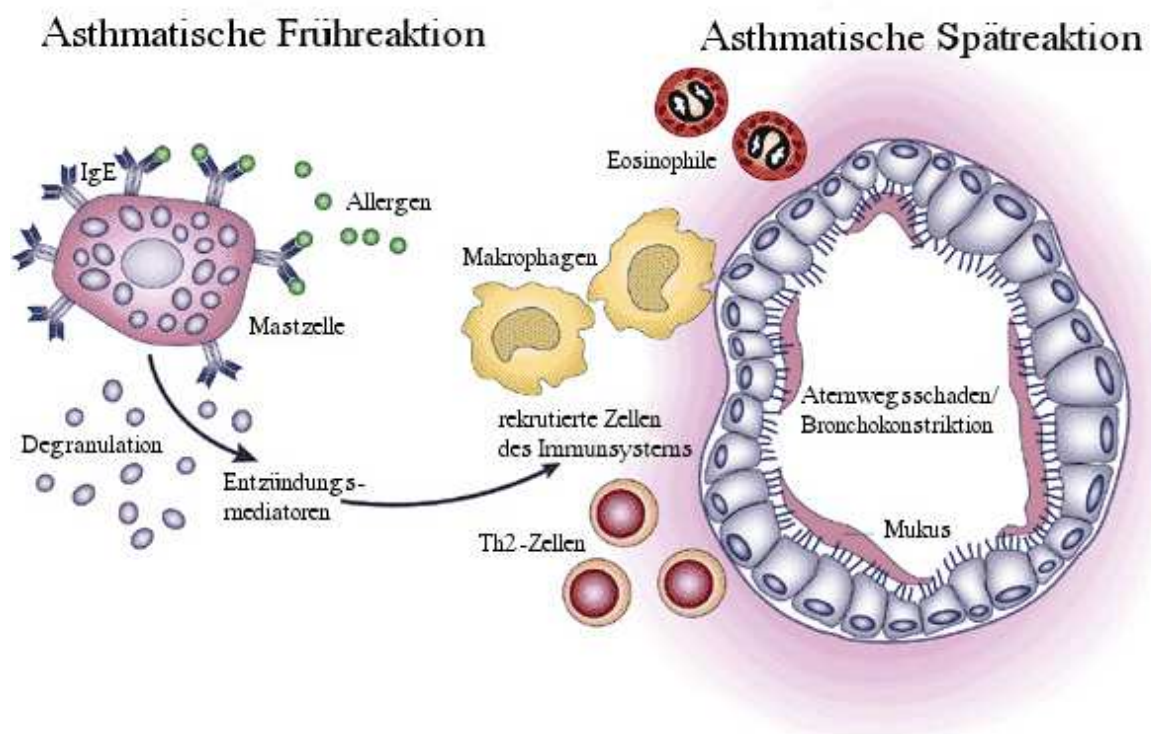
In der Lunge werden inhalierte Antigene von intraepithelial und submukosal sitzenden dendritischen Zellen (DCs) erkannt. Dies geschieht über spezielle Rezeptoren, die „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), wie z.B. Toll-like Receptors (TLR), NOD-like Receptors, C-type Lectin Receptors, welche hochaffin an „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) binden. Letztere sind Oberflächenstrukturen, die vor allem in Mikroorganismen vorkommen. Zudem haben DCs Rezeptoren für „Damage-Associated Molecular Patterns“ (DAMPs), die bei Gewebsschäden entstehen, so dass

sie auch ohne direkten Kontakt mit dem Pathogen eine Immunantwort auslösen können (Lambrecht and Hammad, 2009).

Auch Allergene aktivieren DCs, indem diese direkt oder in Kombination mit PAMPs (z.B. Lipopolysaccharid, einem Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien) von TLRs erkannt werden. Dies führt zu einer Stimulation der DCs. Allergene mit proteolytischer Aktivität können außerdem zu Epithelschäden führen und DAMPs freisetzen, die ebenfalls eine DC-Aktivierung bewirken (Murdoch and Lloyd, 2009). Aktivierte DCs migrieren sowohl bei Kontakt mit Pathogenen als auch Allergenen in lokale Lymphknoten. Dort präsentieren sie das phagozytierte und prozessierte Antigen über den „Major Histocompatibility Complex II“ (MHC II) naiven CD4<sup>+</sup>(Th0)-Zellen. Diese differenzieren in unterschiedliche T-Effektorzellen (Murphy and Walport, 2008). Bei der Sensibilisierung im Rahmen einer allergischen Reaktion erfolgt einer Differenzierung zu Th2-Zellen in einem von Interleukin (IL)- 4 dominierten Zytokinmilieu, das initial möglicherweise durch basophile Granulozyten kreiert wird (Yoshimoto et al., 2009). Ausdifferenzierte Th2-Zellen produzieren unter anderem die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, wobei ersteres maßgeblich am Immunglobulin-Klassenwechsel hin zu einer antigenspezifischen IgE-Produktion der B-Zellen beteiligt ist. IgE zirkuliert im Blut und bindet an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor von Mastzellen, die durch Chemokine in die Atemwege rekrutiert werden (Murphy and Walport, 2008). Ein erneuter Allergenkontakt bewirkt eine Quervernetzung der gebundenen IgE-Antikörper (AK) mit der Folge einer Degranulation der Mastzellen. Der daraufhin freigesetzte Cocktail an Entzündungsmediatoren (Histamine, Prostaglandine, Leukotriene) führt innerhalb von Minuten zur allergischen Frühreaktion mit einer Konstriktion der glatten bronchialen Muskulatur, einer Gefäßdilatation mit Ödembildung und einer vermehrten Mukusproduktion, was im Symptom der akuten Atemnot resultiert (Galli et al., 2008).

Die asthmatische Spätreaktion, die nach 2 bis 6 Stunden entsteht, reflektiert die Rekrutierung vieler Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in die Atemwege. Besonders eosinophile Granulozyten sind zahlreich und setzen eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren (Major Basic Protein, Eosinophiles Kationisches Protein, Eosinophile Peroxidase) frei. Initiiert wird die Spätreaktion durch langsam freigesetzte Botenstoffe der Mastzellen, sowie durch antigenspezifische Th2-Zellen (Holgate and Polosa, 2008).

Durch wiederholte Allergenexposition und somit inflammatorische Reaktionen kommt es zur dauerhaften Ansiedlung von Zellen des angeborenen (eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, Makrophagen) und des adaptiven Immunsystems (T-Zellen, B-Zellen) im Lungengewebe. Durch deren Interaktion wird der Entzündungszustand kontinuierlich aufrechterhalten, vergleichbar mit einer chronischen Wunde. Es finden Umbauvorgänge des Lungengewebes („Airway Remodeling“) statt, resultierend in einer Becherzellhyperplasie, einer Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur und einer verstärkten Vaskularisierung. Parallel beginnen Reparaturvorgänge u.a. mit einer charakteristischen Narbenbildung durch Kollagenablagerungen (Kollagen Typ I, Typ III und Typ V) in der Lamina reticularis. Eine durch die Inflammation geschädigte Epithelbarriere begünstigt zusätzlich die Sensibilisierung gegenüber weiteren Allergenen (Zweitsensibilisierung), was eine Aufrechterhaltung von Entzündung, Reparaturvorgängen und weiteren Schäden bedeutet (Galli et al., 2008).



**Abbildung 2: Überblick über die asthmatische Früh- und Spätreaktion**

Ein Allergen bewirkt über Quervernetzung von IgE-Antikörpern eine Degranulation von Mastzellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen. Anschließende Rekrutierung von Zellen des Immunsystems führt zur asthmatischen Spätreaktion (modifiziert nach: Lukacz N., Role of chemokines in the pathogenesis of asthma, Nature Reviews Immunology, November 2001, Volume 1, pp. 108 – 116).

### **1.1.4 Bedeutung von T-Lymphozyten und Zytokinen bei der Steuerung der asthmatischen Entzündungsreaktion**

Bei der Steuerung und Regulation von Immunantworten spielen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine zentrale Rolle. Nach ihrer Entwicklung im Thymus zirkulieren sie als naive Th0-Zellen im Kreislauf und können nach Antigenkontakt zu verschiedenen Subpopulationen ausdifferenzieren. Diese definieren sich durch ein bestimmtes Zytokinsekretionsmuster und nehmen unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem wahr. Th1-Zellen wirken protektiv gegen intrazelluläre Bakterien, Th2-Zellen steuern die Abwehr gegenüber Nematoden und sind entscheidend für allergische Reaktionen. Die kürzlich entdeckten Th17-Zellen sind wahrscheinlich verantwortlich für den Schutz vor extrazellulären Bakterien (Romagnani, 2006).

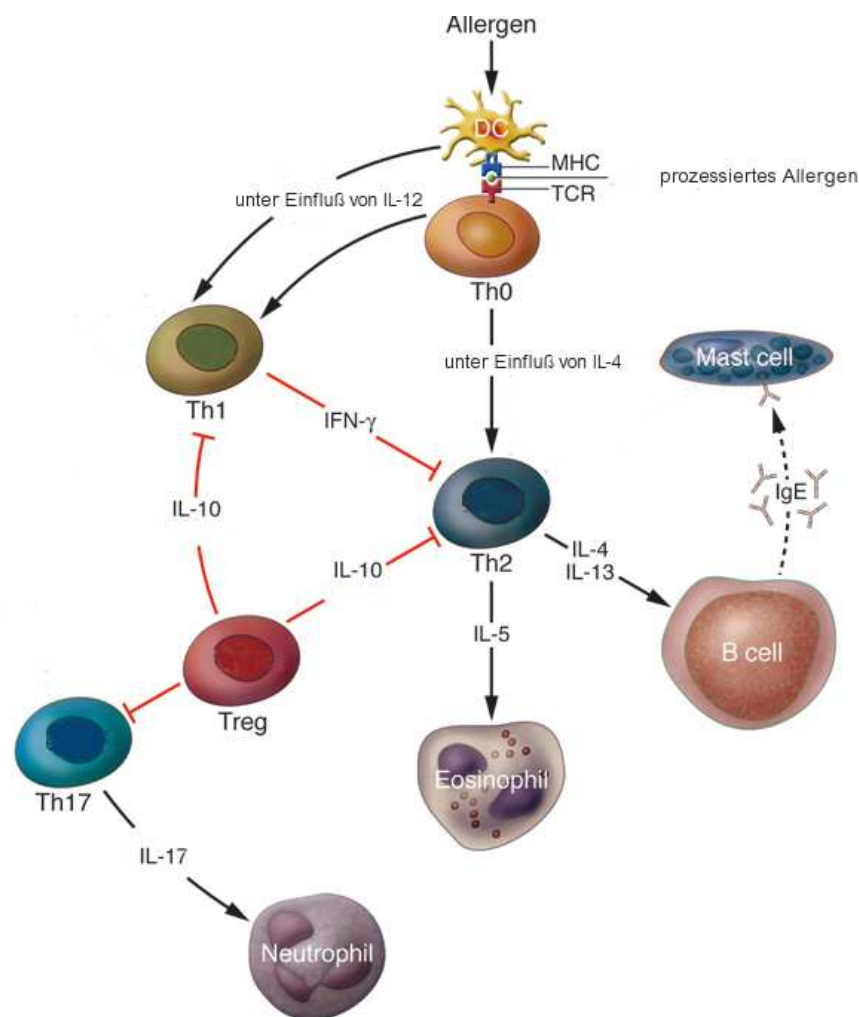
Charakteristisch für die asthmatische Früh- und Spätreaktion ist die Th2-Zelle, die mit den Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 wesentliche Schritte der Inflammation steuert (Afshar et al., 2008). IL-4 spielt initial eine wichtige Rolle bei der Differenzierung naiver Th0-Zellen zu Th2-Zellen. Zusammen mit IL-13 bewirkt IL-4 den Antikörperklassenwechsel der B-Zellen zu IgE. IL-13 führt zusätzlich zu vermehrter Mukussekretion und erhöht die Atemwegsreaktivität. IL-5 ist entscheidend für die Reifung und Differenzierung eosinophiler Granulozyten im Knochenmark (Barnes, 2008).

Th1-Zellen differenzieren aus Th0-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 während der Antigenpräsentation durch DCs (Trinchieri et al., 2003). Das vorherrschend produzierte Zytokin einer Th1-Zelle ist Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), das in der Lage ist, eine Th2-Immunantwort zu supprimieren. Es wurde gezeigt, dass IFN $\gamma$  im experimentellen Asthma eine bronchiale Eosinophilie sowie eine bronchiale Hyperreagibilität verhindern kann (Nakajima and Takatsu, 2007). Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 kann wiederum eine Entwicklung zu Th1-Zellen inhibieren (Skapenko et al., 2004). Deshalb wird ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen als wichtiger Faktor in der Entstehung von Asthma bronchiale gesehen (Robinson, 2000).

Erst kürzlich entdeckte man neben den lange bekannten Th1- und Th2-Zellen (Mosmann and Coffman, 1989) weitere T-Zellpopulationen, die ebenfalls mit in das asthmatische Entzündungsgeschehen eingreifen. Th17-Zellen mit den Zytokinen IL-17 und IL-23 spielen eine Rolle bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Atemwege und scheinen mit schweren Asthmaverlaufsformen assoziiert zu sein (Traves and Donnelly, 2008). Die seit kurzem postulierte Subpopulation IL-9-sezernierender

Th9-Zellen könnte in der chronischen Entzündungsphase des Asthma von Bedeutung sein (Soroosh and Doherty, 2009).

An der Balancierung der asthmatischen Entzündungsreaktion wird neben dem Gleichgewicht von Th1- und Th2-Zellen auch regulatorischen T-Zellen (Tregs) eine Bedeutung beigemessen. Diese Zellen kommen zum Teil bereits angeboren als eigene Zellpopulation vor (nTregs), z.T. sind sie aus peripheren naiven Th0-Zellen induzierbar (iTregs) (Chen et al., 2003; Zhu and Paul, 2010).



**Abbildung 3: Interaktionen von Immunzellen im Rahmen der asthmatischen Entzündungsreaktion**

Th2-Zellen differenzieren unter IL-4-Einfluß aus Th0-Zellen. Mit den Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 sind sie die vorherrschenden Zellen bei der Steuerung der asthmatischen Entzündungsreaktion. Th1-Zellen können über IFN $\gamma$  hemmend auf sie einwirken. Inhibitorisch auf alle Th-Zellpopulationen wirken Tregs über IL-10. Th17-Zellen rekrutieren neutrophile Granulozyten in die Atemwege (modifiziert nach: Barnes PJ, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, Journal of Clinical Investigation 2008, Volume 118, Issue 11, pp. 3546 - 3556 ).

Tregs sezernieren u.a. IL-10 und können darüber Th1- und Th2-Immunantworten supprimieren und Autoreaktivität, überschießende Immunreaktionen und chronische Entzündungsgeschehen verhindern (Hawrylowicz and O'Garra, 2005). Neben Tregs nehmen aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems regulatorische Aufgaben wahr. So beeinflussen DCs über sezerniertes IL-6 die Funktion von Tregs und Th2-Zellen (Doganci et al., 2005). Des Weiteren spielt IL-6 nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe eine Rolle bei der Übertragung eines Asthmaschutzes von Muttertieren auf ihren Nachwuchs nach mikrobieller Stimulation (Conrad et al., 2009).

### **1.1.5 Ursachen von Asthma**

Die Komplexität der Erkrankung lässt sich anhand der Vielfalt an Faktoren, die bei der Entstehung von Asthma beteiligt sind, erkennen. Eine deutliche genetische Komponente in der Entstehung des Asthma bronchiale wurde im Rahmen von Zwillingsstudien aufgezeigt (Skadhauge et al., 2000). Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass Kinder von Eltern mit allergischem Asthma ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben, welches bis zu 60 - 80% reicht, wenn beide Elternteile betroffen sind (Herold, 2010). In umfangreiche Genanalysen konnten zahlreiche Genpolymorphismen (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*) ermittelt werden, die mit einem erhöhten Asthmarisiko assoziiert sind (Imboden et al., 2006; Ober and Hoffjan, 2006; Wen et al., 2006; Moffatt et al., 2007). Mit besonders schweren Asthma-Verlaufsformen lassen sich wiederum andere SNPs in Verbindung bringen. Dabei gibt es kein „Asthma-Gen“. Vielmehr sind viele Genloci beteiligt, deren Zusammenwirken im Einzelnen noch nicht vollständig verstanden ist und weiterer Forschung bedarf (Vercelli, 2008).

Um die in den letzten Dekaden extrem gestiegenen Asthmaprävalenzen zu erklären, müssen neben der genetischen Komponente noch weitere Faktoren herangezogen werden. So zeigten sich z.B. 1990 deutlich unterschiedliche Asthmaprävalenzen in den sich genetisch ähnelnden Populationen Ost- und Westdeutschlands nach nur 40jähriger Trennung (von Mutius E. et al., 1992). Die zunächst niedrige Zahl Asthmaerkrankter in Ostdeutschland stieg in den Jahren nach der Wende rasch an, so dass eine veränderte Umwelt und ein veränderter Lebensstil eine schlüssige Erklärung boten (Heinrich et al., 1999).

Umweltfaktoren als entscheidende Ursache gestiegener Asthmaprävalenzen postulierte Strachan bereits 1989 in der so genannten „Hygiene-Hypothese“. Sie besagt, dass sich mit zunehmender Hygiene in wohlhabenden Ländern und fehlender Exposition

gegenüber Mikroorganismen in der Kindheit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer allergischen Erkrankung erhöht (Strachan, 1989). Gestützt wurde diese Hypothese durch zahlreiche epidemiologische Studien. Bach (Bach, 2002) zeigte, dass parallel zum Anstieg allergischer Erkrankungen in industrialisierten Ländern die Anzahl bakterieller und viraler Infektionen zurückgegangen war. In der Schweizer SCARPOL (Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen)-Studie wurde nachgewiesen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufwuchsen und somit einer signifikant höheren mikrobiellen Exposition ausgesetzt waren, ein um 50% reduziertes Asthmarisiko aufwiesen (Braun-Fahrlander et al., 1999). Weitere Bestätigung lieferte die ALEX (Allergien und Endotoxin)-Studie, mit Kindern aus Deutschland, Österreich und der Schweiz, die ebenfalls in einem bäuerlichen Umfeld aufwuchsen. Hier zeigte sich der protektive Effekt ausgesprochen stark ausgeprägt, wenn die bakterielle Exposition im frühen Kindesalter erfolgte. Insbesondere war auch die pränatale Exposition durch im Stall arbeitende schwangere Mütter mit einem Schutz vor der Entwicklung von Asthma assoziiert (Riedler et al., 2001; Ege et al., 2006). Da der protektive Effekt bis in das Erwachsenenalter anhält (Radon et al., 2004), war es von besonderem Interesse herauszufinden, welche Faktoren des bäuerlichen Lebens entscheidend für den Asthmaschutz sind.

### **1.1.6 Mausmodelle in der Asthmaforschung**

Um klare Ursache-Wirkungs-Beziehungen zu definieren, war es erforderlich, die epidemiologisch gewonnenen Erkenntnisse unter experimentellen Bedingungen im Labor zu analysieren. Dazu wurden Mausmodelle des Asthma bronchiale etabliert, denn Tiermodelle erlauben es Teilaspekte komplexer Erkrankungen zu untersuchen und dadurch grundlegende Mechanismen der Entstehung zu erkennen. Das Immunsystem der Hausmaus (*Mus musculus*) ist bereits gut beschrieben und stimmt in wesentlichen Mechanismen allergischer Reaktionen (Atemwegsüberempfindlichkeit, eosinophile Atemwegsentzündung, vermehrte Mukusproduktion) mit dem menschlichen überein (Herz et al., 1996a). Im Mausmodell wird eine Sensibilisierung meist durch Injektion eines artfremden Proteins hervorgerufen. In zahlreichen Studien hat sich hierfür das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) als geeignet erwiesen. Durch lokale Provokation, beispielsweise über die Applikation eines allergenhaltigen Aerosols in die Atemwege, wird anschließend eine lokale Entzündungsreaktion und somit experimentelles Asthma hervorgerufen (Renz et al., 1993; Herz et al., 1996b; Herz et al., 1998). In der

vorliegenden Arbeit wurde als Modelorganismus der Bagg Albino (BALB)/c Maus-Inzuchtstamm gewählt, da dieser starke Th2-Reaktionen auf Allergene entwickelt (Boyce and Austen, 2005).

### **1.1.7 *Lactococcus lactis* G121**

Im Mausmodell erwies sich die Inhalation von Stallstaub als protektiv im Bezug auf experimentelles Asthma (Peters et al., 2006). Aus der mikrobiellen Flora im Stallstaub, gesammelt in Tierställen, die mit einem Schutz vor Asthma assoziiert sind, wurden mehrere Bakterien isoliert (Korthals et al., 2008). Für *Acinetobacter lwoffii* (*A. lwoffii*) F78 und *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) G121 konnte gezeigt werden, dass deren intranasale (i.n.) Applikation, bei gleichzeitiger OVA-Sensibilisierung der Mäuse die Entstehung charakteristischer Parameter einer asthmatischen Erkrankung signifikant verringerte (Verringerung der bronchiale Hyperreagibilität, geringere Eosinophilenzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL), Reduktion der Becherzellhyperplasie in der Lungenhistologie) (Debarry et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde mit *L. lactis* G121 gearbeitet, das ein Gram-positives kokkenförmiges Bakterium aus der Ordnung der Milchsäurebakterien ist. Lactokokken besiedeln viele Pflanzen und die Haut von Säugetieren. Außerdem kommen sie in Rohmilch und Rohmilchprodukten vor. Dabei ist *L. lactis* mit einem Anteil von 38% das am häufigsten in Milchprodukten zu findende Milchsäurebakterium (Casalta and Montel, 2008). Für den Menschen gilt *L. lactis* als apathogen und trägt den Status „Generally Recognized As Safe“ (GRAS) (Salminen et al., 1998).

## **1.2 Epigenetik**

### **1.2.1 Definition**

Im Rahmen der menschlichen Entwicklung entsteht aus einer Zelle nach der Befruchtung ein vielzelliger Organismus mit einer großen Zahl spezialisierter Gewebetypen, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell unterscheiden. Dennoch besitzt beispielsweise eine Leberzelle die identische DNA-Sequenz wie eine Herzzelle. Um den Vorgang der Entwicklung verschiedener Phänotypen aus einem Genotyp zu beschreiben nutzte Waddington 1942 erstmals den Begriff Epigenetik (Waddington, 1942). Auch Mutationen der Sequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNA) führen zu neuen Phänotypen. Um diesen Prozess aus dem Gebiet der Epigenetik

auszuschließen, erfolgte durch Riggs et. al 1975 eine neue Definition. Epigenetik - so die Autoren - betrifft Änderungen der Genfunktion, die mitotisch und meiotisch vererbbar sind, und nicht durch Änderung der DNA-Sequenz zu erklären sind (Russo, 1996). Voraussetzung in dieser Definition ist weiterhin die Vererbbarkeit der epigenetischen Modifikation. Um aktuellen Forschungsergebnissen Rechnung zu tragen, sind in der neusten Definition neben vererbbaaren auch transiente epigenetische Veränderungen eingeschlossen. Epigenetische Ereignisse sind strukturelle Modifikationen des Chromatins, um veränderte (zelluläre) Aktivitätszustände zu registrieren, zu signalisieren oder aufrechtzuerhalten (Bird, 2007).

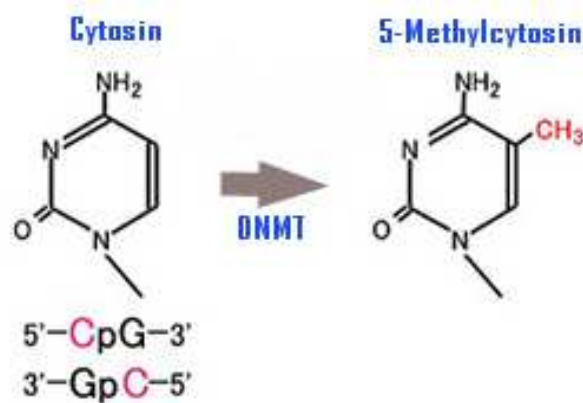
### 1.2.2 Biochemie der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung gilt als meistuntersuchte epigenetische Modifikation. Es handelt sich um die Anlagerung einer Methylgruppe über eine kovalente Bindung an eine Base der DNA. Bei Eukaryonten findet dieser Prozess fast ausschließlich am 5'-Kohlenstoff von Cytosin (C) statt, wenn es 3' direkt von der Base Guanosin (G) gefolgt wird, also das Dinukleotid Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) vorliegt (Bird, 2002). Diese Modifikation wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. Sie nutzen S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor, ein Produkt des Methionin-Homocystein-Stoffwechsels, dessen Vorhandensein wiederum von weiteren Co-Faktoren wie Folsäure und Vitamin-B12 abhängt (Ulrey et al., 2005).

Bisher sind 4 verschiedene DNMTs bekannt, wobei die DNMT2 *in vitro* nur schwache Aktivität zeigt und *in vivo* wahrscheinlich als Ribonukleinsäure (RNA)-Methyltransferase dient (Hermann et al., 2003; Tost, 2010). Man kann funktionell zwei Gruppen unterscheiden. Zur ersten gehört die DNMT1. Sie methyliert DNA im Rahmen der Replikation und braucht als Vorlage einen hemi-methylierten DNA-Strang, um den unmethylierten, neu gebildeten Strang nach diesem Vorbild zu vervollständigen. Sie erhält ein bereits vorhandenes Methylierungsmuster aufrecht und wird deshalb als „Maintenance-DNMT“ bezeichnet. Zur zweiten Gruppe gehören die DNMT3a und DNMT3b, die als „*de novo*-DNMTs“ bezeichnet werden. Sie sind in der Lage, unmethylierte CpGs neu zu methylieren. Wie genau dieser Vorgang initiiert wird ist noch unklar (Klose and Bird, 2006).

Zur Demethylierung werden zwei Mechanismen diskutiert, die passive und die aktive Demethylierung. Erstere entsteht durch Inhibition der Methylierung hemi-methylierter DNA-Stränge, der sog. „Maintenance-Methylierung“, während der Replikation. Über

die Möglichkeit einer aktiven Demethylierung ist dagegen weniger bekannt. In Erwägung gezogen wird eine enzym-abhängige direkte Demethylierung, oder eine Demethylierung im Rahmen von DNA-Reparatur-Vorgängen. Bei Letzterem wird zunächst von einer aktiven enzymatischen Desaminierung von 5-Methylcytosin ausgegangen. Das entstehende Thymin führt zu DNA-Fehlpaarungen, die anschließend durch den Mechanismus der Basenexcisionsreparatur unter Entstehung von nicht-methyliertem Cytosin korrigiert werden (Gehring et al., 2009).



**Abbildung 4: Mechanismus der DNA-Methylierung**

DNA-Methyltransferasen lagern in eukaryontischer DNA bei vorliegender Basenpaarung von Cytosin und Guanin an das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosin eine Methylgruppe an (modifiziert nach: Taylor SM, p53 and deregulation of DNA methylation in cancer, Cellscience Reviews 2006, Volume 2, Number 3).

### 1.2.3 CpG-Inseln

CpG Motive in eukaryontischer DNA zeichnen sich durch zwei Besonderheiten aus:

1) CpGs sind im Genom unterrepräsentiert. Bei einem GC-Gehalt des menschlichen Genoms von 41%, wären stochastisch 4% CpGs zu erwarten. Tatsächlich liegt der CpG-Anteil aber nur bei 0,8% (Lander et al., 2001). Dies hängt damit zusammen, dass methyliertes Cytosin spontan zu Thymin desaminieren kann. Da Thymin eine natürlich in der Gensequenz vorkommende Base ist, wird diese Mutation von Reparaturenzymen nicht erkannt und bleibt bestehen. Die Desaminierung nicht-methylierten Cytosins zur DNA-fremden Base Uracil wird dagegen repariert. Nicht-Methylierung beinhaltet also eine Schutzfunktion vor Mutation (Antequera, 2003).

2) CpGs verteilen sich nicht gleichmäßig im Genom, sondern in CpG-Inseln (CGI). Diese sind definiert als 500bp lange Abschnitte der DNA, die einen Anteil von Guanin und Cytosin von mehr als 55% enthalten und eine um den Faktor 0,65 höhere CpG-

Frequenz enthalten als bei stochastischer Verteilung zu erwarten wäre (Takai and Jones, 2002).

Die CGIs sind nicht zufällig auf das Genom verteilt, sondern zu 60 – 70% mit Promotorregionen des menschlichen Genoms assoziiert (Illingworth and Bird, 2009). Während ca. 80% der CpGs bei Maus und Mensch methyliert sind, trifft das für die CpG-Dinukleotide innerhalb von CGIs selten zu (Antequera, 2003). Zudem unterscheidet sich der Methylierungsstatus der CGIs in verschiedenen Geweben eines Organismus, so dass eine regulatorische Aufgabe im Rahmen der Gentranskription angenommen werden kann (Illingworth et al., 2008).

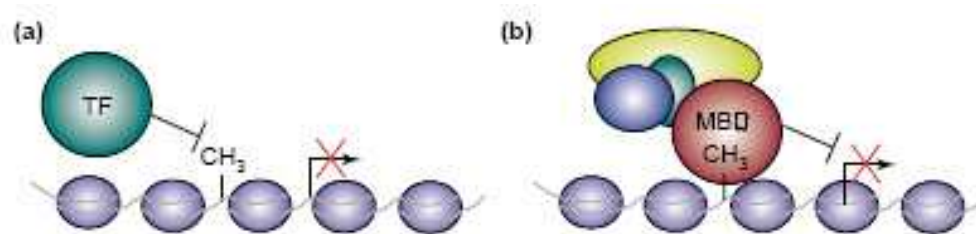
#### **1.2.4 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen als Regulatoren der Genexpression**

Die Genexpression kann in einer eukaryontischen Zelle auf verschiedenen Stufen reguliert werden. Dies beinhaltet die Ebene der Transkription und Translation sowie nachfolgende Modifikationen von messenger RNA (mRNA) oder Proteinen. Ferner kann die Zelle durch Kontrolle von Transportwegen, wie beispielsweise vom Zellkern in das Zytoplasma oder durch Beschleunigung oder Hemmung von Abbauwegen, die Proteinmenge regulieren. Epigenetische Mechanismen wie die DNA-Methylierungen greifen bereits prätranskriptionell in die Genregulation ein. DNA-Methylierungen im Bereich von Promotorregionen, die mit CGIs assoziiert sind, können die Transkription der entsprechenden Gene unterbinden (Jones and Chen, 2006). Umgekehrt führt eine Demethylierung der entsprechenden Genregionen zu einer Re-expression der zuvor „inaktiven“ Gene. Experimentell kann eine solche Demethylierung unter bestimmten Voraussetzungen durch die Gabe des DNMT-Inhibitors 5-Azacytidine (5-AzaC) erreicht werden (Sanchez-Abarca et al., 2010).

DNA-Methylierungen zur Kontrolle der Genexpression spielen in vielen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle: im Rahmen der Embryogenese beim „Imprinting“ (Reik et al., 2001; Horsthemke and Wagstaff, 2008) und der Chromosom-X-Inaktivierung (Heard and Disteché, 2006), zum Schutz des Erbgutes vor sich selbst replizierender DNA wie Transposons und retroviraler DNA (Yoder et al., 1997) oder im Bereich der Cancerogenese durch Assoziation mit der Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Feinberg, 2007).

Die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung erfolgt vermutlich über unterschiedliche Mechanismen. Zum einen ragen methylierte Cytosine in die große

Furche der DNA-Doppelhelix und können durch sterische Behinderung die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern (Hark et al., 2000). Weiterhin können „Methyl-CpG-Binde-Domäne“ (MBD)-Proteine an der Inhibition beteiligt sein. Diese Proteine, von denen bisher sechs beschrieben sind, binden über eine spezielle Domäne an methylierte CpGs. Anschließend rekrutieren die Proteine weitere Co-Repressoren und verhindern so eine Genexpression (Klose and Bird, 2006). Zu den rekrutierten Co-Repressoren kann auch die Histondeacetylase gehören, die über eine Modifikation der Histone ebenfalls zur Transkriptionshinhibition beiträgt (Jones et al., 1998). Hier zeigt sich die enge Verknüpfung der DNA-Methylierung mit dem epigenetischen Mechanismus der Histonmodifikation.



**Abbildung 5: Mögliche Mechanismen der Transkriptionshinhibition durch DNA-Methylierung**

Die Methylierung der DNA verhindert entweder direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder führt über die Bindung von „Methyl-CpG-Binde-Domäne“ (MBD) Proteinen zur Rekrutierung weiterer Co-Repressoren (modifiziert nach: Klose, Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, Trends in Biochemical Sciences, Volume 31, Issue 2, pp.89 – 97).

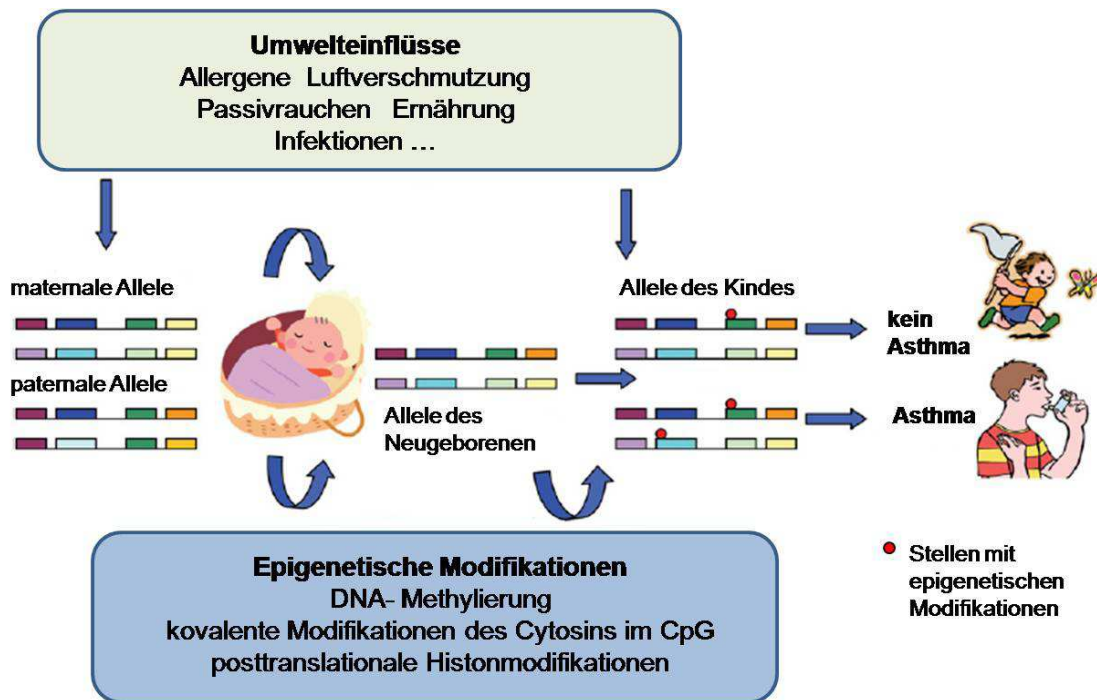
Die Histonproteine, um die sich die DNA windet, unterliegen einer Vielzahl an Modifikationen, die durch Änderung der Chromatinstruktur sowohl zu Transkriptionsaktivierung als auch Inhibierung führen können. Dazu gehören unter anderem Acetylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen, meist der aminoterminalen Fortsätze der Histone (Berger, 2007). Aufgrund der Vielzahl der Modifikationen wird analog zum genetischen Code von einem Histoncode gesprochen. Man geht davon aus, dass Histonmodifikationen für eine rasche und flexible Transkriptionskontrolle verantwortlich sind, während DNA-Methylierungen Gene langfristig aktivieren und deaktivieren können und diesen Zustand auch an Tochterzellen weitergeben (Reik, 2007).

## 1.3 Asthma und Epigenetik

### 1.3.1 Epigenetik und Umwelteinflüsse

Anhand der Epigenetik lässt sich verdeutlichen, wie Umweltfaktoren Einfluss auf den Phänotyp eines Organismus nehmen. In Untersuchungen eineiiger Zwillinge wurde gezeigt, dass sich die DNA-Methylierungsmuster ihrer Genome in jungen Jahren noch stark ähneln. Mit zunehmendem Alter und damit einer zunehmenden Auseinandersetzung mit verschiedensten Umweltfaktoren traten stärkere Unterschiede im Methylierungsmuster auf (Fraga et al., 2005). Tierexperimente zeigten weiterhin, dass u.a. chemische Toxine (Anway et al., 2005) oder die Ernährung die DNA-Methylierung verändern und somit den Phänotyp beeinflussen können. Beispielsweise führte im Mausmodell eine Nahrungsergänzung mit Methylgruppendonatoren bei Muttertieren bei deren Nachwuchs zur Hypermethylierung eines Allels des Agouti-Locus einhergehend mit einer dunkleren Fellfarbe der Mäuse (Waterland and Jirtle, 2003). Auch mikrobielle Infektionen mit Bakterien (Nardone et al., 2007), Parasiten (Gutierrez et al., 2004) und Viren (Mikovits et al., 1998) können in Veränderungen der DNA-Methylierung resultieren.

In der Pathogenese des Asthma bronchiale wird, wie bereits erwähnt, neben einer genetischen Prädisposition insbesondere Umweltfaktoren ein großes Gewicht beigemessen, im Rahmen der Hygiene-Hypothese besonders mikrobiellen Erregern. Unter Berücksichtigung oben genannter Studien liegt es nahe, dass der epigenetische Mechanismus der DNA-Methylierung als Form einer Gen-Umwelt-Interaktion auch im Rahmen der Entstehung von Asthma eine Rolle spielen könnte. Dabei sind Umwelteinflüsse *in utero* und in frühester Kindheit von besondere Bedeutung (Miller and Ho, 2008). Unter Einbezug der Beobachtung, dass die Genexpressionen u.a. durch epigenetische Mechanismen reguliert ist, wird für die Pathogenese allergischer Erkrankungen in einer Studie postuliert, dass fehlende mikrobielle Exposition in der frühen Kindheit eine Demethylierung (und damit Aktivierung) des IFN $\gamma$ -Gens verhindert. Dadurch entstehe eine Th1/Th2-Dysbalance, die das Risiko einer Allergieentwicklung erhöhe (Vuillermin et al., 2009).



**Abbildung 6: Mögliche Rolle epigenetischer Mechanismen als Bindeglied von genetischer Prädisposition und Umweltposition in der Pathogenese des Asthma bronchiale**

(modifiziert nach: Miller R, Environmental Epigenetics and Asthma, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2008, Volume 177, pp. 567 - 573)

### 1.3.2 Epigenetische Regulation der Zytokinexpression

Während der Differenzierung von naiven Th0-Zellen in verschiedene Subpopulationen werden zellspezifische Zytokinexpressionsmuster aktiviert. Die Zytokinexpression ist von der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden genomischen Loci abhängig, welche wiederum durch epigenetische Modifikationen reguliert werden. Hierbei ist von Bedeutung, dass nicht nur der epigenetische Status der kodierenden Sequenz selbst über die erfolgreiche Transkription entscheidet, sondern auch epigenetische Modifikationen der nicht-kodierenden und teilweise weit vom eigentlichen Gen entfernten regulativen Elemente (z.B. Promotor, Enhancer, Silencer) entscheidend sind. Aufgrund klassischer Nachweise mittels DNase werden diese als HS (Hypersensitive Site) oder bei Entdeckung durch bioinformatische Methoden als CNS (Conserved Non-coding Sequence) bezeichnet (Wilson et al., 2009), wobei nicht jedes regulative Element zwangsläufig als HS oder CNS in Erscheinung tritt. DNA-Methylierungen regulativer Elemente können die Gen-Transkription verhindern (Schubeler et al., 2000; Jones and Chen, 2006).

Die codierenden Sequenzen für die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 bilden einen Gencluster, welcher auch als „Th2-Lokus“ bezeichnet wird. Diese Region ist evolutiv

konserviert und somit in Maus und Mensch strukturell sehr ähnlich. Das IL-4- und das IL-13-Gen sind benachbart zueinander, während das IL-5-Gen durch das DNA-Reparatur-Gen RAD50 getrennt von den beiden liegt. Ausführliche Analysen konnten zeigen, dass die Expression für diese Th2-Zytokine gemeinsam koordiniert wird. Wichtige Enhancer sind CNS1 (HS1 und HS2) und CNS2 (HS V), ein wichtiger Silencer ist HS IV. Weitere HSs im Bereich von RAD50 sind zu einer LCR (Locus Control Region) zusammengefasst (Ansel et al., 2006). Der hohe Grad an CpG-Methylierung (~90%) in naiven Th0-Zellen im Bereich der Promotoren, CNS1, CNS2 und dem Th2-Lokus-LCR ist vermutlich mit dafür verantwortlich, dass in naiven Th0-Zellen die Expression der entsprechenden Th2-Zytokine unterdrückt wird (Wilson et al., 2009). Speziell für das IL-5-Gen konnte mittels Methyl-Gruppen-Sensitiven Restriktionsenzymen (MSR) gezeigt werden, dass dieses in naiven Th0-Zellen und Th1-Zellen methyliert ist, während es nach Differenzierung zu Th2-Zellen demethyliert wird (Agarwal and Rao, 1998; Bird et al., 1998).

Im Gegensatz zum Th2-Lokus befinden sich keine weiteren Zytokin-Gene in der Nähe des IFN $\gamma$ -Lokus, so dass keine Zytokin-Co-Expressionen stattfinden. Der IFN $\gamma$ -Lokus ist in einem Bereich von 70 kb proximal des Transkriptionsstarts zwischen Mensch und Maus konserviert, bevor strukturelle Differenzen auftreten. Doch konnte gezeigt werden, dass sich in diesem Bereich die wesentlichen regulatorischen Elemente befinden (Schoenborn et al., 2007). Zu diesen gehören unter anderem der proximale und der distale IFN $\gamma$ -Promotor, für die nachgewiesen wurde, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Expression haben (Aune et al., 1997). Der murine proximale IFN $\gamma$ -Promotor enthält sechs CpG-Motive, die in naiven Th0-Zellen hypomethyliert sind. Kultivierung dieser Zellen unter Th2-polarisierenden Bedingungen führte zu einer Hypermethylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors, einhergehend mit einer verminderten IFN $\gamma$ -Expression (Jones and Chen, 2006). Eine Studie an humanen Th-Zellen lieferte ähnliche Ergebnisse (White et al., 2006).

Der IL-10-Lokus weist ebenfalls große Ähnlichkeit zwischen Maus und Mensch auf. In Th-Zellen wichtige regulative Elemente sind u.a. der distal gelegene Enhancer HS+6.45 sowie der proximal gelegene IL-10-Promotor (Saraiva and O'Garra, 2010). Dieser befindet sich in murinen Th2-Zellen in einem demethylierten Zustand, in Th1-Zellen ist er dagegen methyliert (Im et al., 2004). In humanen mononukleären Blutzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis korrelierte eine stärkere Methylierung des IL-10-Promotors mit einer verminderten IL-10-mRNA-Expression (Fu et al., 2007).

## 1.4 Fragestellung

Die steigende Asthmaprävalenz in den letzten Dekaden wird im Rahmen der Hygiene-Hypothese durch eine abnehmende Häufigkeit mikrobieller Infektionen in der frühen Kindheit erklärt. Verschiedene epidemiologische Studien stützen diese Hypothese und weisen nach, dass das Aufwachsen auf „traditionellen“ Bauernhöfen mit einer Asthmaprotektion einhergeht. Für das im bäuerlichen Umfeld isolierte Bakterium *L. lactis* konnte ein protektiver Effekt auf die Asthmaentstehung im akuten Mausmodell gezeigt werden. Über welche Mechanismen dieser Schutz vermittelt wird ist bisher unbekannt. Daher wurden für die vorliegende Arbeit unter Einbezug aktueller Erkenntnisse aus der Epigenetik und der Pathophysiologie des Asthma bronchiale folgende Hypothesen abgeleitet:

- Die protektive Wirkung von *L. lactis* resultiert aus Veränderungen der lokalen (bronchiale Lymphknoten) und systemischen Immunantwort (Milz) auf der Ebene der Zytokinexpression (mRNA) und Zytokinproduktion (Protein).
- Die veränderte Zytokinexpression und -produktion im Rahmen der *L. lactis* vermittelten Asthmaprotektion ist mit einer Veränderung des Methylierungsstatus der entsprechenden Promotorregion assoziiert.

Zur experimentellen Bestätigung dieser Hypothese sollten zunächst die Phänotypen des *L. lactis*-Akut-Versuchs reproduziert werden, um dann die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

- Welchen Einfluss hat die *L. lactis* Exposition von OVA-sensibilisierten Mäusen auf das Zytokinprofil von mononukleären Zellen aus der Milz und bronchialen Lymphknoten?
- Welchen Einfluss hat die *L. lactis*-Exposition von OVA-sensibilisierten Mäusen auf den DNA-Methylierungsstatus der proximalen Promotoren der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-5 und IL-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Milz und bronchialen Lymphknoten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mausmodell des experimentellen Asthmas und Immunmodulation mittels *L. lactis*

#### 2.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Weibliche 6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums in keimarmer Umgebung in einem individuell belüfteten Käfigsystem (IVC) gehalten. In einem Käfig befanden sich maximal vier Tiere, die durch individuelle Ohrmarken zu unterscheiden waren. Alle Mäuse erhielten ovalbuminfreies Futter und Wasser *ad libitum*. Bei konstanter Luftfeuchtigkeit und einer Raumtemperatur von 20°C wurde ein künstlicher 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus erzeugt. Die Tierversuchsgenehmigung MR20/13, Nr.54/2007 lag vor.

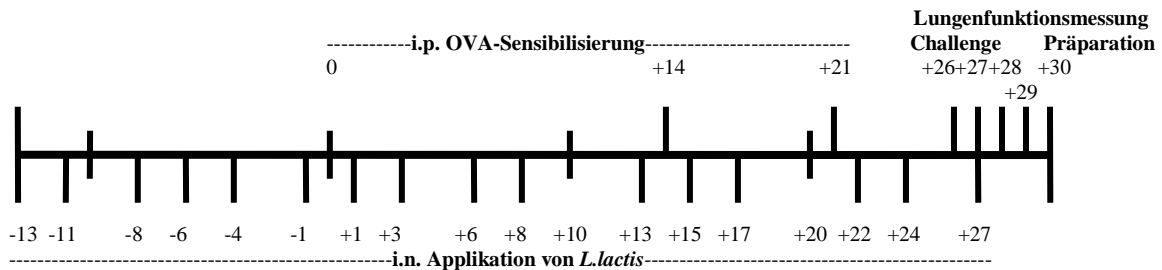
#### 2.1.2 Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll

Zur Untersuchung des Effekts des Gram-positiven Bakteriums *L. lactis* auf die Entwicklung einer allergischen Reaktion wurden weibliche BALB/c Mäuse zunächst i.n. mit *L. lactis* oder „Phosphat Buffered Saline“ (PBS) (Kontrolle) behandelt, gegen OVA oder PBS (Kontrolle) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge).

Der Versuchsansatz umfasste vier Versuchsgruppen.

- Gruppe 1 (PBS/PBS): Negativkontrollgruppe. Die Tiere wurden i.n. mit PBS behandelt und nicht sensibilisiert (PBS Injektion i.p.). Die Gruppe umfasste sieben Tiere.
- Gruppe 2 (PBS/OVA): Positivkontrollgruppe. Die Tiere wurden i.n. mit PBS behandelt und gegen OVA-sensibilisiert (i.p. Injektion). Die Gruppe umfasste sieben Tiere.
- Gruppe 3 (*L. lactis*/PBS): Die Tiere wurden i.n. mit *L. lactis* behandelt, aber nicht sensibilisiert (PBS Injektion i.p.). Die Gruppe umfasste acht Tiere.

Gruppe 4 (*L. lactis*/OVA): Die Tiere wurden i.n. mit *L. lactis* behandelt und gegen OVA-sensibilisiert (i.p. Injektion). Die Gruppe umfasste acht Tiere.



**Abbildung 7:** Schema des Versuchsaufbaus zur Induktion und Analyse einer akuten allergischen Atemwegsentzündung und intranasaler *L. lactis*-Applikation

### 2.1.3 Exposition mit *L. lactis*

13 Tage vor Beginn der Sensibilisierung begann die Behandlung mit *L. lactis* an den Tagen -13, -11, -8, -6, -4 und -1. Nach Beginn der Sensibilisierung wurde weiterbehandelt an den Tagen 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24 und 27. Versuchstieren der Gruppen 3 und 4 wurden 50 µl einer Bakteriensuspension der Konzentration  $c=2 \times 10^6$  cfu/µl i.n appliziert (entspricht  $1 \times 10^8$  cfu/Behandlung). Den Kontrollgruppen wurde 50µl steriles PBS verabreicht. Die Bakterienapplikation erfolgte nach Narkotisierung mittels i.p. Injektion von ca. 200 µl einer mit PBS verdünnten Ketanest/Rompun-Lösung (Ketamin 76 mg/kg, Rompun 9,6 µg/kg). Der betäubten, aufrecht gehaltenen Maus wurde die *L. lactis* Suspension mittels einer Eppendorfpipette auf die Nase aufgetropft. Wegen der durch die Narkose ausgesetzten Schutzreflexe inhalierte die Maus die Bakteriensuspension.

#### Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ketanest/Rompun-Narkose	
-Ketamin 50 mg/ml	Pfizer, Berlin, Freiburg, D
-Rompun 2% (Xylazin 20 mg/ml)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D

#### Material:

1 ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (Microlance§ 24G 0355x25)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D

## 2.1.4 Systemische Sensibilisierung gegen Ovalbumin und Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion in den Atemwegen

Die systemische Sensibilisierung erfolgte nach dem Standard-Sensibilisierungsprotokoll an den Tagen 0, 14 und 21 durch i.p. Injektionen von je 10 µg OVA Grade VI emulgiert in 1,5 mg Aluminiumhydroxid (Al(OH)<sub>3</sub>) in einem Gesamtvolumen von 200 µl (aufgefüllt mit PBS). Kontrollgruppen erhielten PBS mit Al(OH)<sub>3</sub>.

Zur Induktion einer lokalen Atemwegsentzündung wurden die Mäuse an den Tagen 26, 27 und 28 in einer Acrylkammer für 20 Minuten einem OVA-Aerosol [10 mg/ml OVA Grade V in PBS] ausgesetzt. Dieses wurde über einen PARI®-Vernebler (Pari) erzeugt und in die Kammer geleitet.

### Chemikalien:

OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
OVA Grade V	Sigma, Taufkirchen, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Inject® Alum Al(OH) <sub>3</sub>	Pierce, Rockford, USA

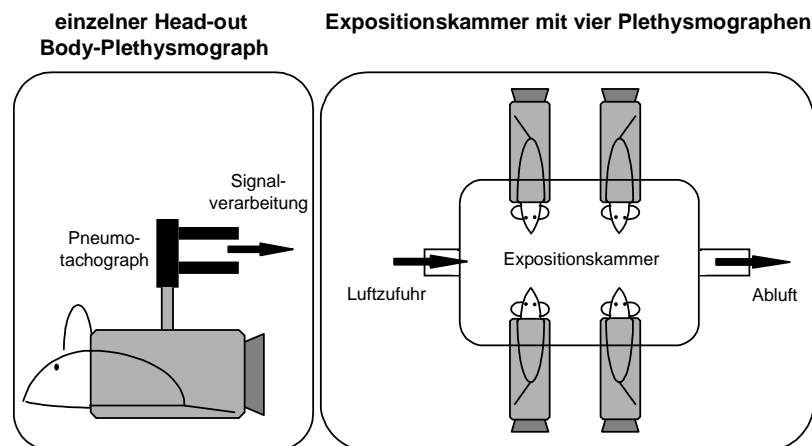
### Material:

1 ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (Microlance§ 24G 0355x25)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Acrylkammer (20 x 20 x 15 cm)	KH Zehlendorf, Berlin, D
Pari® Master	Pari, Starnberg, D

## 2.2 Nachweis der bronchoalveolären Hyperreagibilität durch Head-out Body-Plethysmographie

Die Head-out Body-Plethysmographie bietet die Möglichkeit einer nicht-invasiven Lungenfunktionsmessung mit dem Vorteil, dass die Maus nicht narkotisiert werden muss und somit eine spontane Atmung aufweist. Die Mäuse werden während des Versuchs Methacholin (MCh)-Aerosolen steigender Konzentration ausgesetzt. MCh wirkt als unspezifischer Bronchokonstriktor. Dadurch kommt es zu einer Verminderung des Atemflusses der Maus. Bei vorhandener bronchoalveolärer Hyperreagibilität erfolgt dies bereits bei Aerosolen geringerer MCh-Konzentration. Zum Vergleich der Gruppen wird die MCh-Konzentration bestimmt, bei der der mittlere expiratorische Atemfluss noch 50 % des Ausgangswertes beträgt (MCh50).

Die Apparatur besteht aus einer 2,5 l großen Expositions-kammer, an die vorne ein Vernebler angeschlossen ist, über den das MCh-Aerosol eingeleitet werden kann. Auf der Rückseite befindet sich ein Abzug für die Abluft. Dies ermöglicht die Erzeugung eines kontinuierlichen Luftstroms der gewünschten Aerosolkonzentration. In die Hauptkammer ragen vier Plethysmographen, in welche die Mäuse gesetzt werden. Den Mäusen wird eine Halsmanschette aus Kofferdam individuell angepasst. So wird der Plethysmograph luftdicht gegenüber der Expositions-kammer verschlossen, gleichzeitig aber die Atmung der Mäuse nicht behindert. Die bei der Atmung der Mäuse vorhandenen Thoraxbewegungen führen zu einer Druckveränderung im Plethysmographen. Diese wird über ein Ableitungsrohr von einem Pneumotachographen gemessen. Die Signale werden anschließend durch ein Potentiometer verstärkt und zur Speicherung und Auswertung an einen PC weitergeleitet. Dort erfolgt die Auswertung mit der Software Notocord hem 3.5 sowie Microsoft Excel.



**Abbildung 8: Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen**

(modifiziert nach Glabb T et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: 565-573)

Am Versuchstag 29 wurden pro Messdurchgang vier Mäuse in den Plethysmographen platziert. Jede Vierergruppe enthielt jeweils eine Maus der vier Versuchsgruppen. Es erfolgte eine 15-minütige Messung des mittleren expiratorischen Atemflusses. Der Mittelwert dieser Daten wurde gebildet und als Ausgangswert für die folgenden Messungen gleich 100% gesetzt. Dann folgte ein 70-sekündiger Einstrom eines PBS-Aerosols als Negativkontrolle. Im weiteren Verlauf wurde jeweils 70 Sekunden ein MCh-Aerosol in die Hauptkammer geleitet. Anschließend folgte eine 3,5-minütige Pause bevor die Tiere der nächsthöheren MCh-Konzentration ausgesetzt wurden. Es

wurde fortlaufend der mittlere expiratorische Fluss gemessen. Erreichte ein Tier mehrmals hintereinander Atemflusswerte <50% des anfangs definierten Ausgangswertes wurde es aus dem Plethysmographen entnommen, um sein Überleben zu sichern. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über den zeitlichen Ablauf der Messung und die Höhe der MCh-Konzentration.

**Tabelle 1: MCh-Exposition**

Beginn der jeweils 70-sekündigen Exposition gegenüber PBS oder Methacholin (MCh) ausgehend vom Startzeitpunkt des Experiments und Höhe der MCh-Konzentration im verwendeten Aerosol

Beginn der 70-sekündigen Exposition	Aerosol
15'10''	PBS
19'50''	3 mg/ml MCh
24'30''	6 mg/ml MCh
29'10''	12,5 mg/ml MCh
33'50''	25 mg/ml MCh
38'20''	50 mg/ml MCh
43'10''	75 mg/ml MCh
46'40''	100 mg/ml MCh
51'00''	Ende der Messung

Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
β-Methyl-Acetylcholin (Methacholin, MCh)	Sigma, Taufkirchen, D

Material:

Glasexpositions-kammer	Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D
Pneumotachograph PTM 378/1.2	Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, D
Potentiometer CFBA	Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, D
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord, Paris, F
Latex-Kofferdarm	Roeko, Langenau, D
Pari® Master	Pari, Starnberg, D

## 2.3 Präparation und Probengewinnung

Am Versuchstag 30 wurden die Mäuse präpariert. Da aufgrund der umfangreichen Analysen und Zellisolationen eine Präparation von 30 Tieren nicht möglich war, wurde

jede Versuchsgruppe in jeweils zwei Untergruppen unterteilt. Diese wurden identisch behandelt, allerdings um eine Woche zeitversetzt, so dass in zwei aufeinander folgenden Wochen analysiert wurde.

Am Präparationstag erhielten die Mäuse eine i.p. Heparininjektion von 200 µl (Heparin 1:5 verdünnt mit PBS, Endkonzentration Heparin: 5000 I.E./ml). 20 Minuten nach der Heparininjektion wurden die Mäuse mit 200 µl einer 5x-Ketanest/Rompun-Narkoselösung (Endkonzentrationen nach Lösung in PBS: Ketamin 42,8 mg/ml und Rompun 2,8 mg/ml) getötet und über die Axillarvene Blut entnommen.

Chemikalien:

Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ketanest/Rompun-Narkose	
-Ketamin 50 mg/ml	Pfizer, Berlin, D
-Rompun 2% (Xylazin 20 mg/ml)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
70%iges Ethanol	Merck, Darmstadt, D

Material:

Skalpell	A.Dumont+Fils, CH
1 ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (Microlance§ 24G 0355x25)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.3.1 Gewinnung von Serumproben

Aus der Axillarvene wurde Blut in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 2800 x g zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen gelagert.

Material:

2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, D
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D

### 2.3.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die BAL ermöglicht die Probengewinnung aus den proximalen und distalen Atemwegen. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert. Der Thorax wurde mit einer Schere eröffnet und fixiert. Nach Freipräparation der Trachea wurde diese eröffnet, um einen 18G Venenverweilkatheter einzuführen. Darüber wurde die Lunge mit 1 ml

eiskaltem PBS (mit 1% „Bovines Serum Albumin“ (BSA) und einem Proteaseinhibitor) einmal gespült. Nach Aspiration der Flüssigkeit wurde diese in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 300 x g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 1 ml PBS/1% BSA resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt (→ 2.4.3), bevor die weitere Aufbereitung mittels Zytozentrifugation erfolgte (→ 2.6).

Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
BSA (=Bovines Serum Albumin)	
Albumin Bovine Fraktion V	SERVA, Heidelberg, D

Material:

Präparierbesteck	
-Scheren	Hamacher, Solingen, D
-Skalpell	A.Dumont+Fils, Montignez, CH
-Pinzetten	A.Dumont+Fils, Montignez, CH
-Klemmen	Martin, Tuttlingen, D
18G Venenverweilkatheter	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, D
1 ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.3.3 Präparation der Lunge

Nach der Gewinnung der BAL wurde der rechte Lungenflügel abpräpariert, in ein Cryo-Reaktionsgefäß überführt und zur späteren Untersuchung der mRNA-Expression in -196°C kaltem Flüssigstickstoff schockgefroren. Der verbleibende linke Lungenflügel wurde an der Schnittstelle durch eine Ligatur abgedichtet und über den 18G Verweilkatheter mit 1 ml 4%iger Formaldehydelösung perfundiert. Eine weitere Ligatur in Höhe der Trachea sorgte für ein Verbleiben der Formaldehydelösung in dem Lungenflügel. Zur Zwischenlagerung wurde dieser Lungenflügel in ein 20 ml Gefäß mit 4%iger Formaldehydelösung überführt.

Chemikalien:

Formaldehydelösung (4%)	Merck, Darmstadt, D
-------------------------	---------------------

Material:

18G Venenverweilkatheter	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
(Accu-Cut® SRM™200 Rotary Microtom)	Sakura, Zoeterwoude, NL

Objektträger 76 x 26 mm  
1 ml-Spritzen (BD Plastipak)

Menzel-Gläser®, Braunschweig, D  
Beckton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.3.4 Präparation der Milz und der bronchialen Lymphknoten

Die Milz wurde freipräpariert und in „Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI)-Kulturmedium (Zusätze: 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptavidin, 1% L-Glutamin) auf Eis gelagert. Zur Auftrennung des Gewebeverbandes wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb der Porengröße 100 µm gedrückt und in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Die bronchialen Lymphknoten wurden nach ihrer Freipräparation analog des Protokolls zur Milzverarbeitung aufgearbeitet.

#### Chemikalien:

RPMI 1640 [1x] ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Glutamin [2 mM]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Streptomycin [100 mg/ml]	Seromed, Berlin, D
Penicillin [100 U/ml]	Seromed, Berlin, D
Fetales Kälberserum [10%]	Seromed, Berlin, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Pancoll mouse	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, D

#### Material:

Falcon Zellsieb 100µm	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

## 2.4 Aufreinigung von Zellpopulationen

### 2.4.1 Isolation mononukleärer Zellen

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden aus den Milzproben die mononukleären Zellen (MNC) isoliert. Dazu wurde ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml auf Raumtemperatur befindlichem Pancoll (Pan-Biotech) befüllt und vorsichtig mit der gleichen Menge an Zellsuspension überschichtet. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation mit 1200 x g bei Raumtemperatur ohne Bremse.

Wegen der unterschiedlichen Zelldichte befanden sich nach der Zentrifugation die Zellen größerer Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) pelletiert am Boden des Reaktionsgefäßes, während die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Makrophagen,

Monozyten) in der Interphase zwischen Trennmedium und Kulturmedium zu finden waren.

Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 10 ml RPMI-Medium gewaschen (Zentrifugation mit 350 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml RPMI resuspendiert.

Die Lymphknotenproben wurden analog zu den isolierten mononukleären Zellen der Milz zweimal gewaschen und in RPMI resuspendiert.

Nach Isolation der mononukleären Zellen wurde die Zellzahl bestimmt (→2.4.3) und es wurden Zellen für die *in vitro* OVA-Restimulation (→ 2.8) abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden mittels „Magnetic Bead Assisted Cell Sorting“ (MACS) (Miltenyi Biotech) aufgearbeitet (→ 2.4.2).

Chemikalien:

RPMI 1640 [1x] ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Glutamin [2 mM]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Streptomycin [100 mg/ml]	Seromed, Berlin, D
Penicillin [100 U/ml]	Seromed, Berlin, D
Fetales Kälberserum [10 %]	Seromed, Berlin, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Pancoll mouse	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, D

Material:

Falcon Zellsieb 100 µm	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

**2.4.2 Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz und bronchialen Lymphknoten**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen wurden mittels MACS aus Milz und den bronchialen Lymphknoten isoliert. Das Prinzip der Methode beruht auf der Markierung der entsprechenden Oberflächenmoleküle mit Antikörpern und anschließender Kopplung an Eisenkugeln (Beads). Markierte Zellen können daraufhin mit einem Magneten in einer Säule gehalten werden, wohingegen unmarkierte Zellen ausgewaschen werden.

Das Protokoll beinhaltet zwei Stufen. Im ersten Separationsschritt erfolgt eine Negativ-Selektion. Durch Zugabe eines Cocktails Biotin-markierter AKs (anti-Maus AK: CD8a,

CD11b, CD45R, CD49b, Ter-119) und anschließender Zugabe von anti-Biotin Beads werden alle Nicht-CD4<sup>+</sup> Zellen in der Säule gehalten. Das Eluat enthält die CD4<sup>+</sup>-Zellen. Im ersten Separationsschritt werden außerdem bereits CD25<sup>+</sup>-Zellen mit anti-CD25-PE (Phycoerythrin) AK markiert.

In zweiten Separationsschritt erfolgt eine Positiv-Selektion. Zum Eluat aus CD4<sup>+</sup>-Zellen werden anti-PE Beads hinzugegeben, welche die CD25<sup>+</sup>-Zellen in einer weiteren Säule halten. Das Eluat enthält CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen.

Zentrifugationsschritte dieses Protokolls erfolgten immer für 10 Minuten bei 4°C und 300 x g. Sämtliche Volumenangaben beziehen sich auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen.

Die Zellsuspension aus MNCs (→ 2.4.1) wurde zentrifugiert, in 40 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 10 µl Biotin-Antibody-Cocktail versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer, 20µl Anti-Biotin Microbeads und 10µl CD25-PE AK hinzupipettiert. Gründlichem Mischen folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Nach einem Waschschrift (1 ml MACS-Puffer, Zentrifugation) wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Vorbereitend für die Zellisolation wurden die LD-Säulen in die entsprechenden Haltevorrichtungen eingebracht und mit jeweils 2 ml MACS-Puffer äquilibriert. Je 500 µl der Zellsuspension wurden auf die Säulen gegeben. War die Probe vollständig in der Säule versickert, wurde diese zweimal mit jeweils 1 ml MACS-Puffer gespült. Der Durchlauf (2,5 ml) enthielt nun die CD4<sup>+</sup> Zellen. Zudem waren die im Durchlauf vorhandenen Zellen, die den CD25-Rezeptor trugen bereits durch die Inkubation mit CD25-PE AK markiert. Das Eluat wurde zentrifugiert und in 90µl MACS-Puffer resuspendiert. 10 µl Anti-PE Microbeads wurden hinzugegeben. Es folgte nach gründlichem Mischen eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Nach einem Waschschrift (1 ml MACS-Puffer, Zentrifugation) wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die MS-Säulen wurden in den entsprechenden Haltevorrichtungen befestigt und vorbereitend mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert. Je 500 µl Zellsuspension wurden pro Säule aufgetragen. Waren diese vollständig in der Säule versickert, wurde die Säule dreimal mit jeweils 500 µl MACS-Puffer gespült und der Durchlauf aufgefangen. Da hier eine positive Selektion durchgeführt wurde, enthielt das Eluat (2 ml) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen dagegen befanden sich noch auf der Säule. Um diese auszuwaschen wurde die Säule aus dem Magnetseparator genommen, auf ein neues 15 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 1 ml MACS-Puffer befüllt. Sofort wurde dieser mit einem Spritzenstempel zügig durchgedrückt. Der

Durchlauf enthielt die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen. Abschließend folgte eine Zellzählung beider isolierter Zellpopulationen am Zellzählgerät (→ 2.4.3). Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen ATL-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

MACS-Puffer

-2 ml 0,5M EDTA	Roth, Karlsruhe, D
-500 ml PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
-2 ml Fetales Kälberserum [10 %]	Seromed, Berlin, D
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
ATL Puffer	

Material:

MS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
15 ml Falcon	Sarstedt, Nümbrecht, D

### 2.4.3 Analyse der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Cell-Counter (CASY®). Dieses Gerät saugt über eine Kapillare die in einem speziellen Elektrolytpuffer gelösten Zellen auf. Über der Kapillare wird eine Spannung aufgebaut und der Widerstand über dem Elektrolytpuffer wird erfasst. Jede in dem Elektrolytpuffer gelöste Zelle verdrängt eine bestimmte Menge des Puffers und verändert so den Widerstand. Da der Widerstand im Grundzustand (nur Puffer, keine Zellen) bekannt ist und sich der Widerstand proportional zum Zellvolumen verändert, kann bei Wahl geeigneter Messparameter auf die Zellzahl geschlossen werden.

Es wurden 5 µl der zu messenden Probe in 10 ml des Elektrolytpuffers (CASY®Ton) gegeben und gut gemischt. Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Zelleigenschaften wurde das der Probe entsprechende Messprogramm (BAL, Primärzellen Milz, Primärzellen Lymphknoten) aufgerufen und die Zellzählung begonnen.

Chemikalien:

CASY®Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D
----------	--------------------------------

Material:

CASY®Model TT

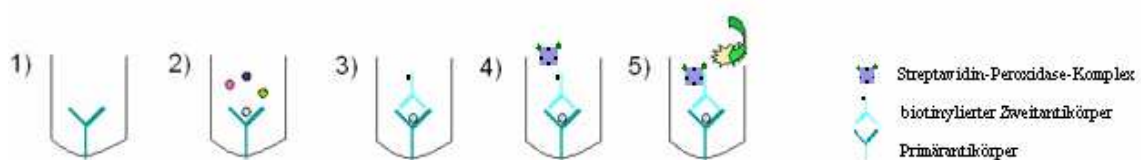
(Cell-Counter, Analyser System)

Schärfe Systems, Reutlingen, D

## 2.5 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen im Serum mittels ELISA

Der „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches über spezifische Antigen-Antikörperbindungen und einer nachfolgenden enzymatischen Farbreaktion der Quantifizierung eines gesuchten Antigens dient.

Beim hier angewandten Sandwich-ELISA wird zunächst ein Primärantikörper an eine feste Phase gebunden (Coating). Eine Blocklösung besetzt freie Proteinbindungsstellen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Es werden Standard und Proben aufgetragen und mit dem gebundenen Primärantikörper inkubiert. Anschließend findet eine Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Detektionsantikörper) statt, welcher an noch freie Epitope des Antigens bindet. Das nachzuweisende Antigen befindet sich nun zwischen den beiden Antikörpern (Sandwich-ELISA). Essentiell ist, dass Erst- und Zweitantikörper unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Es wird ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Peroxidase kovalent gebunden an Streptavidin) hinzugegeben. Streptavidin besitzt vier freie Bindungsstellen für Biotin und kann so an den Detektionsantikörper binden. Das dann hinzugefügte Peroxidase-Substrat (BM blue POD Substrate) wird von der Peroxidase umgesetzt und es erfolgt eine Farbreaktion die photometrisch erfasst wird. Da sich Farbreaktion, Enzymaktivität und Antigenkonzentration proportional zueinander verhalten, kann mit dem ELISA-Reader die Antigenkonzentration berechnet werden.



**Abbildung 9: Prinzip des ELISA**

Nach dem Coaten mit dem Primärantikörper (1) wird die Probe hinzugegeben und das entsprechende Antigen kann binden (2). Nach Beimengen des biotinylierten Detektionsantikörpers (3) wird der Streptavidin-Peroxidase-Komplex hinzugefügt, der an Biotin bindet (4) und nach Substratzugabe für die Substratumsetzung sorgt (5), die photometrisch quantifiziert werden kann (modifiziert nach [www.elisaassay.com](http://www.elisaassay.com)).

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA für OVA-spezifisches IgE, IgG1 und IgG2a durchgeführt. Zum Coaten der 48-Well-Platten wurden pro Well 50 µl einer OVA-Lösung (OVA Grade VI in PBS, 20 mg/ml) in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH=8,3) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte viermal mit Waschpuffer (PBS mit 0,1 % Tween®20) gewaschen. Das Abblocken erfolgte durch Zugabe von 100 µl/Well Blocklösung (PBS mit 1 % BSA) und einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen (Waschpuffer) wurden jeweils 50 µl Proben oder Standard pro Well aufgetragen. Für jeden Standard war, ausgehend von den angegebenen Höchstkonzentrationen (IgE: 200 ng/ml, IgG1: 50 ng/ml, IgG2a: 10 ng/ml) eine 10-stufige 1:2-Verdünnungsreihe in Waschpuffer angelegt worden. Die Serumproben wurden je nach zu messendem Immunglobulin mit Waschpuffer verdünnt (IgE: 1:10 und 1:100, IgG1: 1:10000 und 1:100000, IgG2a: 1:100 und 1:1000). Als Negativkontrolle (Blanks) wurden vier Wells jeweils mit 50 µl Waschpuffer befüllt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C an. Am Folgetag wurde nach viermaligem Waschen (Waschpuffer) mit einem biotinylierten Detektionsantikörper (1:200 verdünnt in Waschpuffer, 50 µl/Well) für 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach vier Waschschritten wurde Streptavidinperoxidase (1:1000 in Waschpuffer verdünnt) aufgetragen (50 µl/Well) und es wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Acht Waschschritten folgte das Auftragen von 100 µl/Well Peroxidase-Substratlösung (BM blue POD substrate). Bei Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die eintretende Farbreaktion abgewartet (Blaufärbung) und dann mit 50 µl/Well 2 M Schwefelsäure abgestoppt (Farbumschlag nach Gelb). Unmittelbar danach erfolgte die Auswertung am Photometer bei 450 nm mit Hilfe der Software Magellan 3.

Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
BSA (=Bovines Serum Albumin)	
Albumin Bovine Fraktion V	SERVA, Heidelberg, D
Tween®20	Roth, Karlsruhe, D
Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
BM blue, POD Substrat	Roche, Mannheim, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure 97%ig (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Coating-Antikörper:	
OVA VI	Sigma, Taufkirchen, D

Detektionsantikörper:

Anti-Maus IgE, biotinyliert	Pharmingen, Hamburg, D
Anti-Maus IgG1, biotinyliert	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Anti-Maus IgG2a, biotinyliert	Beckton Dickinson, Heidelberg, D

Material:

48-Well Mikrotiterplatte Maxisorp Flachboden	Nunc, Wiesbaden, D
Nunc-Immuno Wash 12	Nunc, Wiesbaden, D
Auswertungssoftware Magellan 3	Tecan, Crailsheim, D

## 2.6 Quantitative und Qualitative Analyse der Zellpopulationen in der BAL

### 2.6.1 Zytozentrifugation (Cytospins)

Mittels der Zytozentrifugation werden Zellen aus einer Zellsuspension isoliert und auf einem Objektträger fixiert, so dass nach Anfärbung mittels Mikroskopie sowohl eine morphologische als auch eine quantitative Bestimmung der Zellpopulationen erfolgen kann.

Es wurden 50 µl der BAL mit 150 µl PBS verdünnt und in eine Probenkammer gegeben. Diese bestand aus einem Cytoclip-Zentrifugeneinsatz (Thermo Fisher Scientific), in dem ein Objektträger eingeklemmt war. Auf diesem war ein Filterpapier mit kreisrundem Loch befestigt, in dem die Zellsuspension aufgebracht wurde. Durch Zentrifugation verblieben die Zellen an dieser Stelle, während das Filterpapier überschüssige Flüssigkeit aufnahm. Die Zentrifugation erfolgte 5 Minuten bei 320 x g. Das Präparat wurde 30 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden die Zellen mittels Diff-Quick (Medion Diagnostics) angefärbt.

Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
--	---------------------------------

Material:

Shandon Cytofunnel®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Filter Card	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Cytoclip®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser®, Braunschweig, D
Shandon Cytospin ®3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.6.2 Färbung der Cytospins mit Diff-Quick®

Die luftgetrockneten Cytospin-Präparate wurden zur besseren Differenzierung der Zellpopulationen angefärbt. Begonnen wurde mit einer einminütigen Inkubation in Diff-Quick®-Fix, gefolgt von einer einminütigen Inkubation in Diff-Quick®-Lösung I, die Xanthen-Farbstoff enthält und azidophile Strukturen rot anfärbt. Abschließend wurde 30 Sekunden in Diff-Quick®-Lösung II inkubiert, die Thiazin-Farbstoff enthält und basophile Strukturen blau färbt.

### Chemikalien:

Diff-Quick® I	Medion Diagnostics, Düdingen, CH
Diff-Quick® II	Medion Diagnostics, Düdingen, CH
Diff-Quick® Fix	Medion Diagnostics, Düdingen, CH

## 2.6.3 Mikroskopische Analyse der gefärbten Cytospins

Bei 400facher Vergrößerung wurden pro Cytospin 100 Zellen ausgezählt. Dabei wurden nach allgemeinen morphologischen Kriterien Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und eosinophile Granulozyten unterschieden.

### Material:

Mikroskop BH-2	Olympus, Hamburg, D
----------------	---------------------

## 2.7 Lungenhistologie

### 2.7.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Die in 4%iger Formaldehydelösung zwischengelagerten Lungen wurden nach vollständiger Fixierung im Pathologischen Institut der Philipps-Universität Marburg entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei -20°C gelagert, bevor mit einem Mikrotom 3 µm dünne Schnitte erstellt wurden. Diese wurden mittels eines 45°C warmen Wasserbades geglättet und auf einen Objektträger überführt.

### Material:

Mikrotom	
(Accu-Cut® SRM™200 Rotary Microtom)	Sakura, Zoeterwoude, NL
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser®, Braunschweig, D

### 2.7.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin- und Eosin- (H&E) Färbung werden durch das blaue Hämatoxylin basophile Strukturen wie nukleäre DNA angefärbt. Das rote Eosin färbt azidophile Strukturen wie z.B. Proteine im Zytoplasma. Dies ermöglicht eine Differenzierung der Zellpopulation und somit die Identifizierung entzündlicher Infiltrate im Lungengewebe. Nach Fixierung des Präparates (siehe 2.7.1) bei 60 °C im Wärmeschrank wurden die Schnitte durch 20-minütige Lagerung in einem Xylolersatz (Roticlear®) entparaffiniert. Anschließend folgte eine Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % Ethanol – 10 Minuten, 96 % Ethanol - 5 Minuten, 70 % Ethanol - 5 Minuten). Nach Spülung in VE-Wasser wurden die Präparate 3 Minuten in Hämatoxylin II Lösung nach Gill inkubiert und daraufhin fünf Minuten in Leitungswasser gespült. Dessen höherer pH führte zu einer blau-violetten Färbung. Die Präparate wurden dann für eine Minute in Eosin getaucht, dessen pH kurz zuvor durch Zugabe von drei Tropfen Eisessig gesenkt wurde. Nach Spülung mit vollentsalztem (VE)- Wasser durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe (96 % Ethanol – 1 Minute, 100 % Ethanol - 6 Minuten). Es folgte eine Inkubation in Xylolersatz für 20 Minuten. Die Präparate wurden mit Histomount (National Diagnostics) und Deckgläschen eingedeckt.

#### Chemikalien:

Roticlear®	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin nach Gill II	Merck, Darmstadt, D
Eosin 1%	Merck, Darmstadt, D
Histomount	National Diagnostics, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, D

### 2.7.3 Perjodsäure-Schiff-Färbung

Bei der Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung überführt die Perjodsäure 1,2-Glykole in unsubstituierte Polysaccharide sowie Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine zu Aldehydgruppen, die das Schiffsreagenz leuchtend rot anfärbt. Dies ermöglicht den späteren mikroskopischen Nachweis erhöhter Mukusproduktion in den Atemwegen.

Nach Fixierung des Präparates bei 60°C im Wärmeschrank wurden die Schnitte durch 20-minütige Lagerung in Xylolersatz (Roticlear®) entparaffiniert. Es folgte eine Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol - 2 Minuten, 96% Ethanol - 1 Minute, 70% Ethanol - 1 Minute). Die Präparate wurden mit VE-Wasser

gespült und 10 Minuten in Perjodsäure inkubiert. Nach 3-minütigem Waschen in Leitungswasser folgte eine 15-minütige Inkubation im Schiffs-Reagenz. Anschließend wurden die Schnitte 15 Minuten mit Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin II Lösung nach Gill für 1 Minute. Daraufhin wurden die Präparate kurz mit VE-Wasser gespült und durchliefen eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol - 1 Minute, 96% Ethanol – 1 Minute, 100% Ethanol - 1 Minute). Nach 15-minütiger Inkubation im Xylolersatz wurden die Schnitte mit Histomount und Deckgläschen eingedeckt.

Chemikalien:

Roticlear®	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin nach Gill II	Merck, Darmstadt, D
Schiffsreagenz	Merck, Darmstadt, D
Perjodsäure	Roth, Karlsruhe, D
Histomount	National Diagnostics, USA

**2.7.4 Mikroskopische Analyse der Lungenpräparate**

Die Beurteilung der gefärbten Lungenpräparate erfolgte am Mikroskop mit 100facher sowie 200facher Vergrößerung nach allgemeinen morphologischen Kriterien. Beurteilt wurden das Ausmaß zellulärer Infiltration sowie der Anteil an Becherzellen im Lungenepithel.

Material:

Olympus BX51	Olympus, Hamburg, D
Kamera Color-view	Olympus, Hamburg, D
Software Cell-F	Olympus, Hamburg, D

**2.8 *In vitro* Stimulation mononukleärer Zellen der Milz und der Lymphknoten und Messung von Zytokinkonzentrationen**

**2.8.1 *In vitro* Stimulation mononukleärer Zellen**

Die mit Pancoll isolierten mononukleären Zellen (→2.4.1) wurden gezählt und durch Zugabe von RPMI-Medium wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Auf eine 48-Well-Platte wurden 200 µl dieser Zellsuspension pro Well pipettiert. Es wurden 20

µl/Well einer 1:100 Verdünnung von OVA Grade VI (c = 50 mg/ml) in RPMI hinzugegeben. Für eine rein mediumstimulierte Negativkontrolle wurde obiges Vorgehen wiederholt, doch statt OVA wurde 20 µl RPMI zu jeder Probe gegeben. Es folgte eine 72-stündige Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Platten abzentrifugiert und die Überstände auf eine Mikrotiterplatte überführt. Diese wurden bis zur Zytokinmessung bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Puffer (Quiagen) mit 0,01% Mercaptoethanol resuspendiert und zur späteren Bestimmung von mRNA-Konzentrationen bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

CASY®Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D
OVA Grade VI	Sigma, Steinheim, D
RPMI 1640 [1x] ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Glutamin [2mM]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Streptomycin [100 mg/ml]	Seromed, Berlin, D
Penicillin [100U/ml]	Seromed, Berlin, D
Fetales Kälberserum [10%]	Seromed, Berlin, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, D
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D

Material:

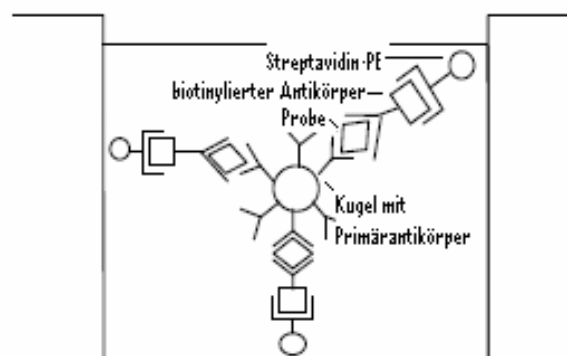
48 Well Platte	BD, Heidelberg, D
CASY®Model TT (Cell-Counter, Analyser System)	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Brutschrank	Heraeus, Berlin, D
Mikrotiterplatte	Thermo Scientific, UK

### **2.8.2 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Überständen OVA-stimulierter mononukleärer Zellen**

Die Zytokinkonzentrationen in den gewonnenen Überständen aus der OVA-Restimulation wurden mit Hilfe des Flowcytomix-Kits (Bender MedSystems) gemessen. Zytokinkonzentrationen von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  wurden in allen Mäusen einer Versuchsgruppe bestimmt, Zytokinkonzentrationen von IL-4, IL-13 und IL-6 in 4 Tieren pro Versuchsgruppe.

Das Flowcytomix-Kit bedient sich, ähnlich wie der ELISA, spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen. Doch ist es möglich aus geringen Probenmengen gleichzeitig die Konzentration von bis zu 20 Zytokinen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu bestimmen.

Das Flowcytomix-Kit enthält zwei Populationen unterschiedlich großer Polystyrol-Beads (4,4  $\mu\text{m}$  und 5,5  $\mu\text{m}$ ), die vom „Flourescence-Activated-Cell-Sorter“ (FACS) unterschieden werden können. Das FACS saugt die Beads einzeln durch eine Kapillare an und erfasst sie mit einem Laserstrahl. Das von den Beads abgelenkte Streulicht wird durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern geleitet und anschließend ausgewertet. Dabei dienen die nach vorne abgelenkten Strahlen (FSC = Forwardscatter), die durch die Beugung des Lichts hervorgerufen werden, zur Bestimmung der Bead-Größe. In den zwei Beadpopulationen, die anhand des Beaddurchmessers differenziert werden, können zusätzlich 9 bzw. 11 Bead-Subgruppen unterschieden werden, weil jedes Bead eine unterschiedliche Menge eines internen Fluoreszenzfarbstoffs enthält. Dieser wird von einem Laser des FACS zur Emission von Licht ( $\lambda=690\text{ nm}$ ) angeregt, Da innerhalb einer Beadpopulation jedes Bead eine unterschiedliche Menge des Farbstoffs enthält, können die Beads anhand der Intensität des emittierten Lichts unterschieden werden. Die Kombination aus Bead-Größe und Lichtemission ermöglicht die genaue Zuordnung der Beads.



**Abbildung 10: Prinzip des Flowcytomix-Kits**

(modifiziert nach Product Manual Flowcytomix Basic Kit BenderMed)

An jedes der 20 Beads sind unterschiedliche Zytokin-Antikörper gekoppelt. Nach Inkubation der Antikörper-markierten Beads mit den Proben kommt es zur Bildung spezifischer Zytokin-Antikörper-Bead-Komplexe. Ein hinzugegebener Biotin-gekoppelter Zweitantikörper bindet an die Komplexe. Hinzugefügtes Streptavidin-PE bindet an Biotin und erzeugt ein Fluoreszenzsignal, welches der Quantifizierung der

Zytokine dient. Die gebundenen Zytokine lassen sich folglich durch die Größe der Beads und der Intensität des internen Bead-Farbstoffes identifizieren, während die Intensität des Streptavidin-PE-Fluoreszenzsignals der Quantifizierung dient.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Vorbereitend wurden eine Standard-Verdünnungsreihe, die Bead-Mischung (Mischung aus den großen und kleinen Polystyrol-Beads), eine Biotin-Konjugat-Mischung und eine Streptavidin/PE-Mischung hergestellt.

Aus den Standards wurde eine 8-stufige Verdünnungsreihe hergestellt, wobei jeweils 1:3 verdünnt wurde. Zur Herstellung der Bead-Mischung wurde 1/20 des berechneten Gesamtvolumens (Anzahl der Tests x 25 µl) von jedem Bead in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurde mit 1x-Assay-Buffer auf das berechnete Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einem Waschschrift (Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 x g) erfolgte eine Resuspension mit 1x-Assay-Buffer in dem zuvor berechneten Gesamtvolumen. Zur Herstellung der Biotin-Konjugat-Mischung wurde 1/20 des berechneten Gesamtvolumens (Anzahl der Tests x 50 µl) eines jeden Biotin-Konjugates in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 1x-Assay-Buffer auf das berechnete Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Herstellung der Streptavidin-PE-Mischung wurden pro Probe 1,83 µl Streptavidin/PE mit 55,46 µl 1x-Assay-Buffer vermischt.

Nach den beschriebenen Vorbereitungen wurde 25 µl Standard jeder Verdünnungsstufe in jeweils ein FACS-Röhrchen gefüllt. In alle weiteren FACS-Röhrchen wurden jeweils 25 µl Probe pipettiert. In alle Reaktionsgefäße wurden 25 µl der hergestellten Bead-Mischung gegeben. Diese war kurz zuvor mittels Vortex-Schüttler gemischt worden, um bereits sedimentierte Beads wieder in Suspension zu bringen. Es wurden 50µl/Reaktionsgefäß der Biotin-Konjugat-Mischung pipettiert, bevor eine 2-stündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte. Es schlossen sich zwei Waschschriffe an (jeweils mit 1 ml 1x-Assay-Buffer, Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 x g). Nach Zugabe von 50µl/Reaktionsgefäß der Streptavidin-PE-Mischung wurde nach gutem Durchmischen für 1 Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe (jeweils mit 1 ml/Reaktionsgefäß 1x-Assay-Buffer, Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 x g). mit anschließender Resuspension in 500 µl/Reaktionsgefäß 1x-Assay-Buffer. Die Proben konnten nun am FACS gemessen werden. Die Daten wurden mit der Software Flowcytomix Pro 2.1 ausgewertet. In der Standardverdünnungsreihe wurde abweichend vom Herstellerprotokoll nach Rücksprache mit dem Hersteller eine zusätzliche Verdünnungsstufe hergestellt, um auch

noch kleinere Zytokinkonzentrationen messen zu können. Die Standardkurve lag daraufhin im Bereich von 9,14 pg/ml bis 6666,67 pg/ml.

Chemikalien:

FlowCytomix Mouse IFN $\gamma$ Simplex Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich
FlowCytomix Mouse IL-5 Simplex Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich
FlowCytomix Mouse IL-5 Simplex Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich
FlowCytomix Mouse/Rat Basic Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich

Material:

FACS-Röhren-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, D
BD FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Cell Quest Software	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Flow Cytomix Pro 2.1 Software	Bender MedSystems, Wien

## 2.9 RNA-Aufreinigung

### 2.9.1 RNA-Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Milz und Lymphknoten

OVA-stimulierte Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in RLT-Puffer mit 0,01% 2-Mercaptoethanol resuspendiert ( $\rightarrow$  2.8.1). Dieser bewirkt eine Lyse der Zellen. Das im Puffer enthaltene stark denaturierende Guanidin-Isothiocyanate inaktiviert zusätzlich RNasen.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mittels RNeasy-Kit (Qiagen). Es wurde jede Probe mit 350  $\mu$ l 70 %igen Ethanol gemischt, auf eine Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchlaufs folgte ein Waschschriff (700  $\mu$ l RW1-Puffer, Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g). Anschließend wurden die Auffanggefäße durch neue ersetzt, um Kontaminationen zu vermeiden, bevor zwei weitere Waschschriffe mit 550  $\mu$ l RPE erfolgten (1. Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g, 2. Zentrifugation für 2 Minuten bei 13000 g). Um Pufferreste vollständig zu entfernen wurden die leeren Säulen nochmals für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser und Zentrifugation von 1 Minute bei 8000 x g aus der Säule eluiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Durchlauf nochmals auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert.

Chemikalien:

RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, D
70%iges Ethanol	Merck, Darmstadt, D
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D

Material:

Collection Tubes (2ml)	Qiagen, Hilden, D
Collection Tubes (1,5ml)	Qiagen, Hilden, D
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D

### 2.9.2 RNA-Aufreinigung aus Lungengewebe

Für Gen-Expressionsanalysen wurde bei der Tierpräparation von jeweils zwei Tieren pro Behandlungsgruppe der rechte Lungenflügel in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt ( $\rightarrow$  2.3.3). Diese Lungenhälften wurden gewogen und dann noch tiefgekühlt in einem Mörser zerkleinert. Mörser und Pistill wurden zuvor in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Pro 40 g Lungengewebe wurden 1000  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (mit 0,01% 2-Mercaptoethanol) hinzugegeben, um daraufhin die Lunge nochmals im Mörser zu zerkleinern. Anschließend wurde zur Unterstützung der Zelllyse die Zellsuspension mit einer Spritze über eine Kanüle fünfmal aufgezogen und dann nach dem Protokoll zur RNA-Aufreinigung ( $\rightarrow$  2.9.3) weiterverarbeitet.

Chemikalien:

RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, D
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D

Material:

1 ml-Spritzen (BD Plastipak)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (Microlance $\S$ 24G 0355x25)	Becton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.9.3 DNase-Verdau

Zur Entfernung von DNA, die eine Kontamination der folgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) dargestellt hätte, wurde ein DNase-Verdau der Proben durchgeführt. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) und 1  $\mu\text{l}$  DNase I zu jeder Probe (25  $\mu\text{l}$ ) folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über 15 Minuten. Die Reaktion wurde mit 2  $\mu\text{l}$  Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gestoppt

und die DNase durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Chemikalien:

DNase I (1U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
10x DNase I Reaction Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA (25mM)	Invitrogen, Karlsruhe, D

Material:

Heizblock (HLC Progr)	HLC BioTech, Bovenden, D
-----------------------	--------------------------

### 2.9.4 Quantifizierung der RNA und Qualitätskontrolle

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte mit einem Photometer. Dazu wurden 2 μl der Probe 1:50 in RNase-freiem Wasser verdünnt und in eine Quarzglas-Mikroküvette gegeben. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte durch Absorptionsmessung einer reinen Wasserprobe. Da bei einer OD<sub>260</sub> von 1 die RNA-Konzentration 40 ng/μl beträgt, konnte durch Multiplikation der gemessenen optischen Dichte mit 40, sowie dem Verdünnungsfaktor 50, die vorliegende RNA-Konzentration bestimmt werden.

Die Qualität der Probe wurde durch Messung der OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge besitzen Proteine ihr Absorptionsmaximum. Bei Bildung des Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Chemikalien:

RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, D
---------------------	-------------------

Material:

Präzisionsküvette	Hellma GmbH, Müllheim, D
Photometer Ultrospec 3100 pro	Biochrom Ltd., UK

### 2.9.5 Reverse Transkription

Für nachfolgende PCR-Experimente musste die aufgereinigte mRNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase. Den Startpunkt für das Enzym bildet ein Oligo-dT 18 Primer, der sich an den Poly-A-Schwanz eukaryotischer RNA anlagert.

Es wurden 10 μl Probe, die maximal 500 ng RNA enthielt, in ein RNase-freies 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Hinzugefügt wurden 2 μl 10x Puffer, 2 μl

Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) Mix, 3 µl RNase-freies Wasser, 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase und 2 µl Oligo-dT 18 Primer. Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 93°C für 5 Minuten inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

Omniscript® Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden, D
Oligo-dt 18 Primer	MWG-Biotech, Ebersberg, D

Material:

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
0,5ml Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D

## 2.9.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Eine PCR dient der Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Dieser wird durch ein entgegengesetztes Primerpaar begrenzt, das sich bei einer geeigneten Annealingtemperatur spezifisch an einen DNA-Einzelstrang anlagert und so den Startpunkt für die DNA-Polymerase setzt. Diese synthetisiert daraufhin einen neuen DNA-Strang. Die verwendete DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) ist hitzestabil und arbeitet bei Temperaturen um 72°C optimal, besitzt aber auch bei 94°C eine hohe Halbwertszeit. Diese Hitzebeständigkeit ist nötig, da die Temperatur auf 94°C erhöht wird, um den neu synthetisierten Strang wieder vom primären DNA-Strang zu trennen (Denaturierung) und so einen neuen Zyklus von Primeranlagerung (Annealing) und DNA-Synthese zu starten. Durch das Hintereinanderschalten vieler Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wird bei der quantitativen PCR (qPCR) ein Farbstoff beigelegt (SYBR-Green), der nach Interkalation in doppelsträngige DNA fluoresziert. Da sich die Fluoreszenz proportional zur synthetisierten DNA-Menge verhält, kann eine Konzentrationsbestimmung erfolgen. Im Anschluss wird eine Schmelztemperaturkurve erstellt durch schrittweises Erhöhen der Temperatur bei gleichzeitiger Messung der Fluoreszenz. Da jedes DNA-Amplifikat entsprechend seiner Primärstruktur eine unterschiedliche Schmelztemperatur besitzt, kann die spezifische Schmelztemperatur (Temperatur bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegt) bestimmt werden. Die Analyse der Schmelztemperaturkurven ermöglicht es, die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen. Um eine Aussage über Expressionsunterschiede der mRNA in Zellen aus verschiedenen Versuchstieren treffen

zu können, werden - bei unterschiedlicher Menge an eingesetzter cDNA - relative Konzentrationen ermittelt. Dazu wird neben dem gesuchten Produkt in jeder Probe zum Abgleich ein Haushaltsgen, das konstant exprimiert wird (L32), in demselben PCR-Lauf amplifiziert. Dies ermöglicht das Berechnen relativer Konzentrationen des gesuchten Produkts. Die Berechnung erfolgt mittels  $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode, bei der die Differenz der  $\Delta\text{ct}$ -Werte von Haushaltsgen und gesuchtem Gen gebildet und anschließend mit 2 potenziert wird.

Der qPCR Mix enthielt 5  $\mu\text{l}$  SYBR-Green (enthält Taq-Polymerase), 0,25  $\mu\text{l}$  Sense-Primer, 0,25  $\mu\text{l}$  Antisense-Primer, 3,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 1  $\mu\text{l}$  Probe. Die Hotstart Taq-Polymerase wurde zunächst durch 15-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert. Es folgten 50 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 95°C über 15 Sekunden, einer Annealingtemperatur von 60°C (58°C bei IL-5) über 30 Sekunden und einer Elongationstemperatur von 72°C über 15 Sekunden. Die verwendeten Primerpaare sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 2: Primersequenzen der quantitativen PCR**

	Primer Sense	Primer Antisense
L32	5`-AGT TCC TGG TCC ACA ACG TC-3`	5`-TTG GGG TTG GTG ACT CTG AT-3`
IL-5	5`-AGC ACA GTG AAA GAG ACC-3`	5`-TCC AAT GCA TAG CTG GTG AAT-3`
IL-10	5`-GCA TGG CCC AGA AAT CAA GG-3`	5`-TCT TCA CCT GCT CCA CTG CC-3`
IFN $\gamma$	5`-GCG TCA TTG AAT CAC ACC TG-3`	5`-TGA GCT CAT TGA ATG CTT GG-3`
Muc5ac	5'-TGA CCC AGA TCC TCC ATC TC -3'	5'-GCA ACT GGA CCA AGT GGT TT-3'

Chemikalien:

QuanitTect™SYBR®Green PCR Master Mix

Qiagen, Hilden, D

Primer

MWG Biotech, Ebersberg, D

Material:

0,1 ml Strip Tubes

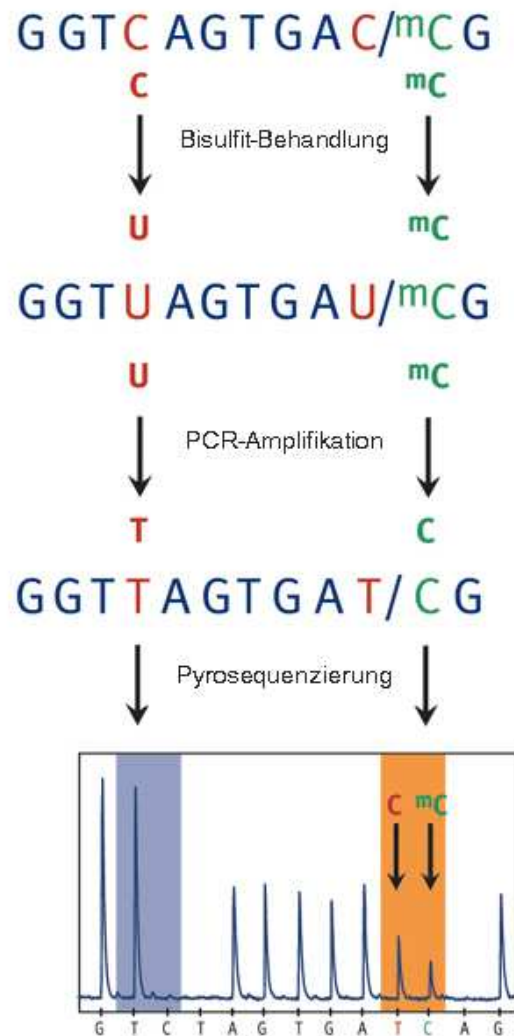
Corbett Research, Australia

Rotor-Gene RG-3000

Corbett Research, Australia

## 2.10 Bisulfitbehandlung und Pyrosequenzierung

DNA-Methylierung findet an Cytosinen in einem so genannten CpG-Kontext statt. Das bedeutet, dass ein Cytosin unmittelbar von einem Guanin auf demselben DNA-Strang gefolgt wird. Das „p“ verdeutlicht deren Bindung über eine Phosphatbrücke. Die Bisulfitbehandlung genomischer DNA ist die Grundlage der meisten Methoden zur Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus.



**Abbildung 11: Bisulfitmodifikation, PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung**

Nicht-Methyliertes Cytosin (C, rot) und methyliertes Cytosin ( $mC$ , grün) können nach Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation differenziert werden. Das Verhältnis von C zu  $mC$  im CpG-Kontext (orange Säule) wird mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Sequenzierabschnitte mit C ohne CpG-Kontext dienen der Kontrolle einer erfolgreichen Bisulfitkonversion (blaue Säule) (modifiziert nach: England R., Pyro Q-CpG™: quantitative Analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®, Nature Methods, Oktober 2005).

Durch die Bisulfitbehandlung wird nicht-methyliertes Cytosin zu Uracil konvertiert, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. In einer anschließenden PCR wird Uracil als Thymidin amplifiziert. Die entstandene Sequenz kann durch Pyrosequenzierung ermittelt werden und erlaubt über die Ratio von Cytosin zu Thymidin an CpGs die quantitative Analyse des Methylierungsstatus des Genlokus. Die Dimension des Methylierungsgrades ist Prozent (%) und gibt die relative Anzahl der Zellen an, die an der entsprechenden Position eine Veränderung der Methylierung erfahren haben.

### **2.10.1 Isolierung und Bisulfitkonversion genomischer DNA**

Zu 41 µl der in ATL-Puffer befindlichen aufgereinigten Zellen (→ 2.4.2) wurden 4 µl Proteinase K gegeben. Durch 1-stündige Inkubation bei 37°C wurden noch vorhandene Proteine degradiert. Eine folgende Inkubation von 15 Minuten bei 98°C inaktivierte die Proteinase K. Die Zugabe von 5 µl 3M Natriumhydroxid (NaOH) und eine Inkubation von 20 Minuten bei 37°C führte zu einer Denaturierung der DNA-Stränge. In der Zwischenzeit wurden 12 ml einer gesättigten Bisulfitlösung (6g Natriumpyrosulfit; pH 5,0 eingestellt durch Zugabe von 5 µl 3M NaOH) und 10mM Hydrochinon in einer lichtgeschützten Umgebung angesetzt. Je 450 µl dieser Lösung wurden nach Ablauf der Inkubationszeit zu jeder denaturierten Probe gegeben. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 55°C im Dunkeln. Nach der Bisulfitbehandlung schloss sich eine Aufreinigung der DNA unmittelbar an. Die Entsalzung erfolgte mit dem WIZARD DNA Kit (Promega). Nach Abkühlen wurde zu jeder Probe 1 ml Wizard®DNA Clean-up Resin pipettiert und auf eine Aufreinigungssäule gegeben. Mittels eines angelegten Vakuums wurde die Lösung durch die Säule gesaugt. Anschließend wurden die Säulen mit 2 ml 80%igem Isopropanol bei erneut angelegtem Vakuum gewaschen. Zum Trocknen wurden die Säulen auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurde 50µl Tris-HCl (pH 8,0, vorgewärmt auf 80°C) auf die Säule gegeben und 2 Minuten inkubiert. 20-sekündiges Zentrifugieren bei 13000 x g eluierte die entsalzene DNA aus der Säule.

Zur Desulfonierung wurden 5,5 µl 3M NaOH zu jeder Probe gegeben und es wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Fällung der DNA mittels Ethanol. Dazu wurden 40 µl 7,5M Natriumacetat, sowie 300 µl 100%iges Ethanol und 2 µl Co-precipitant (Bioline) zu jeder Probe gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Dann wurde 10 Minuten bei 20000 x g und

4°C zentrifugiert, bevor ein Waschschriff mit 500 µl 70%igem Ethanol erfolgte. Nach nochmaliger Zentrifugation (10 Minuten, 20000 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl 1 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und die Probe bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Chemikalien:

Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Amonium Acetat 7,5 M	Sigma, Taufkirchen, D
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen, D
Hydrochinon	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumpyrosulfit	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt, D
Wizard®DNA Clean-up System	Promega, USA
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, D
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat (7,5M)	Ambion, Darmstadt, D
Co-precipitant pink	Bioline GmbH, Luckenwalde, D

Material:

Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Heizblock (HLC Progr)	HLC BioTech, Bovenden, D
Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, D

## 2.10.2 Amplifikation der bisulfitbehandelten Proben mittels

### Polymerasekettenreaktion

Die bisulfitbehandelte DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Die PCR beruht auf demselben Prinzip wie die unter 2.9.5 beschriebene qPCR, verwendet jedoch kein interkalierendes SYBR-Green, da keine Quantifizierung erfolgt. Für die PCR wurde eine hohe Zyklenzahl gewählt, um die PCR-Primer möglichst vollständig zu verwerten. Verbleibende freie Primer hätten in der folgenden Pyrosequenzierung einen unerwünschten Startpunkt für die Polymerase dargestellt. Zur Vereinfachung der Aufreinigung des Templates für die folgende Pyrosequenzierung wurde ein biotinylierter Antisense-Primer verwendet.

Für die PCR für IL-5 wurde folgender Ansatz gewählt:

- 1 µl Probe
- 5 µl 10x-Puffer
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1 µl Sense-Primer (10 µM)
- 1 µl Antisense-Primer (10 µM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 36,5 µl H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl Bio-X-ACT™ Short DNA Polymerase (4 U/µl)

Nach 5-minütiger Inkubation bei 94°C, folgten 54 Zyklen mit einer 30-sekündigen Denaturierung bei 94°C, einem Annealing von 30 Sekunden bei 60°C und einer Extension von 60 Sekunden bei 72°C. Abschließend folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C, um noch vorhandene unvollständige Amplifikate zu vervollständigen.

Für die IFN $\gamma$ -PCR und die IL-10-PCR bestand der Ansatz aus:

- 1 µl Probe.
- 25 µl Hotstart MasterMix
- 1 µl Sense-Primer (10 µM)
- 1 µl Antisense-Primer (10 µM)
- 22 µl H<sub>2</sub>O

Die Hotstart-Polymerase benötigte eine einmalige Aktivierung von 15 Minuten bei 95°C. Es folgten 45 Zyklen mit einer 30-sekündigen Denaturierung bei 94°C, einem Annealing von 30 Sekunden (für IFN $\gamma$  bei 60°C, für IL-10 bei 52°C) und einer Extension von 60 Sekunden bei 72°C. Abschließend folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C, um noch vorhandene unvollständige Amplifikate zu vervollständigen.

Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Primersequenzen für die Polymerasekettenreaktion der bisulfitbehandelten Proben**

	Primer Sense	Primer Antisense
IL-5	5`-GGG GAT AAA AAA GAA GGT GTT TAA GAA AGT-3`	5`-[Biotin]-AAA CAC TCA AAT ACA AAA ACA TCC TTC TCA TAA CT-3`
IFN $\gamma$	5`-GGT TTG AGA AGT TTA AGA GTT TTT TTA TGG-3`	5`-[Biotin]-TAG GTA TAA AAT TGG AAG TTA GAG AGG TGT AGG-3`
IL-10	5`-TTG GGA TAT TGT AAA ATA GGG TTA TGG TAA GG-3`	5`-[Biotin]-CAA CTA TTC TAT ATA CAA AAA CCC TCA TCT ATA-3`

Chemikalien:

HotstartTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Bio-X-ACT™ Short DNA Polymerase (4 U/μl)	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
-10x Optibuffer	
-MgCl <sub>2</sub> Solution (50 mM)	
-dNTP (10 mM)	

Material:

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
0,5 ml Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D

### 2.10.3 Qualitative Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg der PCR-Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Nur bei distinkten Banden der erwarteten Amplifikatgröße wurde das PCR-Produkt für die anschließende Pyrosequenzierung eingesetzt. Zur Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel (in Tris-Borat-EDTA-Puffer) gegossen, dem 0,2 μg/ml Ethidiumbromid beigesetzt wurde. Dieses interkaliert in der DNA und kann später durch UV-Licht der Geldokumentationsstation sichtbar gemacht werden. Je 4 μl Probe wurden mit 1 μl Gel-Loading-Solution (6x Konzentration) gemischt, die dafür sorgte, dass die Proben nicht aus den Geltaschen diffundierten. Nach Auftragen der Proben wurde diese für 1 Stunde bei 100V in 1x-Tris-Borat-EDTA-Puffer aufgetrennt und anschließend an der Geldokumentationsstation ausgewertet. Bei Nachweis einer erfolgreichen PCR-Amplifikation wurden die restlichen 46μl Probe bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

Gel-Loading-Solution Typ I	Sigma, Taufkirchen, D
PeqGOLD 100bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
ROTI®Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	
TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
Bor-Säure	Sigma, Taufkirchen, D
EDTA Dinatrium Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt, D

Material:

Geldokumentationsstation	MWG-Biotech, Ebersberg, D
--------------------------	---------------------------

### 2.10.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Echtzeit-Sequenzierung, die aufgrund einer gekoppelten enzymatischen Reaktion eine quantitative Aussage über den Nukleotideinbau erlaubt.

Die Proben müssen für die Pyrosequenzierung zunächst vorbereitet werden, da die DNA als Einzelstrang vorliegen muss, um die Anlagerung der Sequenzierprimer zu ermöglichen. Dazu wurde in der vorausgegangenen PCR ein biotinylierter Anti-Sense-Primer verwendet. Im folgenden Protokoll bindet dieser an Streptavidin-gekoppelte Beads, die anschließend von einem Vacuum-Prep-Tool (VPT) (Biotage) angesaugt werden. Das VPT ist an ein Vakuum angeschlossen und enthält 96 mit Filtern bestückte Ansaugröhrchen. Durch die folgende Denaturierung mittels NaOH wird der Sense-Strang gelöst und in einem Waschschrift entfernt.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Je 40 µl des PCR-Ansatzes wurden in eine 96-Well-Platte überführt und 3 µl Sepharose-Beads und 40 µl Binding Buffer wurden zugefügt. Eine 5-minütige Inkubation fand bei Raumtemperatur auf einem Variomag Teleshake Schüttler bei 1000 rpm statt, der ein Pelettieren der Beads verhinderte.

Zwischenzeitlich wurde das Vacuum-Prep-Worktable (VPW) vorbereitet. Der VPW enthält freie Positionen für eine 96-Well-Platte und eine PSQ96-Platte. Zusätzlich enthält das VPW Schälchen an vier Positionen, die wie folgt befüllt wurden: die Parking-Position (Position 1) mit VE-Wasser, Position 2 mit 70%igen Ethanol, Position 3 mit 0,2 M NaOH-Lösung, Position 4 mit Washing Buffer. Die PSQ96-Platte wurde platziert und 1 µl des 10 µM Sequenzierprimers und 40 µl Annealing Buffer wurden pro Well vorgelegt. Folgende Sequenzierprimer wurden verwendet.

**Tabelle 4: Primerdaten der Sequenzierprimer**

	Untersuchte CpGs (Position +1 = Transkriptionsstart)	Primersequenz
IL-5	-13, +1, +25	5'-TTT TTT AGA GAG ATA AAT TG-3'
IFN $\gamma$	-212, -198, -178	5'-ATT TTA TAA GAA TGG TAT AGG TG-3'
	-59, -50, -39	5'-AAA ATT AAA AAA AAA TTT GTG-3'
IL-10	-352, -331	5'-TAA TAT GTT TTG GAA TAG TTT A-3'

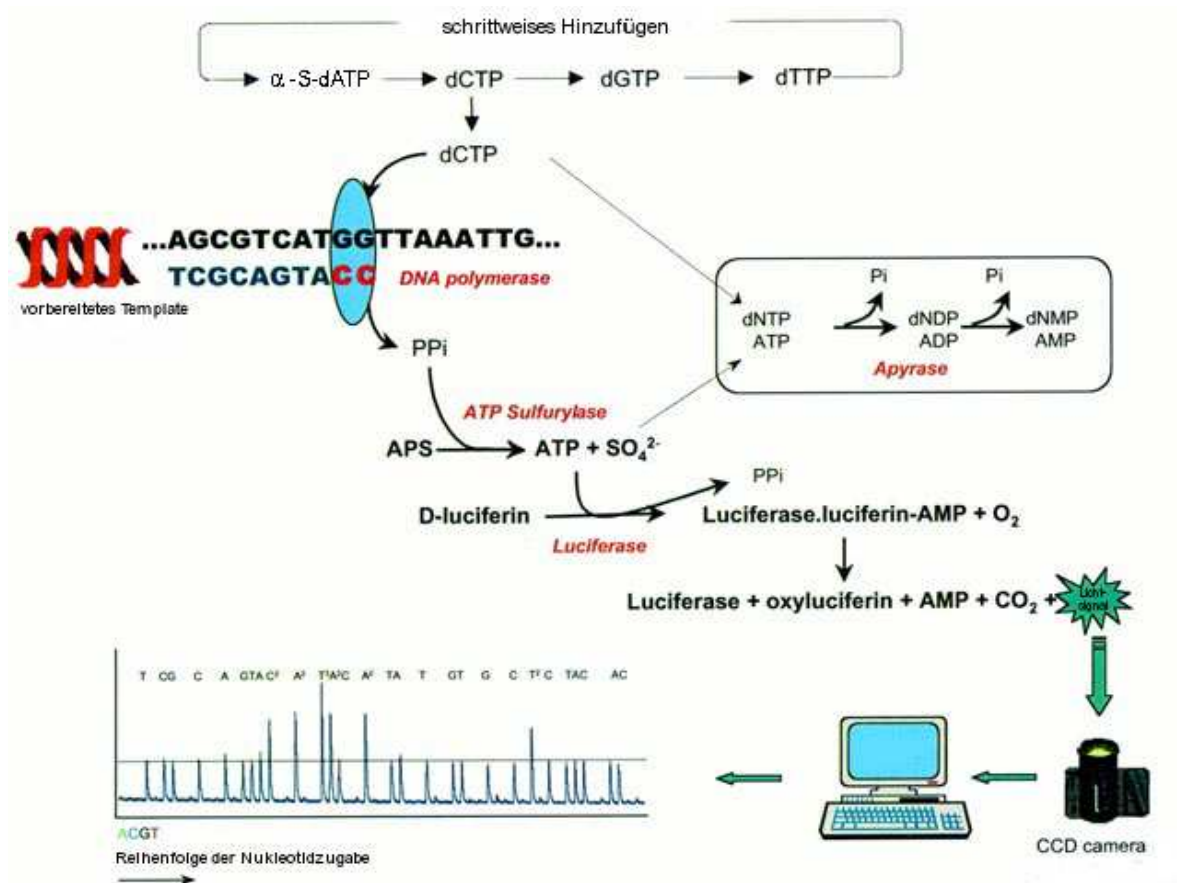
Die 96-Well-PCR-Platte wurde nach Abschluss der Inkubation auf dem VPW platziert. Nach Äquilibrieren des Vacuum-Prep-Tools für 20 Sekunden in der Parking-Position wurde die PCR-Probe mit Hilfe des Vakuums aus der 96-Well-PCR-Platte angesaugt und auf den Filtern des VPT gehalten. Es wurden nun die weiteren drei Positionen des VPW für jeweils 5 Sekunden durchlaufen: ein Waschschrift in 70%igem Ethanol, der Denaturationsschritt in 0,2 M NaOH-Lösung, ein weiterer Waschschrift in Washing-Buffer. Da nun die DNA einzelsträngig vorlag, wurden das VPT über der PSQ96-Platte positioniert und durch Abschalten des Vakuums die Sepharose-Beads mit den daran gekoppelten DNA-Strängen freigesetzt. Zum Auflösen von Sekundärstrukturen wurden die Proben auf der PSQ96-Platte für 3 Minuten bei 80°C inkubiert und daraufhin zum Abkühlen und Annealen des Sequenzierprimers einige Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Es folgte der Sequenziervorgang, der auf folgendem Prinzip beruht: In einem Reaktionsgefäß befinden sich zunächst die vorbereitete Probe, ein Sequenzierprimer und ein Enzymmix. Letzterer besteht aus der DNA Polymerase I, Adenosintriphosphat (ATP)-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase. Beim Sequenziervorgang werden entsprechend der zu erwartenden Sequenz nacheinander einzeln dNTPs in das Reaktionsgefäß gegeben. Handelt es sich hierbei um ein dem Strang komplementäres Nukleotid, erfolgt der Einbau durch die DNA Polymerase I. Bei diesem Vorgang wird Pyrophosphat freigesetzt, das von der ATP-Sulfurylase mit Adenosin-5'-Phosphosulfat zu ATP umgewandelt wird. Das ATP ermöglicht es als Energieträger der Luciferase D-Luciferin herzustellen. Bei dieser Reaktion wird ein Lichtsignal der Wellenlänge  $\lambda=560\text{nm}$  emittiert, welches von einer „Charge-coupled device“ (CCD)-Kamera detektiert und von einer Software quantitativ ausgewertet werden kann. Werden hintereinander mehrere gleiche Nukleotide eingebaut, steigt proportional die Intensität des Lichtsignals. Nicht-eingebaute Nukleotide werden vom Enzym Apyrase abgebaut. Da DNA-Polymerase und Apyrase um die gleichen Nukleotide kompetieren, ist ein genau abgestimmtes Verhältnis der einzelnen Enzyme im Enzymmix wichtig. Da ATP das natürliche Substrat der Luciferase ist und die Zugabe von ATP zum Reaktionsmix in einem Lichtsignal resultieren würde, verwendet man statt des Nukleotids ATP das modifizierte  $\alpha\text{-S-ATP}$ , welches von der Luciferase nicht katalysiert werden kann.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Patrone des Pyrosequenzierers (Reagent Cartridge) wurde entsprechend dem zu analysierenden DNA-Abschnitt mit der benötigten Menge an Enzym, Nukleotiden und Substrat befüllt. In der Software Pyro Q-

CpG<sup>TM</sup> wurden der zu sequenzierende Abschnitt und die CpG-Positionen eingegeben. Die Position der CpG-Motive innerhalb der genomischen Sequenz wurde bestimmt im Vergleich zum Transkriptionsstart der kompletten mRNA-Sequenz NM\_008337 (IFN $\gamma$ ), NM\_010558 (IL-5) und NM\_010548 (IL-10).

Es wurden Kontrollpunkte zur Überprüfung der Bisulfitbehandlung gesetzt. Dies geschah an Positionen, an denen vor der Bisulfitbehandlung ein unmethyliertes Cytosin ohne CpG-Kontext vorlag. Hier wurde programmiert, dass neben der Base Thymin, die den erwarteten Peak zeigen sollte, anschließend auch die Base Cytosin hinzugeben werden sollte. Ein Lichtsignal nach Zugabe von Cytosin an dieser Position hätte eine unvollständige Bisulfitkonversion bedeutet.



**Abbildung 12: Pyrosequenzierung**

Eine gekoppelte enzymatische Reaktion führt zu einem detektierbaren Lichtsignal bei erfolgreichem Einbau einer Base ( $\alpha$ -S-dATP: alpha-S-Desoxyadenosintriphosphat, dCTP: Desoxycytidintriphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dTTP: Desoxythymidintriphosphat, PPi: Pyrophosphat, APS: Adenosinphosphosulfat, ATP: Adenosintriphosphat, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: Sulfat-Anion, AMP: Adenosinmonophosphat, O<sub>2</sub>: Sauerstoff, CO<sub>2</sub>: Kohlenstoffdioxid) (modifiziert nach: Gharizadeh B., Typing of Human Papillomavirus by Pyrosequencing, Laboratory Investigation, Mai 2001, Volume 81, pp. 673 - 679).

Nach dem Positionieren der PSQ96-Platte und der Patrone in den Pyrosequenzierer konnte der Sequenziervorgang gestartet werden. Waren aufgrund der Sequenzlänge mehrere Sequenzierreaktionen notwendig ( $\rightarrow$ IFN $\gamma$ ), wurden die Proben mehrfach verwendet. Dazu erfolgte wiederum eine Aufreinigung mittels VPW und VPT, bei der der soeben synthetisierte Strang sowie restliche Sequenzierprimer der ersten Sequenzierung entfernt wurden, gefolgt von einer Inkubation mit Annealing Buffer und dem zweitem Sequenzierprimer.

Chemikalien:

PyroGold SQA Reagent Kit	Biotage, Uppsala, S
Streptavidin-Sepharose HP Beads	GE Healthcare, München, D
Annealing Buffer (pH 7,6)	
-20 mM Tris, 2 mM Mg-Acetat	Biotage, Uppsala, S
Binding Buffer	
-10 mM Tris, 2 M NaCl,	
-1 mM EDTA, 0,1% Tween20	Biotage, Uppsala, S
Washing Buffer	
-10 mM Tris	Biotage, Uppsala, S
Denaturation Solution	
-0,2 M NaOH	Biotage, Uppsala, S
Ethanol (70%)	Roth, Karlsruhe, D

Material:

PyroMarkMD (Pyrosequencer)	Biotage, Uppsala, S
Vacuum Preparation Tool	Biotage, Uppsala, S
PSQ 96 Plate low	Biotage, Uppsala, S
PSQ Reagent Cartridge	Biotage, Uppsala, S
Q-CpG Software	Biotage, Uppsala, S
Heizblock	Biozym, Hessisch Olendorf, D
Variomag Teleshake	H+P, Oberschleissheim, D

## 2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels (ungepaarten) t-Test. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Signifikanzwerte sind wie folgt dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Für die graphische Darstellung wurde die Software GraphPad Prism® verwendet.

### 3 Ergebnisse

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die i.n. Applikation des apathogenen Milchsäurebakteriums *L. lactis* die Entstehung experimentellen Asthmas in OVA-sensibilisierten Mäusen verhindert (Debarry et al., 2007). Dabei wurden in der Arbeit von Debarry *et al.* lediglich phänotypische Parameter charakterisiert. Mögliche zugrunde liegende molekulare Mechanismen blieben ungeklärt und sollten in dieser Arbeit erörtert werden. Dazu war es zunächst notwendig, den protektiven Effekt von *L. lactis* analog zu Debarry *et al.* zu bestätigen (Lungenfunktionsmessung, Differenzierung der Zellpopulationen in der BAL, Lungenhistologie, allergenspezifische Antikörper im Serum). Anschließend, wurden auf DNA- und auf RNA-Ebene die Zytokinexpressionsmuster mononukleärer Zellen aus bronchialen Lymphknoten (lokale Effekte) und der Milz (systemische Effekte) analysiert. Schließlich wurde der DNA-Methylierungsstatus ausgewählter Genloci von T-Effektorzytokinen bestimmt und damit als möglicher Mechanismus der Genregulation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

Für das Experiment wurden weibliche BALB/c Mäuse in vier Versuchsgruppen aufgeteilt. Gruppe 1 und 2 erhielten über einen Zeitraum von 5 Wochen jeden zweiten Tag eine i.n. Applikation von 50 µl sterilem PBS, Gruppe 3 und 4 dagegen 1x10<sup>8</sup> cfu *L. lactis* suspendiert in 50 µl PBS. In Gruppe 2 und 4 wurde experimentelles Asthma induziert, Gruppe 1 und 3 wurden über i.p. Gabe von PBS pseudosensibilisiert. Dies ergab folgende Konstellation:

- Gruppe 1: PBS/PBS (Negativkontrollgruppe, i.n. PBS-Exposition, PBS-pseudosensibilisiert)
- Gruppe 2: PBS/OVA (Positivkontrollgruppe, i.n. PBS-Exposition, OVA-sensibilisiert)
- Gruppe 3: *L. lactis*/PBS (i.n. *L. lactis*-Applikation, PBS-pseudosensibilisiert)
- Gruppe 4: *L. lactis*/OVA (i.n. *L. lactis*-Applikation, OVA-sensibilisiert)

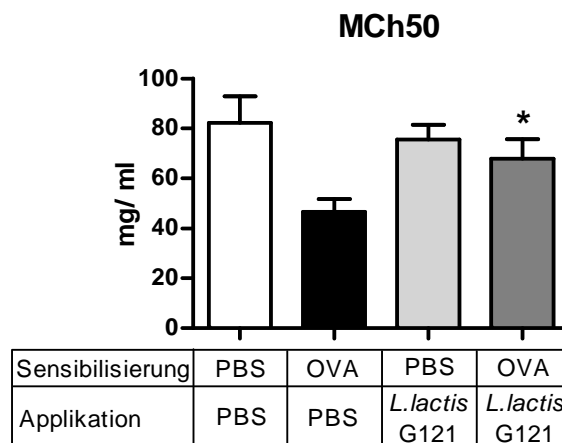
Gruppe 3 sollte zeigen, ob eine Exposition „gesunder“ Mäuse mit dem apathogenen Bakterium *L. lactis* unerwünschte Nebenwirkungen hat. Gruppe 4 diente der Untersuchung des protektiven *L. lactis*-Effektes.

### 3.1 Auswirkungen der nasalen Exposition mit *L. lactis* auf die experimentelle Atemwegsentzündung von BALB/c Mäusen

#### 3.1.1 Atemwegsreagibilität

Wichtigster funktioneller Parameter zum Nachweis von bronchialer Hyperreagibilität im klinischen Alltag ist die Lungenfunktionsmessung, die in vorliegender Arbeit mittels Head-out Body-Plethysmographie erfolgte.

Die Mäuse der Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) wiesen einen MCh50 von  $82,30 \pm 10,46$  mg/ml auf. Sensibilisierte Kontrolltiere (PBS/OVA) zeigten eine signifikante Hyperreagibilität ( $p < 0,05$ ) der Atemwege (MCh50  $45,85 \pm 6,02$  mg/ml). Die Applikation von *L. lactis* an PBS-pseudosensibilisierte Mäuse (*L. lactis*/PBS) hatte keinen Einfluss auf die Lungenfunktion (MCh50  $75,53 \pm 5,81$  mg/ml). Die Verabreichung von *L. lactis* an OVA-sensibilisierten Mäuse (*L. lactis*/OVA) führte zu einer signifikanten Normalisierung ( $p < 0,05$ ) der Lungenfunktion. Im Vergleich zur Positivkontrollgruppe (PBS/OVA) stieg der MCh50 Wert um 48% auf  $67,95 \pm 7,71$  mg/ml. Zur „gesunden“ Negativkontrollgruppe war kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $\rightarrow$  Abb. 13).



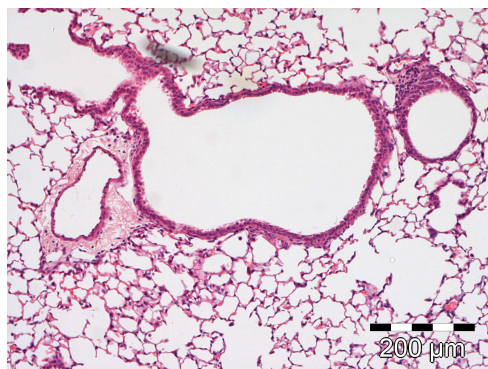
**Abbildung 13: Einfluss der *L. lactis*-Behandlung auf die Atemwegsreagibilität**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Die Lungenfunktionsmessung wurde mittels nicht-invasiver Head-Out Body-Plethysmographie bestimmt. MCh50 ist die Methacholin-Konzentration, bei welcher der mittlere expiratorische Atemfluss der Maus auf 50% des ursprünglichen Atemflusses reduziert war (MCh50). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM. Für \* gilt das Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

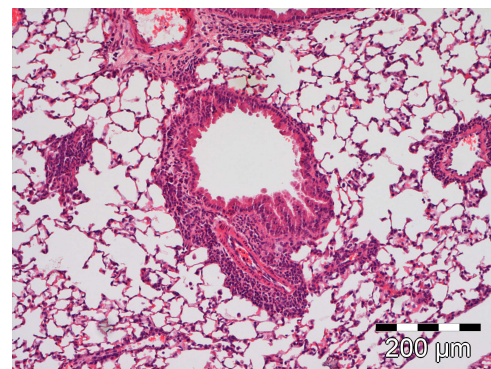
### 3.1.2 Lungenhistologie

Eine akute allergische Entzündung der Atemwege führt typischerweise zu einer Vermehrung der Entzündungszellen im Lungengewebe und insbesondere zu einer Zunahme eosinophiler Granulozyten. Außerdem zeigt sich eine Hyperplasie mukusproduzierender Becherzellen. Um zu untersuchen, wie sich die Behandlung OVA-sensibilisierter Mäuse mit *L. lactis* auf die pulmonale Entzündung auswirkt, wurden aus Lungengewebe histologische Schnitte angefertigt, die H&E und PAS gefärbt wurden.

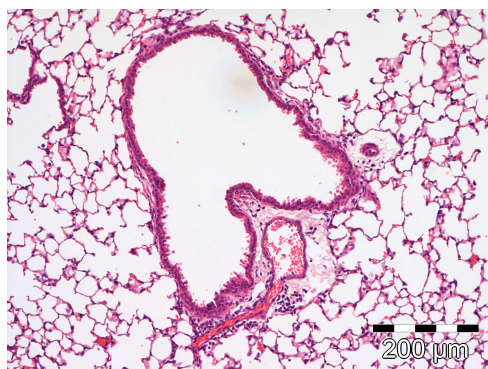
In der H&E-Färbung wies die Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) keine Entzündungsreaktion im Lungengewebe auf. In der Positivkontrollgruppe (PBS/OVA) zeigte sich eine deutliche peribronchiale Infiltration mit Entzündungszellen. Die Applikation von *L. lactis* an PBS-pseudosensibilisierte Tiere führte zu keiner verstärkten Zellrekrutierung in das Lungengewebe im Vergleich zur Negativkontrollgruppe. Durch die Applikation von *L. lactis* an OVA-sensibilisierte Tiere konnte im Vergleich zur Positivkontrollgruppe eine Reduktion des peribronchialen Entzündungsinfiltrats erreicht werden (→Abb.14).



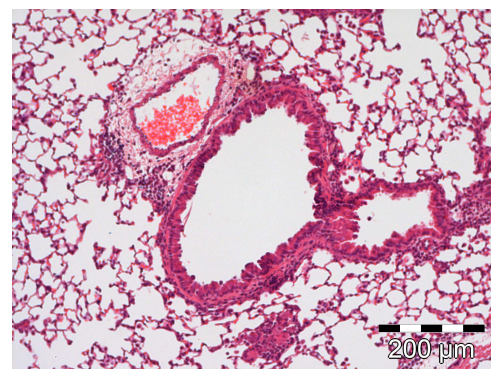
**PBS/PBS**



**PBS/OVA**



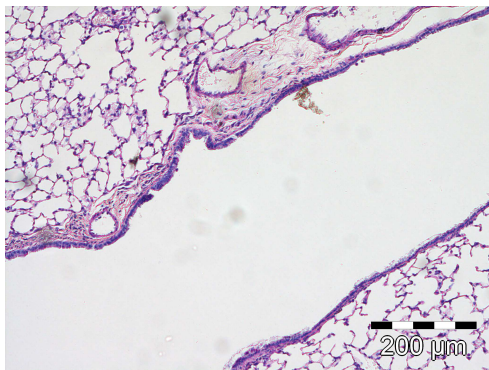
***L. lactis*/PBS**



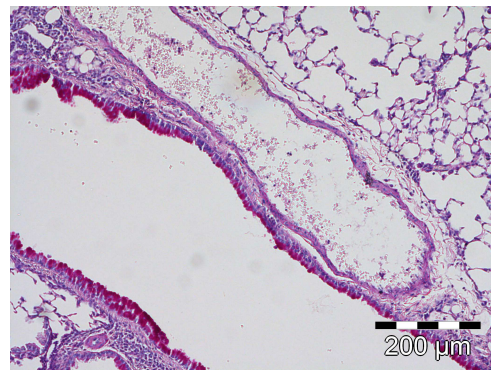
***L. lactis*/OVA**

**Abbildung 14: Einfluss der *L. lactis*-Behandlung auf das zelluläre Infiltrat im Lungengewebe**  
H&E-Färbung von Gewebequerschnitten der Lunge.

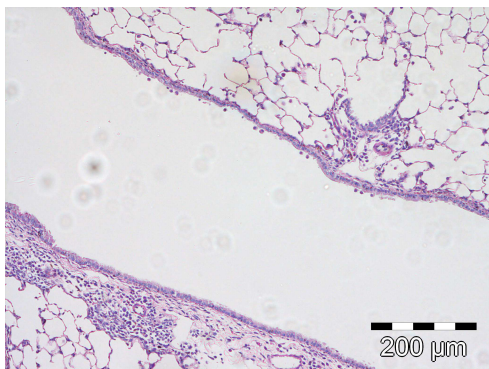
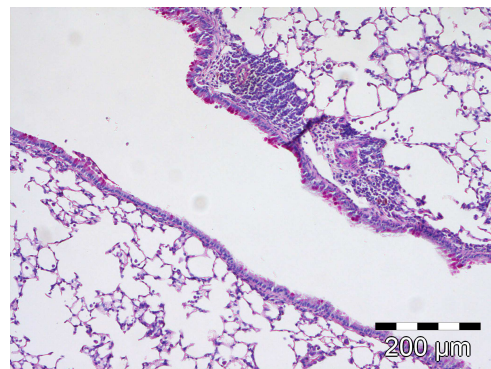
Die PAS-Färbung zeigte keine mukusproduzierenden Becherzellen in PBS/PBS-Tieren, jedoch eine starke Färbung in OVA-sensibilisierten und –provozierten Kontrolltieren (PBS/OVA), *L. lactis*-Applikation alleine hatte keinen Einfluss auf die Mukusproduktion (*L. lactis*/PBS). Eine signifikante Reduktion der Becherzellhyperplasie wurde durch die *L. lactis*-Behandlung in OVA-sensibilisierten Mäusen nachgewiesen (→Abb.15, Abb.16). Besonders deutlich zeigte sich der Rückgang bei Betrachtung der kleinen Atemwege (→Abb.16).



PBS/PBS

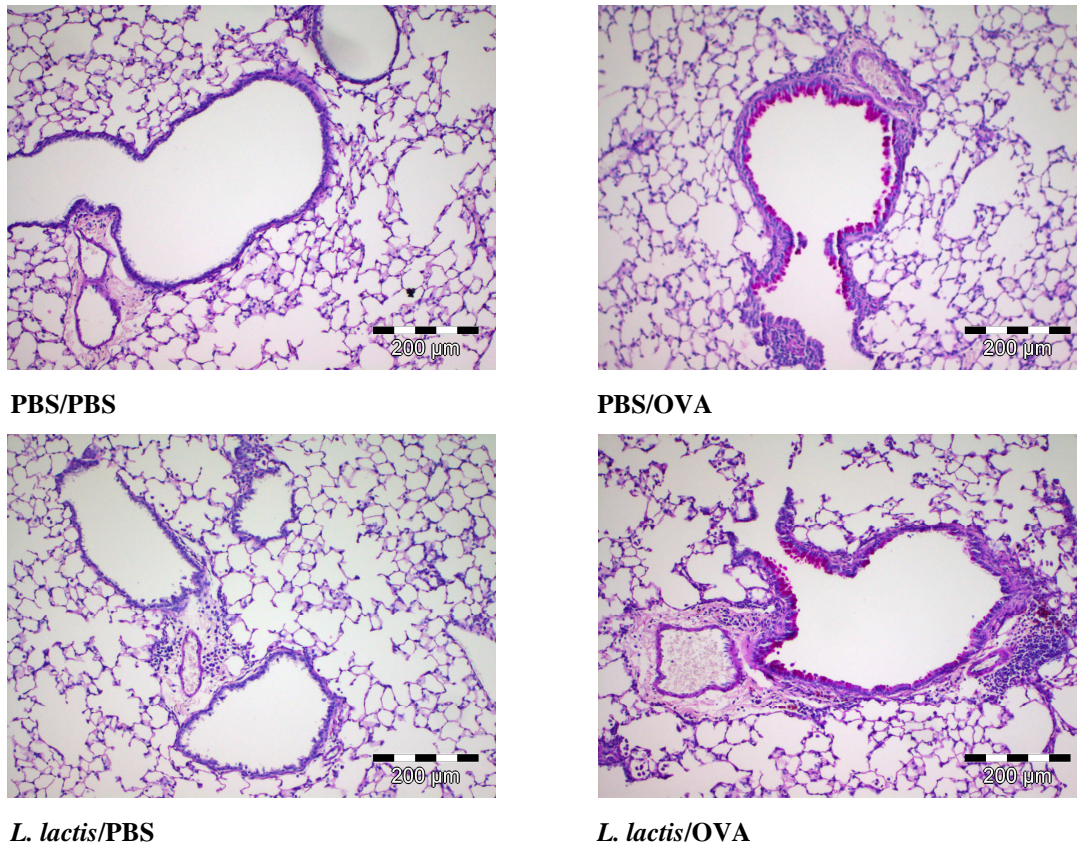


PBS/OVA

*L. lactis*/PBS*L. lactis*/OVA

**Abbildung 15: Einfluss der *L. lactis*-Behandlung auf die Zahl mukusproduzierender Becherzellen im Bronchialsystem – große Atemwege**

PAS-Färbung von Gewebsquerschnitten der Lunge.



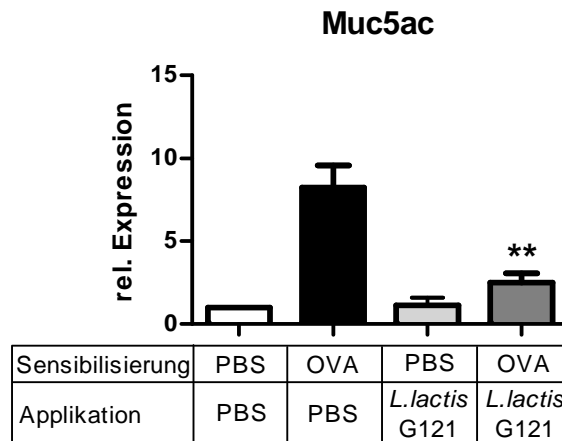
**Abbildung 16: Einfluss der *L. lactis*-Behandlung auf die Zahl mukusproduzierender Becherzellen im Bronchialsystem – kleine Atemwege**

PAS-Färbung von Gewebequerschnitten der Lunge.

### 3.1.3 mRNA-Expression von Muc5ac im Lungengewebe

In der PAS-Färbung von Gewebeschnitten wurden Unterschiede im Hinblick auf die Mukusproduktion beobachtet. Diese sollten auf molekularer Ebene objektiv quantifiziert werden. Dazu wurde mittels quantitativer RealTime PCR die mRNA-Konzentration von Muc5ac im Lungengewebe gemessen, da dessen Expression mit dem Ausmaß der bronchialen Becherzellhyperplasie korreliert (Young et al., 2007).

Im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) führte die OVA-Sensibilisierung (PBS/OVA) zu einem  $8,23 \pm 1,34$ -fachen Anstieg der Muc5ac-mRNA-Konzentration. Die Applikation von *L. lactis* allein hatte dagegen keinen Einfluss (relative Expression:  $1,13 \pm 0,46$ ). Verglichen mit der Positivkontrollgruppe (PBS/OVA) wurde durch die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere eine signifikante Reduktion ( $p < 0,01$ ) der Muc5ac-Konzentration um 69,6% erreicht (relative Expression:  $2,50 \pm 0,56$ ) ( $\rightarrow$ Abb.17).



**Abbildung 17: Muc5ac-mRNA-Konzentration im Lungengewebe**

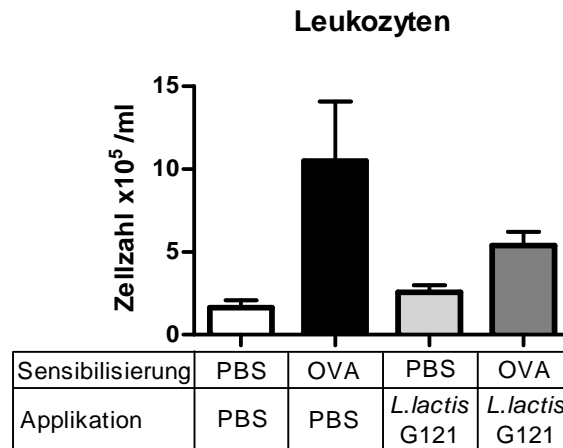
Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Relative Muc5ac-mRNA-Konzentrationen im Lungengewebe wurden durch Abgleich mit dem Haushaltsgen L32 in einer qPCR bestimmt. Die Expression ist relativ zur unbehandelten PBS/PBS-Gruppe (Negativkontrollgruppe) dargestellt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM, für \*\* gilt das Signifikanzniveau  $p < 0,01$ .

### 3.1.4 Bronchoalveoläre Lavage

Für eine pulmonale Gewebsentzündung, wie sie bei allergischem Asthma auftritt, sind Entzündungszellen (besonders eosinophile Zellen) in der BAL charakteristisch. Das in der Histologie beobachtete vermehrte entzündliche Infiltrat geht mit einem verstärkten Übergang der inflammatorischen Zellen in das bronchoalveoläre Lumen einher. Durch die BAL wurden Zellen, die sich in diesem Kompartiment befanden, herausgewaschen und konnten quantitativ und qualitativ analysiert werden. Es wurde die Gesamtleukozytenzahl bestimmt sowie eine Differenzierung in Subpopulationen vorgenommen (Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten).

Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) wiesen die niedrigsten Leukozytenzahlen in der BAL auf ( $1,65 \pm 0,44 \times 10^5/\text{ml}$ ). Sensibilisierte Kontrolltiere (PBS/OVA) zeigten einen sechsfachen, signifikanten Anstieg der Leukozytenkonzentration ( $10,50 \pm 3,57 \times 10^5/\text{ml}$ ;  $p < 0,05$ ). Die alleinige *L. lactis*-Applikation (*L. lactis*/PBS) hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss mit nur geringfügig erhöhter Leukozytenkonzentration im Vergleich zu den PBS/PBS-Tieren ( $2,56 \pm 0,47 \times 10^5/\text{ml}$ ). Die Applikation von *L. lactis* an OVA-sensibilisierte Tieren konnte die Gesamtleukozytenzahl in der BAL, verglichen mit den PBS/OVA-Tieren nicht signifikant reduzieren ( $5,38 \pm 0,84 \times 10^5/\text{ml}$ ). Jedoch

zeigte sich im Vergleich zur PBS/OVA-Gruppe eine deutliche Tendenz in Richtung einer verminderten Gesamtzellzahl (→Abb.18).

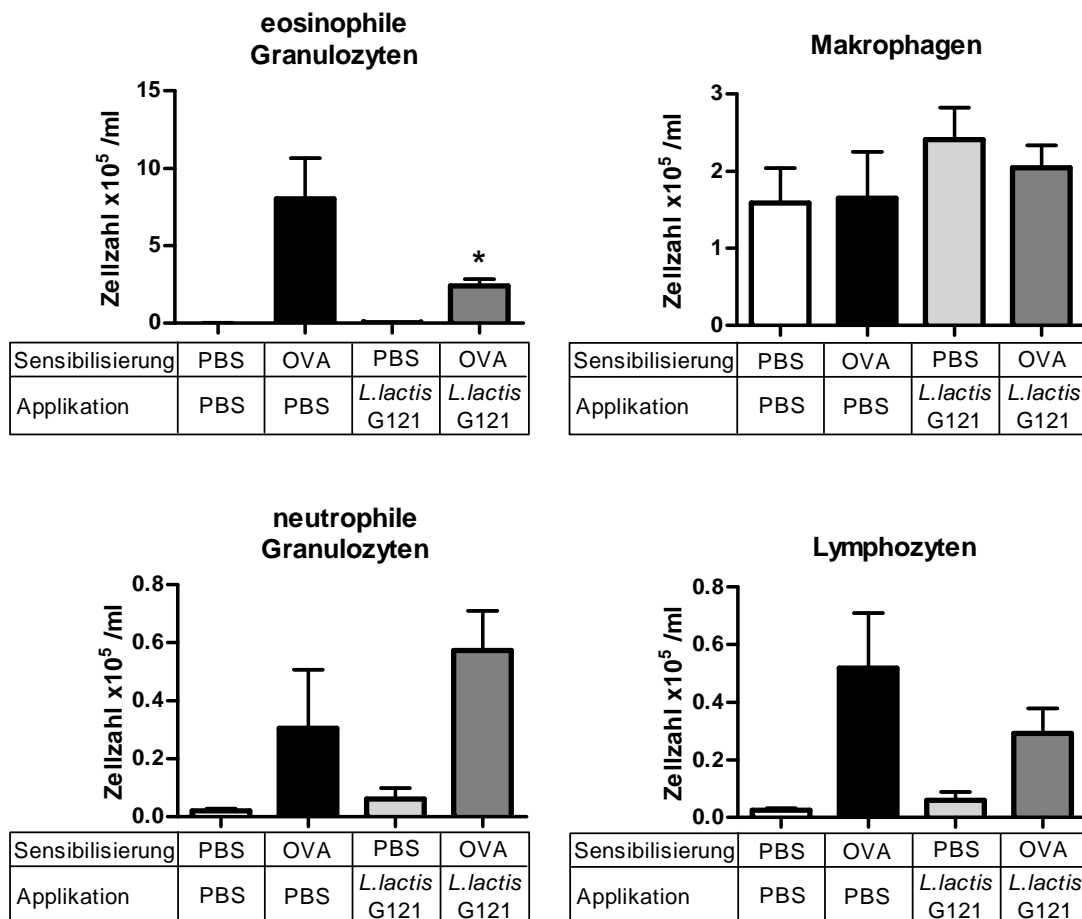


**Abbildung 18: Leukozytenzellzahlen in der bronchoalveolären Lavage**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Die Abbildung zeigt Unterschiede in der Leukozytenzellzahl der BAL. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In der Differenzierung der Leukozytensubpopulationen zeigten sich in PBS/PBS-Tieren Makrophagen als dominante Zellsubpopulation (Makrophagen:  $1,59 \pm 0,45 \times 10^5/\text{ml}$ , Lymphozyten  $0,03 \pm 0,01 \times 10^5/\text{ml}$ , neutrophile Granulozyten:  $0,02 \pm 0,01 \times 10^5/\text{ml}$ , eosinophile Granulozyten:  $0,02 \pm 0,01 \times 10^5/\text{ml}$ ). Als Hauptursache der bronchialen Leukozytose in den OVA-sensibilisierten Mäusen (PBS/OVA) erwiesen sich die eosinophilen Granulozyten, die einen Anteil von 76% an der Leukozytengesamtzahl ausmachten (eosinophile Granulozyten:  $8,03 \pm 2,62 \times 10^5/\text{ml}$ , Makrophagen:  $1,65 \pm 0,60 \times 10^5/\text{ml}$ , Lymphozyten:  $0,52 \pm 0,19 \times 10^5/\text{ml}$ , neutrophile Granulozyten:  $0,30 \pm 0,20 \times 10^5/\text{ml}$ ). In *L. lactis*/PBS-Tieren bestand die führende Zellpopulation aus Makrophagen, gefolgt von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten (Makrophagen:  $2,4 \pm 0,41 \times 10^5/\text{ml}$ , neutrophile Granulozyten:  $0,06 \pm 0,04 \times 10^5/\text{ml}$ , Lymphozyten:  $0,059 \pm 0,03 \times 10^5/\text{ml}$ , eosinophile Granulozyten:  $0,03 \pm 0,01 \times 10^5/\text{ml}$ ). In keiner der Leukozytensubpopulationen in *L. lactis*-behandelten PBS-pseudosensibilisierten Tieren zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrollgruppe (PBS/PBS). Wie in der Positivkontrollgruppe erwiesen sich in *L. lactis* exponierten OVA-sensibilisierten Tieren die eosinophilen Granulozyten als dominante Zellpopulation mit einem Anteil von 45% (eosinophile

Granulozyten:  $2,41 \pm 0,45 \times 10^5/\text{ml}$ , Makrophagen:  $2,04 \pm 0,29 \times 10^5/\text{ml}$ , neutrophile Granulozyten:  $0,57 \pm 0,14 \times 10^5/\text{ml}$ , Lymphozyten:  $0,29 \pm 0,09 \times 10^5/\text{ml}$ ). Doch konnte durch die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere die Zahl der eosinophilen Granulozyten signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) werden. Verglichen mit der Positivkontrollgruppe (PBS/OVA) sank ihre Zahl um 70% ( $\rightarrow$  Abb.19).



**Abbildung 19: Zellzahlen der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage**

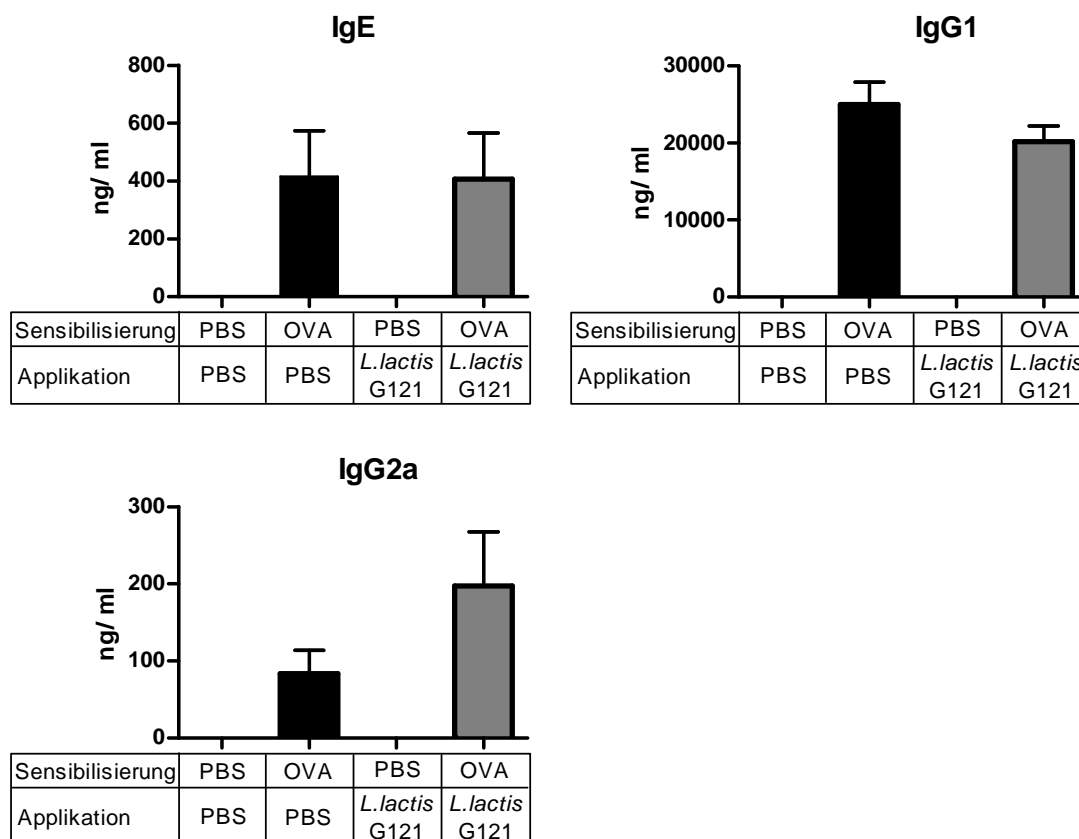
Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal gegenüber *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) exponiert, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Die Säulendiagramme zeigen Unterschiede der Zellzahl von Leukozytensubpopulationen aus der BAL. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$ SEM, für \* gilt das Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 3.1.5 Immunglobulin-Konzentration im Serum

Nachdem ein Rückgang der lokalen Entzündungsreaktion unter Behandlung mit *L. lactis* beobachtet werden konnte, sollte erörtert werden, ob auch ein systemischer

Effekt existiert. Dazu wurden im Serum der Versuchstiere die Immunglobulin-Konzentrationen von OVA-spezifischem-IgE, -IgG1 und -IgG2a untersucht.

Bei Nicht-OVA-sensibilisierten Mäusen (PBS/PBS und *L. lactis*/PBS) ließen sich erwartungsgemäß keine OVA-spezifischen Immunglobuline messen. In PBS/OVA-Tieren betragen die Immunglobulin-Konzentrationen für anti-OVA IgE  $416,3 \pm 157,8$  ng/ml, für anti-OVA IgG1  $25000 \pm 2886$  ng/ml und für anti-OVA IgG2a  $83,52 \pm 30,30$  ng/ml. Die i.n. *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Immunglobulin-Produktion (anti-OVA IgE:  $406,0 \pm 159,5$  ng/ml, anti-OVA IgG1:  $20.190 \pm 2.032$  ng/ml, anti-OVA IgG2a:  $197,3 \pm 69,92$  ng/ml)(→Abb.20).



**Abbildung 20: OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal gegenüber *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) exponiert, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Am Präparationstag wurde den Tieren Blut entnommen und die OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a wurden mittels ELISA bestimmt.

### 3.1.6 Zusammenfassung der Phänotypanalysen

In der Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) zeigten sich keine für experimentelles Asthma charakteristische Effekte. In der Positivkontrollgruppe (OVA/PBS) konnte erfolgreich eine akute Atemwegsentzündung induziert werden, sichtbar an einer erhöhten bronchialen Hyperreagibilität, einem peribronchialen entzündlichen Infiltrat sowie einer Becherzellhyperplasie in der Lungenhistologie, einer erhöhten Konzentration eosinophiler Granulozyten in der BAL und einer Induktion OVA-spezifischer Immunglobuline. Die alleinige Behandlung mit *L. lactis* (*L. lactis*/PBS) führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der PBS/PBS-Gruppe. In den mit *L. lactis* behandelten OVA-sensibilisierten Mäusen (*L. lactis*/OVA) konnte analog zu Debarry *et al.* (Debarry *et al.*, 2007) anhand oben erwähnter Parameter eine deutliche Reduktion der pulmonalen Entzündungsreaktion festgestellt werden. Zusätzlich wurde die Mukusproduktion mittels Genexpressionsanalyse erstmals objektiviert und quantifiziert. Die erfolgreiche Reproduktion der Phänotypen gemäß Debarry *et al.* (Debarry *et al.*, 2007) erlaubte es, das nach Präparation der Mäuse gewonnene Zellmaterial aus der Milz und den bronchialen Lymphknoten zu nutzen, um den protektiven *L. lactis*-Effekt auf den Phänotyp auf molekularer Ebene weiter zu untersuchen.

### 3.2 Einfluss der *L. lactis* Exposition auf die Zytokinproduktion und –expression in mononukleären Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz

Th2-Zellen mit ihren Effektorzytokinen spielen eine zentrale Rolle im asthmatischen Entzündungsgeschehen (IL-4: Differenzierung zu Th2-Zellen, IL-5: Eosinophilendifferenzierung, IL-13: bronchiale Hyperreagibilität). Th1-Zellen sezernieren IFN $\gamma$ , das Th2-Effekte supprimieren kann. Treg-Zellen können über IL-10 sowohl Th1- als auch Th2-Effekte reduzieren. Durch Analyse des Zytokinprofils von *in vitro* stimulierten mononukleären Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz sollten Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus von *L. lactis* gewonnen werden. Dabei wurden die Lymphknoten zur Analyse des lokalen Entzündungsgeschehens untersucht. Dorthin erfolgt charakteristischerweise die Einwanderung der antigenpräsentierenden Zellen mit nachfolgender T-Zell-Aktivierung. Anhand der Daten aus der Milz, dem zentralen Reservoir immunkompetenter Zellen, sollten systemische

Effekte aufgedeckt werden. Es wurde die Zytokinexpression (mRNA-Konzentrationen) und die Zytokinproduktion (Proteinkonzentrationen) bestimmt.

### **3.2.1 mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in mononukleären Zellen bronchialer Lymphknoten**

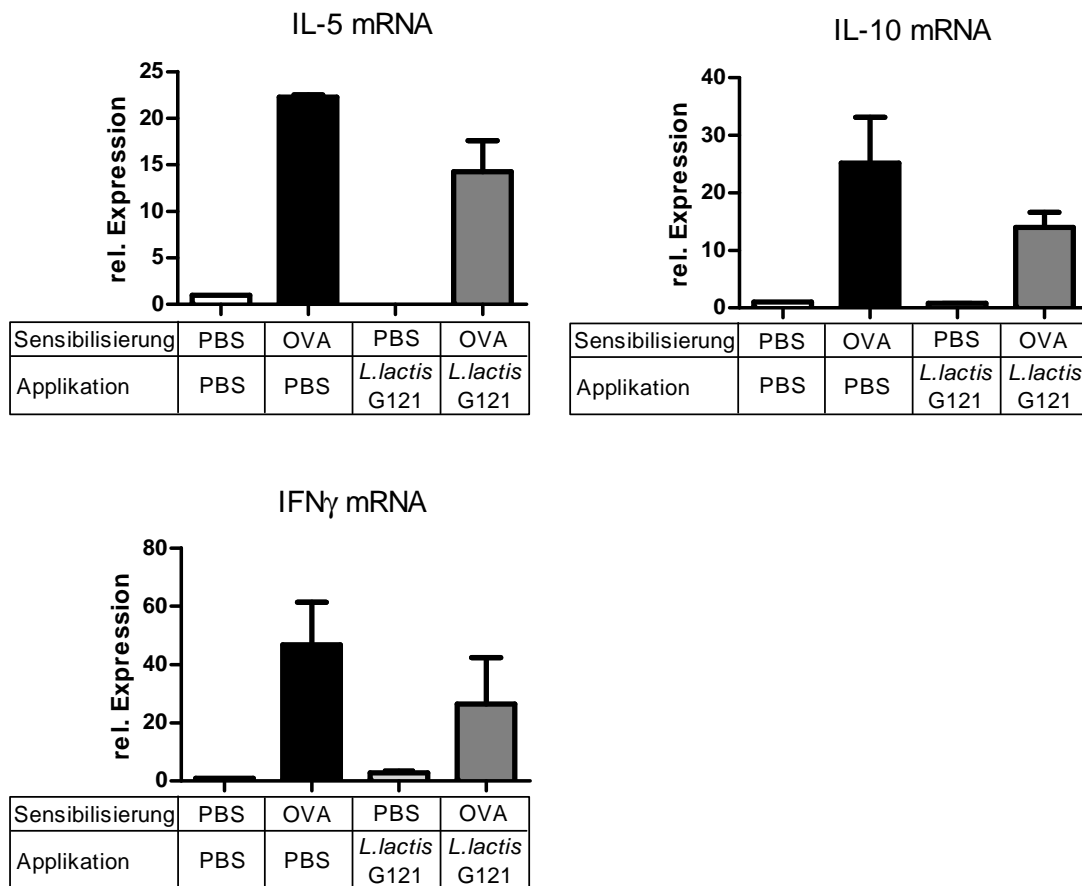
In mononukleären Zellen bronchialer Lymphknoten wurden exemplarisch die mRNA-Konzentrationen von IL-5 (Th2), IFN $\gamma$  (Th1) und IL-10 (Treg) bestimmt. Die mRNA-Expression ist im Folgenden jeweils relativ zur Negativkontrollgruppe angegeben.

In den PBS-pseudosensibilisierten Gruppen (PBS/PBS und *L. lactis*/PBS) fanden sich für alle Zytokine sehr geringe mRNA-Konzentrationen, die am ehesten als Konzentrations-Ausgangsniveau zu betrachten sind, da in PBS-pseudosensibilisierten Tieren nach OVA-spezifischer Stimulation keine Steigerung der Zytokinexpression zu erwarten ist.

Die OVA-Sensibilisierung führte zu einem 22fachen Anstieg der IL-5-mRNA-Expression ( $22,25 \pm 0,25$ ). In *L. lactis*/PBS-Tieren konnte keine IL-5-mRNA nachgewiesen werden. In *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Mäusen ließ sich eine IL-5mRNA-Konzentration von  $14,24 \pm 3,33$  relativ zur Negativkontrollgruppe detektieren. Damit unterschied sich die *L. lactis*/OVA-Gruppe nicht signifikant von der PBS/OVA-Gruppe. Es zeigte sich aber eine Tendenz in Richtung niedrigerer IL-5-mRNA-Expression durch *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere.

Bezüglich der IL-10mRNA-Konzentration ergaben sich ähnlich Verhältnisse, doch konnte auch in der PBS/*L. lactis*-Gruppe IL-10-mRNA in niedriger Höhe nachgewiesen werden (mRNA-Expression relativ zur PBS/PBS-Gruppe: PBS/OVA:  $25,11 \pm 8,01$ , *L. lactis*/PBS:  $0,76 \pm 0,13$ , *L. lactis*/OVA:  $13,99 \pm 2,62$ ). Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere reduzierte die IL-10-Expression tendenziell im Vergleich zur Positivkontrollgruppe (PBS/OVA), ohne dass ein Signifikanzniveau erreicht wurde.

Auch die IFN $\gamma$ -Expression spiegelte in etwa die für IL-5-mRNA und IL-10-mRNA beobachtete Konstellation wieder. Relativ zu PBS/PBS-Tieren zeigte sich der stärkste Expressionsanstieg in *in vitro* restimulierten mononukleären Zellen aus PBS/OVA-Tieren ( $46,77 \pm 14,73$ ), der geringste Expressionsanstieg in *L. lactis*/PBS-Tieren ( $2,78 \pm 0,96$ ) und in *L. lactis*/OVA-Tieren ein mittlerer Expressionsanstieg ( $26,44 \pm 15,95$ ). Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Mäuse führte zu keinem signifikanten Unterschied der IFN $\gamma$ -mRNA-Konzentration verglichen mit der Positivkontrollgruppe (→Abb.21).



**Abbildung 21: mRNA-Konzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Lymphknotenzellen**  
 Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Aus bronchialen Lymphknoten wurden mononukleäre Zellen aufgereinigt und 72h *in vitro* mit OVA-(re-) stimuliert. Die RNA wurde isoliert und die relative mRNA-Konzentrationen von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  wurden mittels qPCR durch Abgleich mit dem Haushaltsgen L32 bestimmt. Die Expression ist relativ zur unbehandelten PBS/PBS-Gruppe dargestellt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM.

### 3.2.2 Zytokinproduktion in mononukleären Zellen bronchialer Lymphknoten

Entsprechend der natürlichen Abfolge der Proteinbiosynthese wurden nach Bestimmung der mRNA-Konzentrationen die Proteinkonzentrationen ermittelt.

Mit IL-4 und IL-13 wurden ergänzend zu IL-5 in den bronchialen Lymphknoten die wichtigsten Th2-Zytokine untersucht. In der Gruppe PBS/PBS wurden niedrige Zytokinkonzentrationen gemessen (IL-4:  $5,01 \pm 5,01$  pg/ml, IL-5:  $4,06 \pm 4,06$  pg/ml, IL-13: Wert unterhalb des Detektionslimits (Herstellerangabe) von 9,3 pg/ml), die als

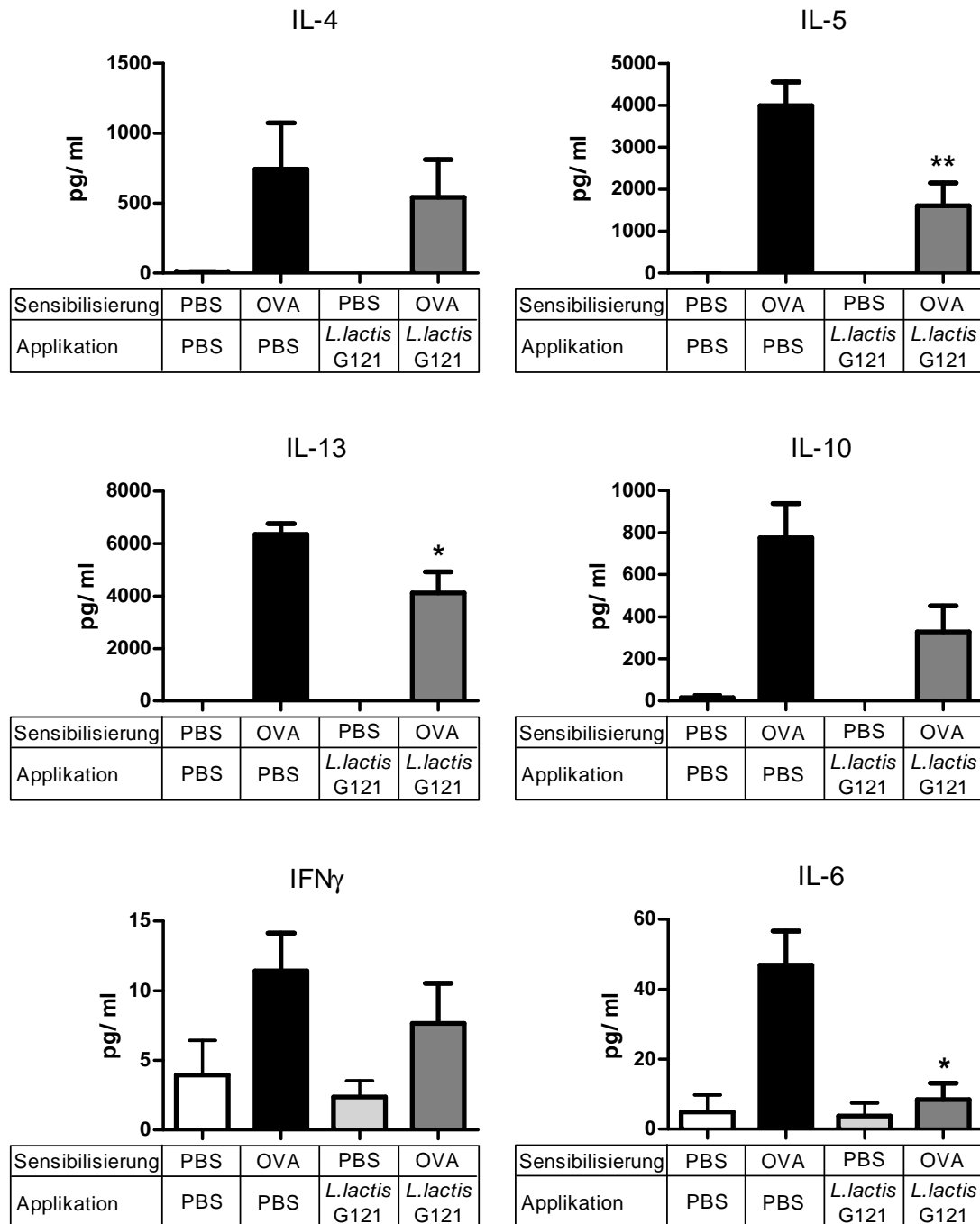
Basiskonzentrationen zu betrachten sind, da in PBS-pseudosensibilisierten Tieren nach OVA-spezifischer Stimulation keine Steigerung der Zytokinexpression zu erwarten ist. Dies gilt für sämtliche gemessene Zytokin-Titer in der PBS/PBS-Gruppe und der *L. lactis*/PBS-Gruppe.

Die höchsten Konzentrationen an Th2-Zytokinen zeigten sich in PBS/OVA-Tieren (IL-4:  $744,6 \pm 329,0$  pg/ml, IL-5:  $3.993 \pm 557,5$  pg/ml, IL13:  $6.351 \pm 410,7$  pg/ml). In *L. lactis*/PBS-Tieren war kein Zytokin-Titer zu detektieren. Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere führte zu einer Reduktion aller Th2-Zytokine verglichen mit der Positivkontrollgruppe (IL-4:  $541,5 \pm 268,8$  pg/ml, IL-5:  $1.603 \pm 548,8$  pg/ml, IL-13:  $4.123 \pm 804,0$  pg/ml). Dabei verminderte sich der IL-5-Titer signifikant ( $p < 0,01$ ) um 59,9%, ebenso wie der IL-13-Titer (Reduktion um 35,1%, Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ).

IL-10 ließ sich in einem einzelnen PBS/PBS-Tier in geringer Konzentration nachweisen ( $101,02$  pg/ml). Die höchsten IL-10-Konzentrationen wurden in den OVA-sensibilisierten Tieren ermittelt ( $774,6 \pm 163,9$  pg/ml). In der *L. lactis*/PBS-Gruppe war kein IL-10 nachweisbar. Durch *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Mäuse verringerte sich die IL-10-Konzentration um 42,4% im Vergleich zur Positivkontrolle auf  $328,1 \pm 123,0$  pg/ml. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Das Th1-Zytokin IFN $\gamma$  erreichte in PBS/PBS-Tieren keine Werte oberhalb des Detektionslimits ( $6,5$  pg/ml). Für OVA/PBS-Tiere betrug die IFN $\gamma$ -Konzentration  $11,42 \pm 2,71$  pg/ml. Sämtliche Werte allein mit *L. lactis* behandelte Tiere (*L. lactis*/PBS) lagen unterhalb des Detektionslimits. Dieses wurde von *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Mäusen nur knapp überschritten ( $7,65 \pm 2,88$  pg/ml) mit dem Resultat einer tendenziell geringfügig niedrigeren IFN $\gamma$ -Konzentration als in der Positivkontrollgruppe.

Des Weiteren wurden die IL-6-Konzentration bestimmt, da IL-6 nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe eine Rolle bei der Übertragung des Asthmaschutzes von Muttertieren auf ihren Nachwuchs nach mikrobieller Stimulation spielt (Conrad et al., 2009). Der IL-6-Titer betrug in der Negativkontrollgruppe  $4,89 \pm 4,89$  pg/ml. Die höchste IL-6-Konzentration konnte bei PBS/OVA-Tieren bestimmt werden ( $46,96 \pm 9,62$  pg/ml), die niedrigste in *L. lactis*/PBS-Tieren ( $3,75 \pm 3,75$  pg/ml). Die Applikation von *L. lactis* an OVA-sensibilisierte Mäuse führte zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) verminderten IL-6-Konzentration ( $8,48 \pm 4,68$  pg/ml) um 82% ( $\rightarrow$  Abb.22).



**Abbildung 22: Zytokinsekretion in OVA-stimulierter mononukleärer Lymphknotenzellen**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Mononukleäre Zellen bronchialer Lymphknoten wurden aufgereinigt und 72h *in vitro* mit OVA (re-) stimuliert. Anschließend wurden die Zytokinkonzentration mit Hilfe des Flowcytomix-Kits am FACS bestimmt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM. Für \* gilt das Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , für \*\*  $p < 0,01$ .

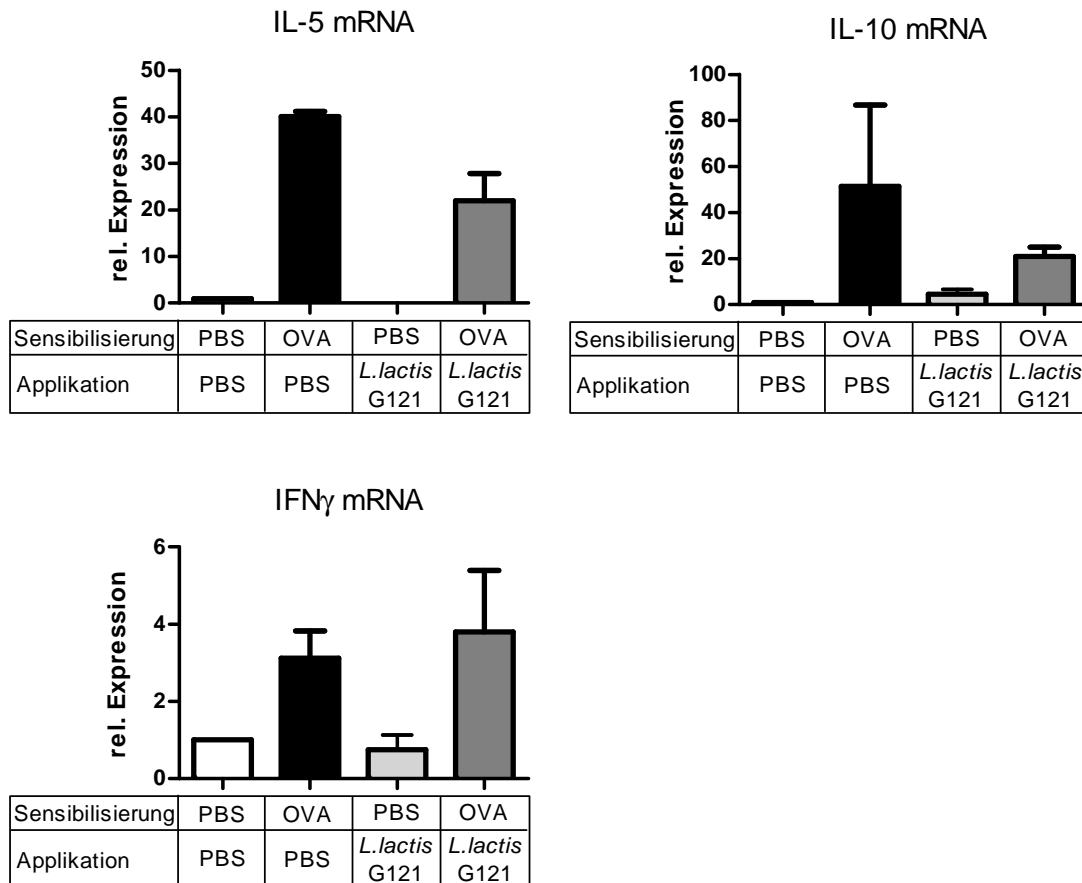
### 3.2.3 mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in mononukleären Zellen der Milz

Analog zur Analyse in den Lymphknoten wurden in mononukleären Zellen der Milz exemplarisch die mRNA-Konzentrationen von IL-5 (Th2-Zytokin), IL-10 (Treg-Zytokin) und IFN $\gamma$  (Th1-Zytokin) bestimmt.

Relativ zur Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) führte die OVA-Sensibilisierung zu einem 40fachen Anstieg der IL-5-mRNA-Expression ( $40,08 \pm 1,07$ ). In *L. lactis*/PBS-Tieren konnte keine IL-5-mRNA nachgewiesen werden. In *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Mäusen ließ sich eine IL-5mRNA-Konzentration von  $22,03 \pm 5,76$  relativ zur Negativkontrollgruppe detektieren. Damit unterschied sich die *L. lactis*/OVA-Gruppe nicht signifikant von der PBS/OVA-Gruppe. Es zeigte sich aber eine Tendenz in Richtung einer niedrigeren IL-5-mRNA-Expression durch *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere.

Bezüglich der IL-10mRNA-Konzentration ergaben sich ähnlich Verhältnisse, doch konnte hier auch in der PBS/*L. lactis*-Gruppe IL-10-mRNA in niedriger Höhe nachgewiesen werden (mRNA-Expression relativ zur PBS/PBS-Gruppe: PBS/OVA:  $51,35 \pm 35,43$ , *L. lactis*/PBS:  $4,56 \pm 2,08$ , *L. lactis*/OVA:  $20,97 \pm 4,03$ ). Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere reduzierte die IL-10-Expression tendenziell im Vergleich zur Positivkontrollgruppe (PBS/OVA), ohne dass ein Signifikanzniveau erreicht wurde.

Für IFN $\gamma$ -mRNA zeigte sich relativ zu den PBS/PBS-Tieren ein Expressionsanstieg in PBS/OVA-Tieren ( $3,12 \pm 0,70$ ). In der *L. lactis*/PBS-Gruppe sank dagegen die relative IFN $\gamma$ -Expression ( $0,75 \pm 0,38$ ). Der höchsten Expressionsanstieg relativ zur Negativkontrollgruppe wurde in *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Tieren gemessen ( $3,80 \pm 1,59$ ). Im Vergleich zur Positivkontrollgruppe unterschied sich dieser Anstieg nicht signifikant ( $\rightarrow$ Abb.23).



**Abbildung 23: mRNA-Konzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Milzzellen**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Aus der Milz wurden mononukleäre Zellen aufgereinigt und 72h *in vitro* mit OVA (re-) stimuliert. RNA wurde isoliert und die relative mRNA-Konzentrationen von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  wurden mittels qPCR durch Abgleich mit dem Haushaltsgen L32 bestimmt. Die Expression ist relativ zur unbehandelten PBS/PBS-Gruppe dargestellt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM.

### 3.2.4 Zytokinproduktion in mononukleären Zellen der Milz

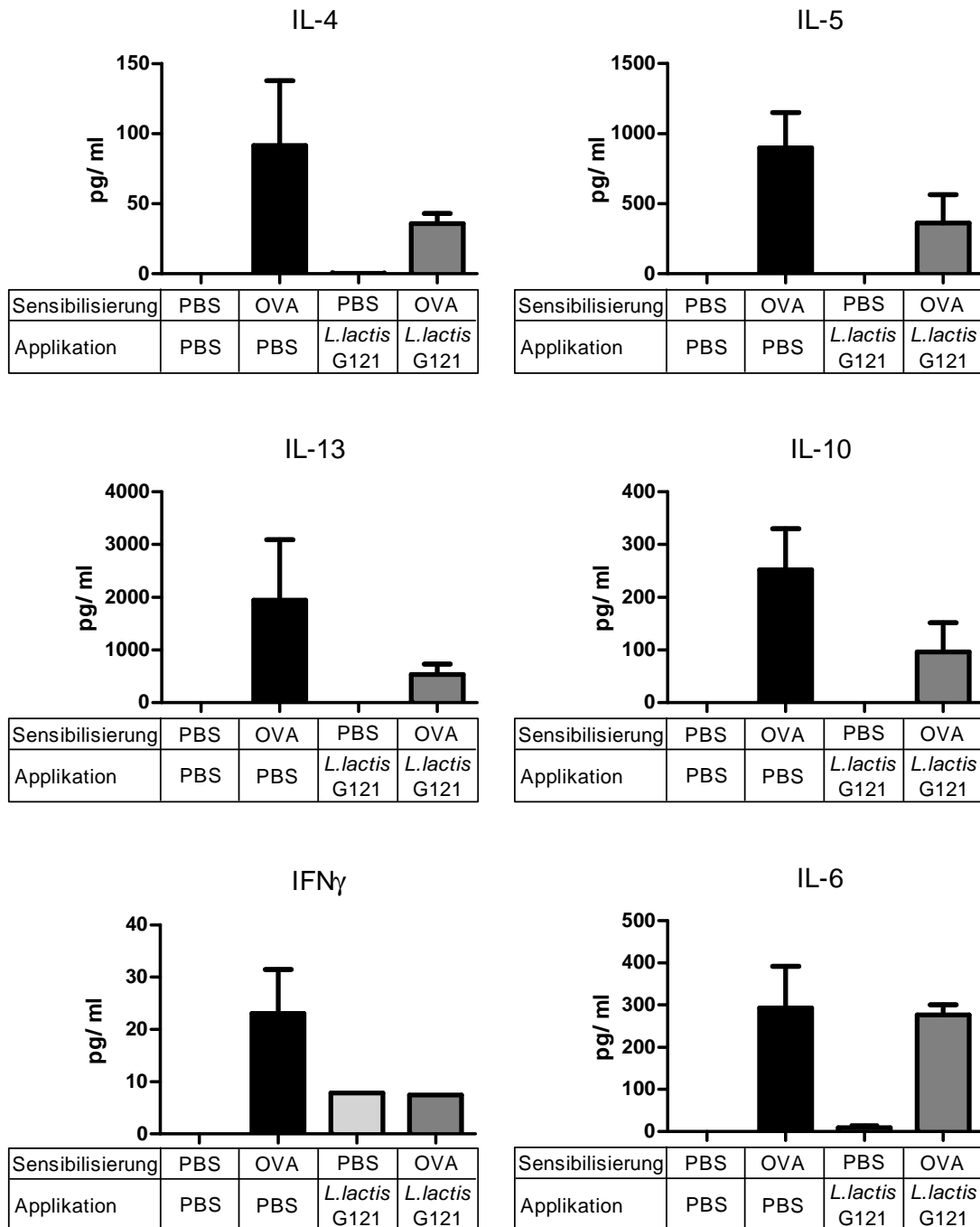
Analog zur Messung in den bronchialen Lymphknoten wurden in der Milz die Konzentrationen der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 erhoben. In der Gruppe PBS/PBS lagen sämtliche Zytokin-Titer unterhalb des Detektionslimits. Die höchsten Konzentrationen an Th2-Zytokinen zeigten sich in PBS/OVA-Tieren (IL-4:  $91,56 \pm 46,07$  pg/ml, IL-5:  $898,9 \pm 250,7$  pg/ml, IL13:  $1.947 \pm 1.139$  pg/ml). Verglichen mit den Lymphknoten-Daten der gleichen Gruppe waren die absoluten Werte für IL-4 um Faktor 8, für IL-5 um Faktor 4 und für IL-13 um Faktor 3 verringert. In *L. lactis*/PBS-Tieren überschritt lediglich die IL-4-Konzentration in einem Versuchstier ( $1,67$  pg/ml) knapp das Detektionslimit von  $0,7$  pg/ml. Die *L. lactis*-Applikation an OVA-

sensibilisierte Tiere führte in der Tendenz zu einer Reduktion aller Th2-Zytokine verglichen mit der Positivkontrollgruppe (IL-4:  $35,84 \pm 7,20$  pg/ml, IL-5:  $363,3 \pm 202,7$  pg/ml, IL-13:  $530,7 \pm 198,4$  pg/ml). Die Unterschiede erreichten jedoch kein Signifikanzniveau. Die Absolutwerte in den *L. lactis*/OVA-Tieren waren verglichen mit den Lymphknoten-Daten der gleichen Gruppe für IL-4 um Faktor 15, für IL-5 um Faktor 4 und für IL-13 um Faktor 8 niedriger.

IL-10 konnte im Überstand von *in vitro* stimulierten mononukleären Zellen aus PBS/PBS-Tieren nicht nachgewiesen werden. Die höchsten Werte konnten in den OVA-sensibilisierten Mäusen (PBS/OVA) verzeichnet werden mit  $251,6 \pm 77,80$  pg/ml. Gegenüber den korrespondierenden Lymphknoten-Daten bedeutete dies eine dreifache Reduktion. In der *L. lactis*/PBS-Gruppe war ebenfalls kein IL-10 detektierbar. Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere führte zu einer tendenziellen, aber nicht signifikanten, Reduktion des IL-10-Titers ( $96,47 \pm 55,30$  pg/ml) verglichen mit der Positivkontrollgruppe. Die Absolutwerte waren um Faktor 3 niedriger im Vergleich zur IL-10-Konzentration in entsprechenden Lymphknoten.

Für IFN $\gamma$  konnten in PBS/PBS-Tieren keine Konzentrations-Werte oberhalb des Detektionslimits ( $6,5$  pg/ml) ermittelt werden. Der höchste IFN $\gamma$ -Titer wurde in OVA/PBS-Tieren mit  $23,07 \pm 8,38$  pg/ml gemessen, was einer Verdopplung im Vergleich zu den Lymphknoten-Daten entspricht. In allein *L. lactis*-behandelten Mäusen lag ein Messwert oberhalb des Detektionslimits für IFN $\gamma$  ( $7,86$  pg/ml). Die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere führte zu keiner signifikanten Reduktion der IFN $\gamma$ -Konzentration verglichen mit der Positivkontrollgruppe, wobei nur ein Wert oberhalb des Detektionslimits gemessen wurde ( $7,44$  pg/ml).

IL-6 konnte in der Negativkontrollgruppe nicht detektiert werden. Die höchste IL-6-Konzentration wurde in OVA-sensibilisierten Mäusen (PBS/OVA) gemessen ( $292,6 \pm 98,98$  pg/ml), die damit um den Faktor 6 höher lag als die korrespondierenden Lymphknoten-Werte. Die niedrigste IL-6-Konzentration wiesen *L. lactis*/PBS-Tiere auf ( $9,34 \pm 5,83$  pg/ml). *L. lactis*-behandelte OVA-sensibilisierte Mäuse zeigten ähnlich hohe IL-6-Titer wie die Positivkontrollgruppe ( $277,0 \pm 23,09$  pg/ml). Die Absolutwerte waren im Vergleich zur IL-6-Konzentration entsprechender Lymphknoten um den Faktor 32 höher ( $\rightarrow$ Abb.24).



**Abbildung 24: Zytokinkonzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Milzzellen**

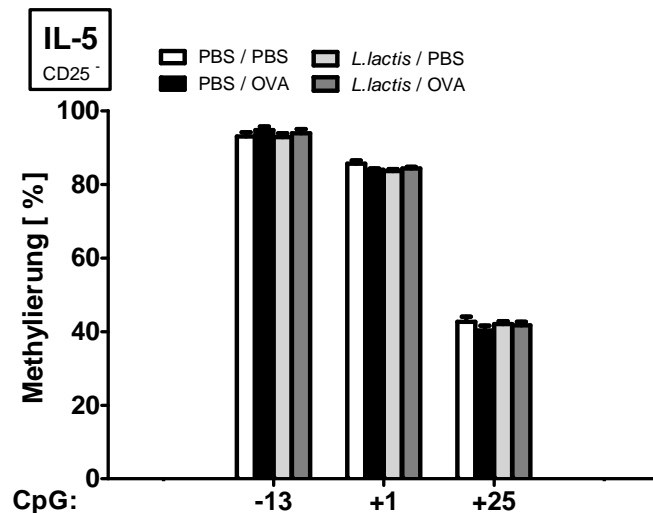
Weibliche BALB/c Mäuse wurden intranasal mit *L. lactis* oder PBS (Kontrolle) behandelt, gegen Ovalbumin (OVA) oder PBS (Kontrolle) sensibilisiert und anschließend einem OVA-haltigen Aerosol ausgesetzt (Challenge). Mononukleäre Zellen wurden aus der Milz aufgereinigt und *in vitro* 72h mit OVA (re-) stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mit Hilfe des Flowcytomix-Kits am FACS bestimmt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM. Für \* gilt das Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### **3.3 Einfluss der Behandlung mit *L. lactis* auf den DNA-Methylierungsstatus von IL-5, IL-10 und des IFN $\gamma$ -Promotors**

Es wurde gezeigt, dass die i.n. Applikation von *L. lactis* sowohl den asthmatischen Phänotyp als auch die Zytokinproduktion von mononukleären Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz beeinflusst. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Modulation der Zytokinexpression mit epigenetischen Veränderungen assoziiert ist. Hierzu wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz aufgereinigt und der Methylierungsgrad von Promotorregionen ausgewählter Zytokine mittels Bisulfitbehandlung und Pyrosequenzierung bestimmt.

#### **3.3.1 Promotor-Methylierung von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ in T-Zellen bronchialer Lymphknoten**

Im IL-5 Promotor wurde die Methylierung von den drei CpG Positionen -13, +1 und +25 (Position relativ zum Transkriptionsstart, NM\_010558) analysiert. Die Auswahl der untersuchten CpG-Positionen erfolgte aufgrund ihrer Nähe zum Transkriptionsstart, da zum Versuchszeitpunkt keine Methylierungsanalysen des IL-5-Promotors mittels Pyrosequenzierung unter Angabe relevanter CpG-Positionen veröffentlicht waren. Der mittlere Methylierungsgrad in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen aus bronchialen Lymphknoten von PBS/PBS-Tieren lag bei 93,00  $\pm$  1,11% (Position -13), 85,61  $\pm$  0,85% (Position +1) und 42,69  $\pm$  1,33% (Position +25). Die Sensibilisierung der Tiere gegenüber OVA bewirkte keine signifikante Veränderung der Methylierung in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen (Position -13: 92,86  $\pm$  0,98%, Position +1: 84,34  $\pm$  0,34, Position +25: 42,69  $\pm$  1,34), ebenso wie die Exposition gegenüber *L. lactis* alleine (Position -13: 94,69  $\pm$  1,02%, Position +1: 83,96  $\pm$  0,34%, Position +25: 40,34  $\pm$  1,22%) oder in Kombination mit einer OVA-Sensibilisierung (Position -13: 93,83  $\pm$  1,19%, Position +1: 84,34  $\pm$  0,34%, Position +25: 41,67  $\pm$  1,03%) ( $\rightarrow$ Abb.25).



**Abbildung 25: Methylierung der proximalen Promotoren von IL-5 in T-Zellen bronchialer Lymphknoten**

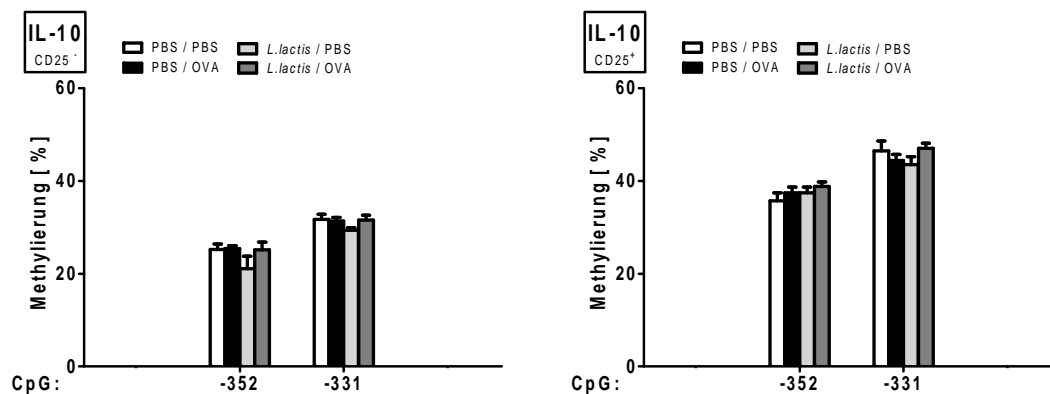
Aus bronchialen Lymphknoten wurden mononukleäre Zellen aufgereinigt und  $CD4^+CD25^-$ -Zellen isoliert. Nach Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation wurde der Methylierungsstatus mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die Position der CpGs ist angegeben in Bezug auf den Transkriptionsstart von IL-5 (NM\_010558). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM.

Für IL-10 wurde die Methylierung der CpG-Positionen -352 und -351 (Position relativ zum Transkriptionsstart, NM\_010548) in  $CD4^+CD25^-$  Zellen und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen isoliert aus bronchialen Lymphknoten untersucht. Die CpG-Positionen wurden, ebenso wie für IL-5, aufgrund ihrer Nähe zum Transkriptionsstart ausgewählt.

In  $CD4^+CD25^-$  Zellen von PBS/PBS-Tieren lag der mittlere Methylierungsgrad bei  $25,25 \pm 1,16\%$  (Position -352) und  $31,69 \pm 1,12\%$  (Position -331). Keine signifikante Veränderung der Methylierung ergab sich in PBS/OVA-Tieren (Position -352:  $21,08 \pm 2,68\%$ , Position -331:  $29,34 \pm 0,60\%$ ). Auch die Exposition gegenüber *L. lactis* von PBS-pseudosensibilisierten Tieren (Position -352:  $25,45 \pm 0,61\%$ , Position -331:  $31,35 \pm 0,74\%$ ) oder von OVA-sensibilisierten Tieren (Position -352:  $25,14 \pm 1,65\%$ , Position -331:  $31,54 \pm 1,06\%$ ) resultierte nicht in signifikanten Unterschieden des Methylierungsgrades.

In  $CD4^+CD25^+$ -Zellen wurde bei Tieren der Negativkontrollgruppe (PBS/PBS) eine mittlere Methylierung des IL-10 Promotors von  $35,70 \pm 1,75\%$  (Position -352) und  $46,50 \pm 2,16\%$  (Position -331) ermittelt. Weder in der Positivkontrollgruppe (Position -352:  $37,44 \pm 1,27\%$ , Position -331:  $43,52 \pm 1,68\%$ ) noch in der Gruppe *L. lactis*/PBS (Position -352:  $37,43 \pm 1,28\%$ , Position -331:  $44,42 \pm 1,30\%$ ) oder der Gruppe *L. lactis*/OVA (Position -352:  $38,81 \pm 0,95\%$ , Position -331:  $47,06 \pm 1,06\%$ ) zeigte sich

ein signifikanter Unterschied des mittleren Methylierungsgrades verglichen mit den PBS/PBS-Tieren (→Abb.23).



**Abbildung 26: Methylierung der proximalen Promotoren von IL-10 in T-Zellen bronchialer Lymphknoten**

Aus bronchialen Lymphknoten wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen sowie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen isoliert. Nach Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation wurde der Methylierungsstatus mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die Position der CpGs ist angegeben in Bezug auf den Transkriptionsstart von IL-10 (NM\_010548). Das Diagramm zeigt Mittelwerte ±SEM.

Im proximalen IFN $\gamma$ -Promotor wurden die CpG-Positionen -212, -198, -178, -59, -50 und -39 (Position relativ zum Transkriptionsstart, NM\_008337) hinsichtlich ihrer Methylierung untersucht. Veränderungen der Methylierungsstadi dieser CpG-Positionen im Rahmen der T-Zell-Differenzierung konnten *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Jones and Chen, 2006).

In CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen lag in PBS/PBS-Tieren die mittlere Methylierung zwischen  $8,18 \pm 0,87\%$  (Position -178) und  $16,37 \pm 1,52\%$  (Position -59). Eine Sensibilisierung gegenüber OVA bewirkte eine signifikant höhere Methylierung an den Positionen -212 um 87% auf  $20,27 \pm 2,90\%$  ( $p < 0,05$ ), -178 um 88% auf  $15,37 \pm 2,37\%$  ( $p < 0,05$ ), -59 um 79% auf  $29,37 \pm 3,81\%$  ( $p < 0,01$ ) und -50 um 93% auf  $19,62 \pm 3,00\%$  ( $p < 0,05$ ).

In allein *L. lactis* exponierten Mäusen bewegte sich die mittlere Methylierung zwischen  $12,96 \pm 1,32\%$  (Position -178) und  $19,66 \pm 1,05\%$  (Position -59). Verglichen mit der Negativkontrollgruppe zeigten sich tendenziell höhere Methylierungsgrade, die an Position -198 ( $14,84 \pm 1,57\%$ ) mit einer Erhöhung um 47% und Position -178 mit einer Erhöhung um 59% signifikant ( $p < 0,05$ ) ausfielen.

Lediglich in der Gruppe *L. lactis*/OVA wurde eine signifikant höhere Methylierung an allen Positionen beobachtet, verglichen mit der Negativkontrollgruppe: an Position -212 um 146% auf  $26,70 \pm 4,89\%$  ( $p < 0,05$ ), an Position -198 um 115% auf  $21,75 \pm 3,14\%$

( $p < 0,01$ ), an Position -178 um 140% auf  $19,68 \pm 2,84\%$  ( $p < 0,01$ ), an Position -59 um 82% auf  $29,84 \pm 3,89\%$  ( $p < 0,01$ ), an Position -50 um 168% auf  $27,28 \pm 4,52\%$  ( $p < 0,01$ ) und an Position -39 um 106%  $28,23 \pm 4,11\%$  ( $p < 0,01$ ). Somit zeigten sich in dieser Versuchsgruppe die deutlichsten Anstiege in der Methylierung. Verglichen mit der Gruppe *L. lactis*/PBS zeigten sich signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ) höhere Methylierungen an Position -212 um 78%, an Position -178 und Position -59 um 52%, an Position -50 um 94% und an Position -39 um 71%. Dagegen führte die *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere zu keiner signifikanten Veränderung der Methylierung verglichen mit der Positivkontrollgruppe (PBS/OVA), wenngleich in der Tendenz jeweils eine höhere Methylierung in *L. lactis*/OVA-Tieren vorzufinden war.

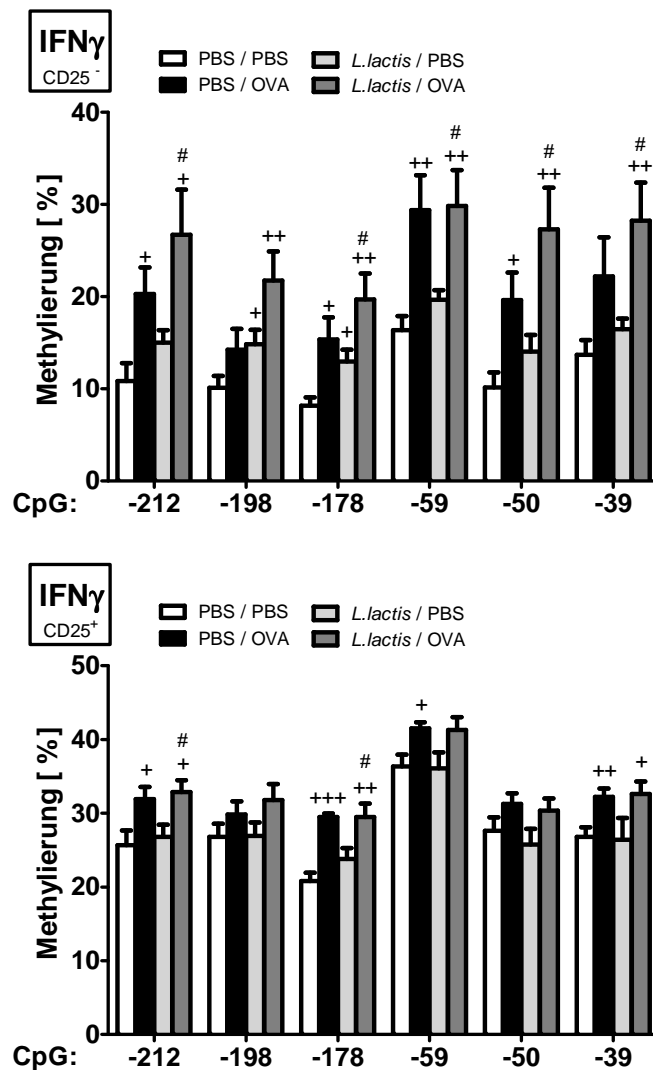
Zusammenfassend zeigte sich in  $CD4^+CD25^-$  Zellen, aufgereinigt aus bronchialen Lymphknoten, der stärkste Einfluss auf die Methylierung des proximalen  $IFN\gamma$ -Promotors durch den Vorgang der OVA-Sensibilisierung (signifikant höhere Methylierung an 4 Positionen beim Vergleich der Gruppen PBS/PBS und PBS/OVA, signifikant höhere Methylierung an 5 Positionen beim Vergleich der Gruppen *L. lactis*/PBS und *L. lactis*/OVA). Die i.n. *L. lactis*-Applikation veränderte die Methylierung dagegen weniger (signifikant höhere Methylierung an 2 Positionen beim Vergleich der Gruppen PBS/PBS und *L. lactis*/PBS, keine signifikanten Unterschiede der Methylierung beim Vergleich der Gruppen PBS/OVA und *L. lactis*/OVA) ( $\rightarrow$ Abb.27).

In  $CD4^+CD25^+$ -Zellen zeigten sich für die Methylierung des proximalen  $IFN\gamma$ -Promotors ähnliche Verhältnisse wie bei den  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, doch waren die Effekte insgesamt geringer ausgeprägt. Bei einer mittleren Methylierung zwischen  $20,81 \pm 1,14\%$  (Position -178) und  $36,36 \pm 1,57\%$  (Position -59) in PBS/PBS-Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme des Methylierungsgrades durch OVA-Sensibilisierung an 4 Positionen: an Position -212 um 24% auf  $31,90 \pm 1,65\%$  ( $p < 0,05$ ), an Position -178 um 42% auf  $29,46 \pm 0,51\%$  ( $p < 0,001$ ), an Position -59 um 14% auf  $41,49 \pm 0,84\%$  ( $p < 0,05$ ) und an Position -39 um 42% auf  $32,23 \pm 1,11\%$  ( $p < 0,01$ ).

Die alleinige *L. lactis* Exposition führte zu keiner signifikanten Veränderung der Methylierung im Vergleich zur Negativkontrollgruppe bei mittleren Methylierungen zwischen  $23,79 \pm 1,48\%$  (Position -178) und  $36,10 \pm 2,12\%$  (Position -59).

In der Gruppe *L. lactis*/OVA fand sich eine signifikant höhere Methylierung an drei Positionen verglichen mit der Negativkontrollgruppe (Position -212 um 28% auf  $32,86 \pm 1,64\%$  ( $p < 0,05$ ), Position -178 um 42% auf  $29,48 \pm 1,84\%$  ( $p < 0,01$ ), Position

-39 um 22% auf  $32,61 \pm 1,69\%$  ( $p < 0,05$ )) sowie an zwei Positionen verglichen mit der *L. lactis*/PBS-Gruppe (Position -212 um 23 % auf  $32,86 \pm 1,64\%$  ( $p < 0,05$ ), Position -178 um 24% auf  $29,48 \pm 1,84\%$  ( $p < 0,05$ )). Zwischen den Gruppen *L. lactis*/OVA und PBS/OVA fanden sich keine signifikanten Differenzen des Methylierungsgrades ( $\rightarrow$ Abb.27).



**Abbildung 27: Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors in T-Zellen bronchialer Lymphknoten**

Aus bronchialen Lymphknoten wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen isoliert. Nach Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation wurde der Methylierungsstatus mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die Position der CpGs ist angegeben im Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM. „+“ =  $p < 0,05$  und „++“ =  $p < 0,01$  im Vergleich zur unsensibilisierten und unbehandelten Gruppe (PBS/PBS), „#“ =  $p < 0,05$  im Vergleich zur unsensibilisierten und *L. lactis* exponierten Gruppe (PBS/*L. lactis*).

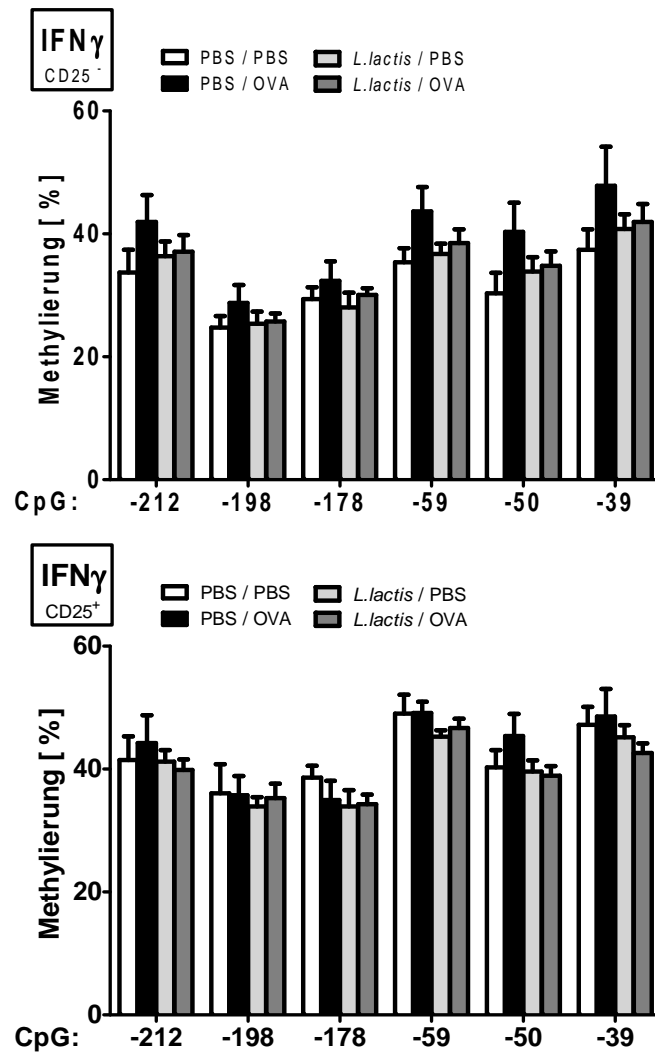
### 3.3.2 Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors in T-Zellen der Milz

In CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen der Milz wurde die DNA-Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors analog zu den Lymphknoten an den CpG-Positionen -212, -198, -178, -59, -50 und -39 untersucht (Position relativ zum Transkriptionsstart, NM\_008337).

In PBS/PBS-Tieren lag die mittlere Methylierung zwischen  $24,77 \pm 1,83\%$  (Position -198) und  $37,39 \pm 3,36\%$  (Position -39).

Die Sensibilisierung der Tiere gegen OVA bewirkte keine signifikante Veränderung der Methylierung in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen (mittlere Methylierung zwischen  $28,77 \pm 2,92\%$  (Position -198) und  $47,83 \pm 6,32\%$  (Position -39), ebenso wie die Exposition zu *L. lactis* alleine (mittlere Methylierung zwischen  $25,38 \pm 1,94\%$  (Position -198) und  $40,81 \pm 2,35\%$  (Position -39)) oder in Kombination mit einer OVA-Sensibilisierung (mittlere Methylierung zwischen  $25,75 \pm 1,28\%$  (Position -198) und  $41,94 \pm 2,93\%$  (Position -39)). Dennoch zeigte sich in der Tendenz in allen Positionen stets die stärkste Methylierung in der Gruppe PBS/OVA, gefolgt von der Gruppe *L. lactis*/OVA, die immer höhere Methylierungsgrade aufwies als die Gruppen der PBS-pseudosensibilisierten Tiere (Gruppe PBS/PBS und Gruppe *L. lactis*/PBS) ( $\rightarrow$  Abb.25).

In der Zellpopulationen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich in der Gruppe PBS/PBS der niedrigste Methylierungsgrad an Position -198 mit  $36,04 \pm 4,73\%$ , der höchste an Position -59 mit  $49,03 \pm 3,08\%$ . Tiere der Positivkontrollgruppe wichen an keiner Position signifikant davon ab bei mittleren Methylierungen zwischen  $34,95 \pm 3,11\%$  (Position -178) und  $49,12 \pm 1,86\%$  (Position -59). Gleichmaßen führte die alleinige *L. lactis*-Applikation (Methylierungen zwischen  $33,91 \pm 1,50\%$  (Position -198) und  $45,28 \pm 1,03\%$  (Position -59)) sowie die Verbindung einer *L. lactis*-Applikation mit einer OVA-Sensibilisierung (Methylierungen zwischen  $34,29 \pm 1,59\%$  (Position -178) und  $46,65 \pm 1,53\%$  (Position -59)) zu keinen signifikanten Veränderungen der Methylierung ( $\rightarrow$  Abb.28).



**Abbildung 28: DNA-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors in T-Zellen der Milz**

Aus der Milz wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- sowie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aufgereinigt. Nach Bisulfidbehandlung und PCR-Amplifikation wurde der Methylierungsstatus von sechs CpGs des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die Position der CpGs ist angegeben in Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM.

### 3.3.3 Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors zwischen CD25<sup>-</sup>-Zellen und CD25<sup>+</sup>-Zellen

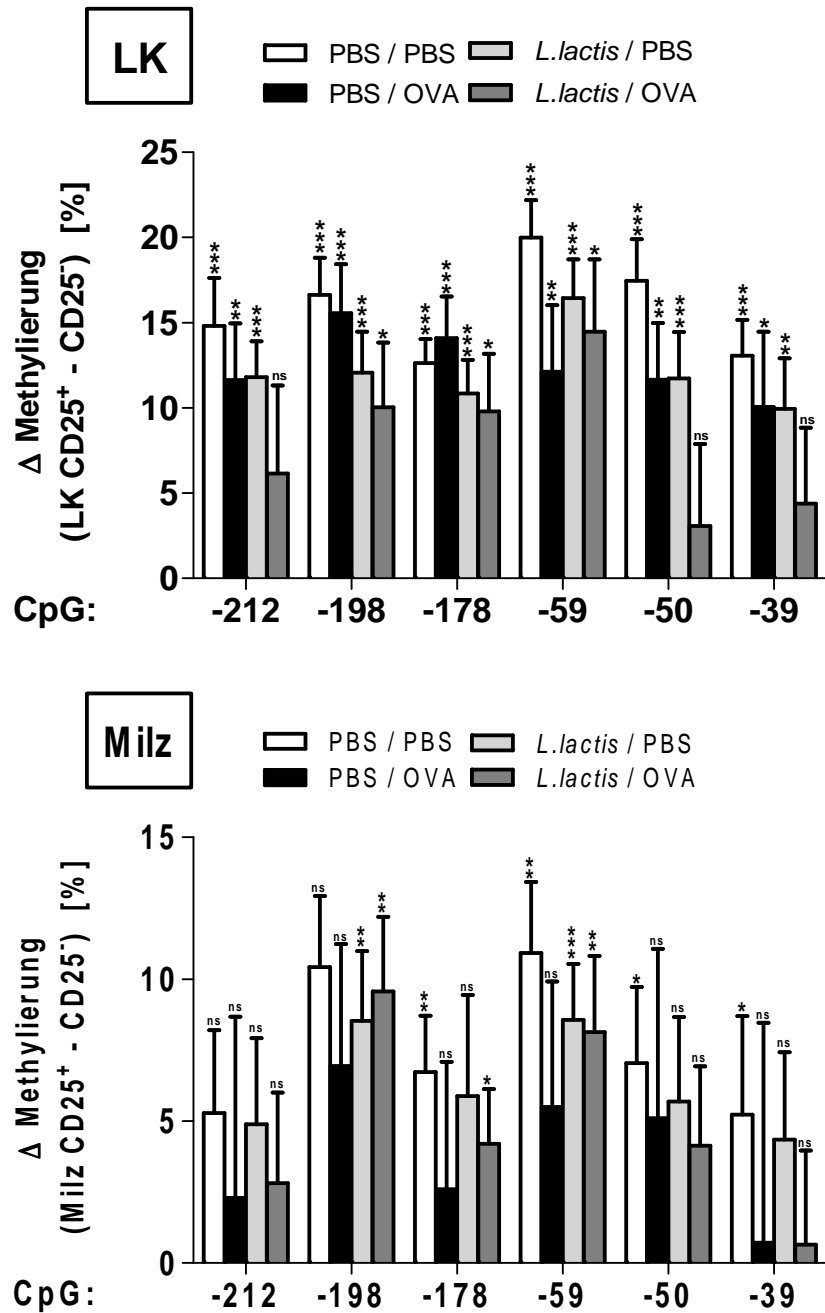
Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Veränderungen zeigte sich in bronchialen Lymphknoten und der Milz eine stärkere Grund-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen als in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen an allen untersuchten CpGs. Dieser Effekt war unabhängig von der Versuchsgruppe vorhanden, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. In Tabelle 5 sind die Differenz der Methylierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen für jede Experimentalgruppe und CpG-Position zusammengefasst sowie das erreichte Signifikanzniveau angegeben.

Die größte Differenz wurde an der Position -59 in bronchialen Lymphknoten von PBS/PBS-Tieren ermittelt. Hier fand sich in CD25<sup>+</sup>-Zellen eine um  $19,99 \pm 2,19$  % höhere Methylierung als in CD25<sup>-</sup>-Zellen ( $p < 0,001$ ). Die niedrigste Methylierungsdifferenz zwischen CD25<sup>+</sup>-Zellen und CD25<sup>-</sup>-Zellen lag in der Milz von *L. lactis*/OVA-Tieren vor ( $0,65 \pm 3,32$  %, Unterschied nicht signifikant). Insgesamt zeigten sich häufiger und deutlicher Unterschiede in Lymphknoten (durchschnittliche Methylierungsdifferenz: 12%, signifikante Unterschiede an 21 Positionen) als in der Milz (durchschnittliche Methylierungsdifferenz: 6%, signifikante Unterschiede an 9 Positionen) sowie in PBS-pseudosensibilisierten Tieren (durchschnittliche Methylierungsdifferenz: 11%, signifikante Unterschiede an 18 Positionen) im Vergleich zu OVA-sensibilisierten Tieren (durchschnittliche Methylierungsdifferenz: 7%, signifikante Unterschiede an 12 Positionen) ( $\rightarrow$  Abb.29).

**Tabelle 5: Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors zwischen CD25<sup>-</sup>-Zellen und CD25<sup>+</sup>-Zellen**

Angegeben ist die Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten CD25<sup>+</sup>-Zellen und den schwächer methylierten CD25<sup>-</sup>-Zellen in Lymphknoten sowie in der Milz. Die Position der CpGs ist angegeben in Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). LK: Lymphknoten, \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , ns - nicht signifikant

Organ und CpG-Position	PBS/PBS ( $\Delta$ Cd25 <sup>+</sup> - Cd25 <sup>-</sup> )	OVA/PBS ( $\Delta$ Cd25 <sup>+</sup> - Cd25 <sup>-</sup> )	<i>L. lactis</i> /PBS ( $\Delta$ Cd25 <sup>+</sup> - Cd25 <sup>-</sup> )	<i>L. lactis</i> /OVA ( $\Delta$ Cd25 <sup>+</sup> - Cd25 <sup>-</sup> )
LK (-212)	$14,80 \pm 2,83$ % ***	$11,63 \pm 3,34$ % **	$11,80 \pm 2,11$ % ***	$6,16 \pm 5,16$ % ns
LK (-198)	$16,64 \pm 2,16$ % ***	$15,55 \pm 2,88$ % ***	$11,80 \pm 2,11$ % ***	$10,05 \pm 3,79$ % *
LK (-178)	$12,63 \pm 1,41$ % ***	$14,09 \pm 2,43$ % ***	$10,84 \pm 1,97$ % ***	$9,80 \pm 3,39$ % *
LK (-59)	$19,99 \pm 2,19$ % ***	$12,12 \pm 3,91$ % **	$16,44 \pm 2,27$ % ***	$11,47 \pm 4,25$ % *
LK (-50)	$17,46 \pm 2,42$ % ***	$11,65 \pm 3,32$ % **	$11,72 \pm 2,73$ % ***	$3,07 \pm 4,81$ % ns
LK (-39)	$13,07 \pm 2,10$ % ***	$10,06 \pm 4,42$ % *	$9,94 \pm 2,97$ % **	$4,38 \pm 4,45$ % ns
Milz (-212)	$7,75 \pm 5,39$ % ns	$2,29 \pm 6,38$ % ns	$4,88 \pm 3,05$ % ns	$2,80 \pm 3,20$ % ns
Milz (-198)	$11,27 \pm 5,41$ % ns	$6,94 \pm 4,30$ % ns	$8,53 \pm 2,45$ % **	$9,56 \pm 2,63$ % **
Milz (-178)	$9,23 \pm 2,74$ % **	$2,59 \pm 4,48$ % ns	$5,88 \pm 3,56$ % ns	$4,20 \pm 1,92$ % *
Milz (-59)	$13,69 \pm 3,87$ % **	$5,49 \pm 4,42$ % ns	$8,56 \pm 1,98$ % ***	$8,14 \pm 2,68$ % **
Milz (-50)	$9,93 \pm 4,33$ % *	$5,09 \pm 5,97$ % ns	$5,68 \pm 2,98$ % ns	$4,13 \pm 2,79$ % ns
Milz (-39)	$9,78 \pm 4,45$ % *	$0,71 \pm 7,75$ % ns	$4,34 \pm 3,07$ % ns	$0,65 \pm 3,32$ % ns



**Abbildung 29: Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten CD25<sup>+</sup>-Zellen und den schwächer methylierten CD25<sup>-</sup>-Zellen in Lymphknoten sowie in der Milz.**

Die Position der CpGs ist angegeben in Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). LK: Lymphknoten, \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05, ns - nicht signifikant

### 3.3.4 Vergleich der Grund-Methylierung des $IFN\gamma$ -Promotors zwischen $CD4^+$ Zellen aus bronchialen Lymphknoten und $CD4^+$ Zellen aus der Milz

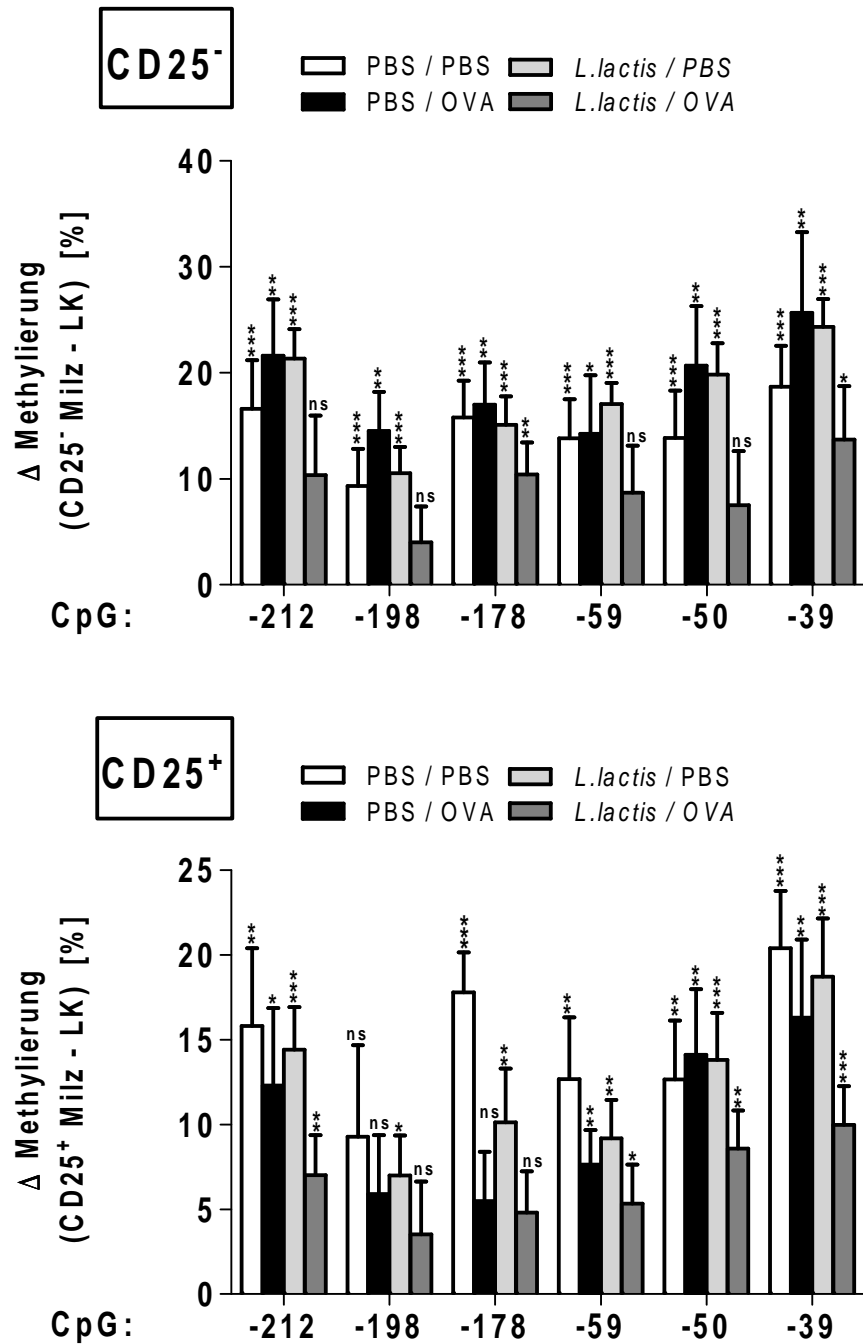
Unabhängig von der *L. lactis*-Exposition, der Versuchsgruppe und der T-Zell-Subpopulation zeigte sich, dass in T-Zellen der Milz an allen CpGs eine höhere Methylierung des proximalen  $IFN\gamma$  Promotors vorliegt als in bronchialen Lymphknoten. Abhängig von der Versuchsgruppe und der untersuchten T-Zell-Subpopulationen fiel die Differenz der Grund-Methylierung zwischen Milz und Lymphknoten jedoch unterschiedlich aus. Eine detaillierte Übersicht der Methylierungsunterschiede und Signifikanzniveaus für alle Experimentalgruppen und CpG-Positionen ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Mit Ausnahme von acht Fällen (Position -198 und -178 in  $CD25^+$ -Zellen der Gruppe OVA/PBS sowie Position -212, -198, -59, -50 in  $CD25^-$ -Zellen und Positionen -198 und -178 in  $CD25^+$ -Zellen der Gruppe *L. lactis*/OVA) waren alle Methylierungsdifferenzen signifikant. Der größte Unterschied der Methylierung zwischen Milz- und Lymphknotenzellen lag in  $CD25^-$ -Zellen von PBS/OVA-Tieren an Position -39 vor ( $25,66 \pm 7,63$  %,  $p < 0,01$ ). Der geringste Unterschied fand sich in *L. lactis*/OVA-Tieren an der Position -198 ( $3,51 \pm 3,14$  %, Differenz nicht signifikant). Insgesamt zeigten sich größere und häufiger signifikante Differenzen in PBS-pseudosensibilisierten Versuchsgruppen (durchschnittliche Differenz 16%, signifikant an 23 Positionen) als in den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen (durchschnittliche Differenz 11%, signifikant an 16 Positionen). Ebenso waren die Unterschiede in  $CD25^-$ -Zellen (durchschnittliche Differenz 17%) deutlicher als in  $CD25^+$ -Zellen (durchschnittliche Differenz: 11%) ( $\rightarrow$ Abb.30).

**Tabelle 6: Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN $\gamma$ -Promotors zwischen CD4<sup>+</sup>Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz**

Dargestellt ist die Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten T-Zellen in der Milz und den schwächer methylierten T-Zellen bronchialer Lymphknoten. Angegeben ist die untersuchte T-Zell-Subpopulation (CD25<sup>+</sup>-Zellen, CD25<sup>-</sup>-Zellen) sowie die Position der CpGs in Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). LK: Lymphknoten, \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05, ns - nicht signifikant .

<b>T-Zell-Supopulation und CpG-Position</b>	<b>PBS/PBS (<math>\Delta</math> Milz - LK)</b>	<b>PBS/OVA (<math>\Delta</math> Milz - LK)</b>	<b><i>L. lactis</i>/PBS (<math>\Delta</math> Milz - LK)</b>	<b><i>L. lactis</i>/OVA (<math>\Delta</math> Milz - LK)</b>
<b>CD25<sup>-</sup> (-212)</b>	22,86 $\pm$ 4,01 % ***	21,64 $\pm$ 5,29 % **	21,34 $\pm$ 2,78 % ***	10,37 $\pm$ 5,60 % ns
<b>CD25<sup>-</sup> (-198)</b>	14,65 $\pm$ 2,19 % ***	14,50 $\pm$ 3,69 % **	10,54 $\pm$ 2,49 % ***	4,00 $\pm$ 3,39 % ns
<b>CD25<sup>-</sup> (-178)</b>	21,20 $\pm$ 2,02 % ***	16,99 $\pm$ 3,97 % **	15,08 $\pm$ 2,70 % ***	10,41 $\pm$ 3,04 % **
<b>CD25<sup>-</sup> (-59)</b>	18,97 $\pm$ 2,79 % ***	14,26 $\pm$ 5,53 % *	17,06 $\pm$ 1,99 % ***	8,68 $\pm$ 4,47 % ns
<b>CD25<sup>-</sup> (-50)</b>	20,19 $\pm$ 3,67 % ***	20,67 $\pm$ 5,63 % **	19,85 $\pm$ 2,95 % ***	7,53 $\pm$ 5,09 % ns
<b>CD25<sup>-</sup> (-39))</b>	23,69 $\pm$ 3,72 % ***	25,66 $\pm$ 7,63 % **	24,33 $\pm$ 2,61 % ***	13,71 $\pm$ 5,05 % *
<b>CD25<sup>+</sup> (-212)</b>	15,81 $\pm$ 4,57 % **	12,31 $\pm$ 4,56 % *	14,42 $\pm$ 2,49 % ***	7,02 $\pm$ 2,35 % **
<b>CD25<sup>+</sup> (-198)</b>	9,28 $\pm$ 5,40 % ns	5,89 $\pm$ 3,49 % ns	6,99 $\pm$ 2,35 % *	3,51 $\pm$ 3,14 % ns
<b>CD25<sup>+</sup> (-178)</b>	17,80 $\pm$ 2,34 % ***	5,49 $\pm$ 2,91 % ns	10,13 $\pm$ 3,17 % **	4,82 $\pm$ 2,43 % ns
<b>CD25<sup>+</sup> (-59)</b>	12,68 $\pm$ 3,65 % **	7,63 $\pm$ 2,04 % **	9,18 $\pm$ 2,26 % **	5,34 $\pm$ 2,30 % *
<b>CD25<sup>+</sup> (-50)</b>	12,66 $\pm$ 3,48 % **	14,11 $\pm$ 3,87 % **	13,81 $\pm$ 2,77 % ***	8,59 $\pm$ 2,24 % **
<b>CD25<sup>+</sup> (-39))</b>	20,39 $\pm$ 3,39 % ***	16,31 $\pm$ 4,61 % **	18,72 $\pm$ 3,44 % ***	9,98 $\pm$ 2,30 % ***



**Abbildung 30: Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten T-Zellen in der Milz und den schwächer methylierten T-Zellen bronchialer Lymphknoten.**

Angegeben ist die untersuchte T-Zell-Subpopulation (CD25<sup>-</sup>-Zellen, CD25<sup>+</sup>-Zellen) sowie die Position der CpGs in Bezug auf den Transkriptionsstart von IFN $\gamma$  (NM\_008337). LK: Lymphknoten, \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05, ns - nicht signifikant

## 4 Diskussion

Unter einer Allergie versteht man eine Dysregulation des Immunsystems mit einer Reaktion gegen normalerweise harmlose Antigene. Eine der schwersten Manifestationen allergischer Sensibilisierung stellt das Asthma bronchiale dar. Dessen Prävalenz stieg insbesondere in Industrienationen in den letzten Jahrzehnten stetig an. Als Ursache der Erkrankung werden neben einer individuellen genetischen Prädisposition vor allem Umwelteinflüsse diskutiert. So postuliert die Hygiene-Hypothese (Strachan, 1989), dass eine rückläufige Exposition gegenüber Mikroorganismen mit steigender Asthmaprävalenz einhergeht (Bach, 2002). In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass Kinder seltener an Asthma erkranken, wenn sie auf Bauernhöfen aufwachsen und dadurch einer Vielzahl bakterieller Komponenten ausgesetzt sind (Riedler et al., 2001; Ege et al., 2006). Bei der Suche nach protektiven Faktoren im bäuerlichen Umfeld konnte das apathogene, Gram-positive Milchsäurebakterium *L. lactis* identifiziert werden (Korthals et al., 2008). Im Mausmodell für akutes Asthma bronchiale verhinderte die i.n. Applikation von *L. lactis* die Entstehung des allergischen Phänotyps (Debarry et al., 2007). Die diesem Effekt zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt.

Aus immunologischer Sicht wird die asthmatische Entzündungsreaktion durch eine gesteigerte Th2-Antwort gesteuert. Th2-Zellen definieren sich durch die Sekretion eines spezifischen Zytokinmusters (IL-4, IL-5, IL-13) und entstehen durch Aktivierung und Differenzierung naiver Th0-Zellen nach Allergenkontakt. Als klärendes Bindeglied zwischen Gen-Umweltinteraktionen und der Fehlfunktion des Immunsystems im Rahmen der Asthmapathogenese werden epigenetische Mechanismen diskutiert (Miller and Ho, 2008). Nach Vuillermin *et al.* könnte eine mikrobielle Exposition zu einer veränderten DNA-Methylierung führen, die die Expression Asthma-relevanter Gene, z.B. der Th2-Zytokine, beeinflusst und so das Erkrankungsrisiko reduziert (Vuillermin et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit bestätigt den von Debarry *et al.* (Debarry et al., 2007) beschriebenen protektiven Effekt von *L. lactis* auf die Entstehung von experimentellem Asthma im Mausmodell und demonstriert darüber hinaus wie sich auf zellulärer Ebene die Zytokinproduktion verändert. Des Weiteren wird gezeigt, dass der Methylierungsstatus der proximalen Promotorregionen entsprechender Gene indessen unverändert bleibt.

## **4.1 Intranasale Applikation von *L. lactis* schützt vor der Entstehung einer asthmatischen Entzündung im Mausmodell**

Die Grundlage für weiterführende molekulare Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit bildete der von Debarry *et al.* (Debarry *et al.*, 2007) publizierte Versuchsaufbau. Es wurden BALB/c Mäuse präventiv i.n. mit *L. lactis* exponiert und eine asthmatische Entzündungsreaktion wurde induziert. In anschließenden Analysen konnte der Asthma-protective Effekt von *L. lactis* in Bezug auf den funktionellen Parameter der Atemwegsreagibilität sowie pathologische Parameter (eosinophiler Granulozyten in der BAL, perivaskuläres und peribronchiales entzündliches Infiltrat und Anzahl mukusproduzierender Becherzellen in der Lungenhistologie) bestätigt werden.

Zusätzlich wurde durch die Analyse der Muc5ac-mRNA-Expression im Lungengewebe die in histologischen Gewebeschnitten beobachtete reduzierte Mukusproduktion in dieser Arbeit erstmalig quantifiziert. Muc5ac wird im experimentellen Asthma nach Allergenexposition induziert und die Expression korreliert mit dem Ausmaß der bronchialen Becherzellhyperplasie (Young *et al.*, 2007). Es konnte eine signifikante Reduktion der Muc5ac-mRNA-Expression um 69,6% ( $p < 0,01$ ) in *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zur Positivkontrollgruppe nachgewiesen werden.

Die Serumwerte für OVA-spezifisches IgE, IgG2a und IgG1 blieben dagegen unverändert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien, in denen *L. lactis* appliziert wurde, erzielt. So hatte in einem Asthma-Prophylaxe-Modell mit BALB/c-Mäusen die i.n. Applikation von *L. lactis* vor der anschließenden i.p. Sensibilisierung mit dem rekombinanten Birkenpollen-Antigen rBet keine signifikante Auswirkung auf die allergenspezifischen Immunglobulin-Titer (IgE, IgG2a, IgG1) (Repa *et al.*, 2003). Ebenso zeigten Cortez *et al.*, dass nach Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen gegenüber dem in Kuhmilch enthaltenden Antigen  $\beta$ -Lactoglobulin (durch orale Applikation von Kuhmilch mit dem Adjuvans Choleratoxin und anschließender i.n. Applikation von  $\beta$ -Lactoglobulin) die i.n. Behandlung mit *L. lactis* zu keinen signifikanten Unterschieden in den  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifischen Immunglobulin-Titern im Vergleich zur Positivkontrollgruppe führte (Cortes-Perez *et al.*, 2009).

Dies weist darauf hin, dass sich die Wirkung von *L. lactis* auf das lokale Entzündungsgeschehen beschränkt. Im Gegensatz zu der deutlichen Verbesserung

lokaler phänotypischer und funktioneller Parameter durch die Applikation von *L. lactis* fand sich systemisch kein Einfluss bei unveränderten OVA-spezifischen Immunglobulin-Titern. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus epidemiologischen Studien, die zeigen, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwuchsen, zwar signifikant weniger allergische Manifestationen aufwiesen, dies jedoch unabhängig von einer vorhandenen allergischen Sensibilisierung war (Riedler et al., 2001).

Da mit der *L. lactis*-Exposition in der vorliegenden Arbeit bereits vor der OVA-Sensibilisierung begonnen wurde erscheint ein prophylaktischer Effekt der Applikation wahrscheinlich. Ob die *L. lactis*-Applikation auch nach der Sensibilisierungsphase einen therapeutischen Effekt haben kann, bleibt noch zu untersuchen. Allerdings konnte eine parallel zur Sensibilisierung gegenüber OVA durchgeführte i.n. *L. lactis*-MG1363-Exposition die Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps (Eosinophilenzahl in der BAL, Lungenhistologie und Anaphylaxie-Score) nicht verhindern (Wu et al., 2006), was gegen einen therapeutischen Effekt dieses Bakteriums spricht.

Für das Bakterium *Mycoplasma pneumoniae* wurden im Mausmodell bereits die Effekte einer prophylaktischen mit denen einer therapeutischen Applikation verglichen. Eine einmalige i.n. Applikation von *Mycoplasma pneumoniae* vor Sensibilisierung gegenüber OVA führte zu einer signifikanten Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität und einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl in der BAL. Im therapeutischen Ansatz (einmalige i.n. Applikation nach Sensibilisierung) zeigten sich eine Aggravation der bronchialen Hyperreagibilität, fehlende Unterschiede der Leukozytenzahl in der BAL sowie ein verstärktes entzündliches Infiltrat in der Lungenhistologie (Chu et al., 2003). Dies zeigt, dass die Applikation dieses Bakteriums zwar einen prophylaktischen, jedoch keine therapeutischen Effekt hat.

Für *Bacillus Calmette-Guérin* konnte dagegen ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Eine einmalige i.n. Applikation nach erfolgter Sensibilisierung gegenüber OVA führte zu einer Reduktion der zuvor bestehenden bronchialen Hyperreagibilität, einer Verminderung der Eosinophilenzahl in der BAL und in der Lungenhistologie (Hopfenspirger and Agrawal, 2002).

Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Bakterium *L. lactis* deuten jedoch auch epidemiologische Studien darauf hin, dass ein prophylaktischer wahrscheinlicher als ein therapeutischer Effekt zu erwarten ist. *L. lactis* wurde aus einem Asthma-protectiven bäuerlichen Umfeld isoliert und die in diesem Umfeld durchgeführten

epidemiologischen Studien betonen, dass protektive Faktoren des bäuerlichen Umfelds für den Menschen besonders im prä- und perinatalen Zeitfenster, also vor der Manifestation einer allergischen Erkrankung, von Bedeutung sind (Riedler et al., 2001; Ege et al., 2008).

Vergleicht man die erwähnten Bakterienarten bezüglich ihres vor Asthma schützenden Effektes im Mausmodell, so sind neben einer prophylaktischen oder therapeutischen Wirkung hinsichtlich einer potentiellen Anwendung beim Menschen auch die unerwünschten Wirkungen zu berücksichtigen. Hier ist die Apathogenität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gram-positiven (kein LPS) Milchsäurebakteriums *L. lactis* für den Menschen zu betonen (Casalta and Montel, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte niedrige Zahl an Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, in der BAL von ausschließlich mit *L. lactis* behandelten Tieren weist auf eine potentiell gute Verträglichkeit einer solchen Behandlung hin.

## **4.2 Die *L. lactis*-Applikation beeinflusst die Zytokinproduktion von mononukleären Zellen**

Während der asthmatischen Früh- und Spätreaktion interagiert eine Vielzahl an Zellen des Immunsystems in der pulmonalen Entzündungsreaktion. Ihr Zusammenspiel wird wesentlich durch Zytokine gesteuert. Dabei wird der Th2-Zelle mit den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-13 eine pro-asthmatische Rolle zugeschrieben. Th1-Zellen mit IFN $\gamma$  und Tregs mit IL-10 haben dagegen einen Asthma-protectiven Effekt (Barnes, 2008).

Zur Erforschung der noch unbekanntenen molekularen Mechanismen des schützenden Effekts der *L. lactis*-Applikation war es für die vorliegende Arbeit deshalb von besonderem Interesse, die Auswirkung der *L. lactis*-Behandlung auf die Zytokinexpression zu untersuchen. Dazu wurden MNCs aus bronchialen Lymphknoten und der Milz isoliert, *in vitro* mit OVA stimuliert und die Zytokinkonzentration in den Überständen bestimmt. Dabei wurden die Lymphknoten zur Analyse des lokalen Entzündungsgeschehens untersucht. Dorthin erfolgt charakteristischerweise die Einwanderung der antigenpräsentierenden Zellen mit nachfolgender T-Zell-Aktivierung. Anhand der Daten aus der Milz, dem zentralen Reservoir immunkompetenter Zellen, sollten systemische Effekte aufgedeckt werden.

#### 4.2.1 Lokale Effekte der *L. lactis* Exposition (Lymphknoten)

Zur Analyse der lokalen Effekte der *L. lactis*-Applikation wurde zunächst die Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in Überständen OVA-stimulierter MNCs aus bronchialen Lymphknoten untersucht.

Bei den IL-4-Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten OVA-sensibilisierten Mäusen und *L. lactis*-behandelten Tieren beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass in der vorliegenden Arbeit zum Messzeitpunkt die T-Zell-Differenzierung bereits abgeschlossen war. IL-4 ist insbesondere bei der Induktion der asthmatischen Immunantwort von Bedeutung, da unter seinem Einfluss die Differenzierung naiver Th0-Zellen zu Th2-Zellen erfolgt. Bei der Aufrechterhaltung der pulmonalen Entzündungsreaktion scheint es dagegen von untergeordneter Bedeutung. So können IL-4-Antikörper während der Sensibilisierungsphase die Asthmaentwicklung stoppen, nicht aber zu einem späteren Zeitpunkt. Auch führt eine antigenspezifische Stimulation nur zu einem vorübergehenden Anstieg von IL-4 (Wills-Karp et al., 1998; Yssel and Groux, 2000). In weiteren Studien wäre daher die IL-4-Bestimmung während der Sensibilisierungsphase sinnvoll, da in diesem Zeitfenster Unterschiede, z.B. eine IL-4-Reduktion nach *L. lactis*-Applikation, am wahrscheinlichsten zu beobachten wären.

Die IL-5-Produktion wurde dagegen durch *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Mäuse im Vergleich zur Positivkontrollgruppe signifikant gesenkt. Die IL-5-mRNA-Expression war in der Tendenz reduziert. IL-5 ist das entscheidende Zytokin für die Reifung und Differenzierung eosinophiler Granulozyten (Kotsimbos and Hamid, 1997). Eine Behandlung von Mäusen mit einem IL-5-Antikörper reduzierte die pulmonale Eosinophilie (Mathur et al., 1999). Dies lässt darauf schließen, dass eine IL-5-Reduktion einer der molekularen Mechanismen ist, über den die *L. lactis*-Applikation den allergischen Phänotyp zu reduzieren kann, sichtbar an einer Reduktion der Eosinophilenzahl in der BAL sowie am geringeren entzündlichen Infiltrat in der Lungenhistologie, welches zu großen Teilen aus eosinophilen Granulozyten bestand.

Ebenfalls war IL-13 in OVA-stimulierten MNCs bronchialer Lymphknoten von *L. lactis*-behandelten Mäusen signifikant erniedrigt bei gleichzeitig tendenziell reduzierten IL-13-mRNA-Titern. IL-13 führt im Mausmodell zu bronchialer Hyperreagibilität (Kuperman et al., 2002) und erhöhter Mukusproduktion korrelierend mit einer verstärkten Muc5ac-Expression und -Produktion (Zuhdi et al., 2000). Auch beim Menschen konnte in Lungenbiopsien von Asthmatikern eine erhöhte IL-13-

Expression nachgewiesen werden (Humbert et al., 1997). Die beobachteten reduzierten IL-13-Titer könnten somit zur verbesserten Lungenfunktionsmessung *L. lactis*-exponierter Tiere sowie der verringerten Zahl an mukusproduzierenden Becherzellen in der Lungenhistologie - passend zur signifikant erniedrigten Muc5ac-mRNA-Expression im Lungengewebe - beigetragen haben.

Damit konnte mit der Suppression der zwei wichtigen Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 ein Mechanismus der *L. lactis*-vermittelten Asthmaprotektion aufgedeckt werden.

Um zu klären ob die Reduktion der Th2-Antwort durch eine Induktion von Tregs oder durch eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts zugunsten von Th1 verursacht sein könnte, wurden die Zytokine IL-10 (Tregs) und IFN $\gamma$  (Th1) untersucht.

Die IL-10-Konzentration in MNCs bronchialer Lymphknoten wurde durch die Behandlung OVA-sensibilisierter Tiere mit *L. lactis* auf Protein- und mRNA-Ebene reduziert, wobei jeweils kein Signifikanzniveau erreicht wurde. Interpretiert man IL-10 als Th2-Zytokin (Lee et al., 2009), so ist dieses Ergebnis in Einklang mit dem Absinken der anderen Th2-Zytokine zu sehen.

In aktuellen Studien wird IL-10 allerdings mehrheitlich regulatorischen T-Zellen (Treg) zugeschrieben. Diese dämpfen mittels IL-10 sowohl Th1- als auch Th2-dominierte Antworten des Immunsystems (Hawrylowicz and O'Garra, 2005). Das von Wills-Karp *et al.* aufgestellte Gegenregulations-Modell besagt, dass mikrobielle Stimulationen jeglicher Art über eine IL-10-Induktion Asthma-protectiv wirken (Wills-Karp et al., 1998). Somit müsste die Behandlung der Mäuse mit *L. lactis* mit erhöhten IL-10-Konzentrationen einhergehen. Da tendenziell das Gegenteil der Fall ist, scheint *L. lactis* seine protektive Wirkung nicht durch Induktion regulatorischer T-Zellen zu entfalten. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Daten in der vorliegenden Arbeit aus OVA-stimulierten MNCs erhoben wurden. Da nicht nur Tregs als Quelle von IL-10 in Frage kommen, sondern auch Makrophagen, B-Zellen und DCs (Couper et al., 2008) sowie alle T-Helfer-Subpopulationen (Jankovic and Trinchieri, 2007), die ebenfalls Bestandteil der MNC-Population sind, könnten diese Zellen das Ergebnis wesentlich beeinflusst haben.

Die IFN $\gamma$ -Produktion und -mRNA-Expression wurde durch die Behandlung OVA-sensibilisierter Tiere mit *L. lactis* in OVA-stimulierten MNCs bronchialer Lymphknoten tendenziell reduziert. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die meisten Protein-Daten am Rande des Detektionslimits lagen. IFN $\gamma$  wird von Th1-Zellen sezerniert. Eine IFN $\gamma$ -Exposition führt im Mausmodell zu einem Rückgang einer etablierten

Atemwegsentzündung (Lack et al., 1994) sowie *in vitro* zu einer Inhibition der Th2-Proliferation (Fitch et al., 1993). Im Rahmen der Hygiene-Hypothese wird eine fehlende Th1-Stimulation durch mangelnde Exposition gegenüber Mikroorganismen als immunologischer Mechanismus der Asthmaentstehung diskutiert. Dies führe zu einer Imbalance des Th1/Th2-Gleichgewichts mit einer Dominanz pro-asthmatischer Th2-Zellen (Romagnani, 2004). *In vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass mikrobielle Stimulation über IFN $\gamma$  eine Reduktion von Th2-Zytokinen induzieren kann (Erb et al., 1998). Die demnach in der vorliegenden Arbeit zu erwartende erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion nach *L. lactis*-Exposition konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Insgesamt lässt sich daher der protektive *L. lactis*-Effekt, der mit einer Reduktion der Th2-Zytokine korreliert, weder durch eine Treg-Induktion noch durch eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance zugunsten von Th1 erklären.

Es fällt zudem auf, dass *L. lactis* in der Tendenz sämtliche hier bestimmte Zytokine supprimiert, d.h. sowohl Th1- als auch Th2- und Treg-spezifische Zytokine. Dies konnte auch in anderen Studien nach mikrobieller Exposition und allergischer Sensibilisierung beobachtet werden ( $\rightarrow$  4.2.2).

Neben den Zytokinen aus dem Bereich der erworbenen Immunität wurde mit IL-6 ein Zytokin analysiert, das primär im Bereich der angeborenen Immunität anzusiedeln ist. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das große Teile der Akute-Phase-Proteine induziert. In einem Pränatal-Modell spielt nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe IL-6 möglicherweise eine Rolle bei der Übertragung des Asthmaschutzes von Muttertieren auf den Nachwuchs. So zeigte sich, dass die *A. lwoffii*-vermittelten Asthmaprotektion vom Vorhandensein von TLRs in den Muttertieren abhängig ist und deren Stimulation gefolgt ist von erhöhten IL-6-Titern in BAL und Serum (Conrad et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit führte dagegen die Behandlung OVA-sensibilisierter Tiere mit *L. lactis* in MNCs bronchialer Lymphknoten zu einer signifikanten Senkung der IL-6-Konzentration. Ursächlich für diese gegenteilige Beobachtung könnten die unterschiedlichen Quellen der Zytokinbestimmung sein (BAL und Serum vs. OVA-restimulierte MNCs bronchialer Lymphknoten) sowie die verschiedenen gewählten Messzeitpunkte (1-48h vs. 72h). Des Weiteren erfolgt die Erkennung des Gram-positiven Bakteriums *L. lactis* wahrscheinlich über andere Rezeptoren (Fischer et al., 2011) als die des Gram-negativen Bakteriums *A. lwoffii* (Conrad et al., 2009), so dass in

Folge möglicherweise andere, IL-6-unabhängige Signalkaskaden ausgelöst werden, die zum Asthma-Schutz führen.

#### 4.2.2 Systemische Effekte der *L. lactis* Exposition (Milz)

Systemische Effekte der *L. lactis*-Applikation sollten durch Messung der Zytokinkonzentrationen in Überständen OVA-stimulierter MNCs der Milz analysiert werden.

Neben den Th2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 zeigten sich IL-10 und IFN $\gamma$  durch *L. lactis*-Applikation in der Tendenz erniedrigt. Im Gegensatz zur Lymphknotenanalyse erreichten die Unterschiede der IL-5- und IL-13-Konzentrationen jedoch kein Signifikanzniveau.

Die tendenzielle Reduktion der Zytokinkonzentrationen konnte auf mRNA-Ebene für IL-5 und IL-10 bestätigt werden. Die IFN $\gamma$ -mRNA-Expression war dagegen in *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Tieren erhöht. Fehlende Korrelationen zwischen mRNA- und Protein-Konzentrationen werden jedoch aufgrund von unterschiedlichen Halbwertszeiten von mRNA und Proteinen sowie posttranslationalen Modifikationen häufig beobachtet (Mehra et al., 2003; Pohlers et al., 2005; Nie et al., 2006).

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit detektierten auch andere Studien verminderte Zytokinkonzentrationen sowohl von Th2- als auch von Th1-Zytokinen in der Milz nach Bakterienexposition in sensibilisierten Mäusen. Repa *et al.* fanden erniedrigte IL-5 und IFN $\gamma$ -Titer in Milzzellen, die mit dem Birkenpollenallergen rBet restimuliert worden waren. Die Milzzellen stammten aus Mäusen, die zunächst mit *L. lactis* nasal behandelt worden waren und anschließend gegenüber rBet sensibilisiert wurden (Repa et al., 2003). Ohno *et al.* verabreichten *Bifidobacterium bifidum* G9-1 über 2 Wochen oral an BALB/c-Mäuse und sensibilisierten diese eine Woche nach Beginn der Bakterienapplikation gegenüber OVA. Nach Isolation von MNCs der Milz und OVA-Restimulation wurden in der Tendenz erniedrigte IL-5 und IFN $\gamma$ -Titer in der Interventionsgruppe gefunden (Ohno et al., 2005). Im Einklang mit diesen Daten deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen von der Th1/Th2-Balance unabhängigen Mechanismus der *L. lactis*-vermittelten Asthmaprotektion hin.

Zusätzlich zu Th1- und Th2-Zytokinen untersuchten Blumer *et al.* das Treg-Zytokin IL-10. Die orale Gabe vom gleichermaßen (wie *L. lactis*) zu den Milchsäurebakterien gehörenden *Lactobacillus rhamnosus* GG an Muttertiere führte bei deren Nachwuchs nach OVA-Sensibilisierung zu signifikant reduziertem Titer von IL-5, IFN $\gamma$  und IL-10

in Überständen von *in vitro* OVA-stimulierten MNCs der Milz (Blumer et al., 2007). Damit wurde analog zur vorliegenden Arbeit eine parallele Reduktion von Th1-, Th2 und Treg-Zytokinen beobachtet. Als ursächlich für eine solche von IL-10-produzierenden Tregs unabhängigen Suppression von Th1- und Th2-Zellen wird eine durch mikrobielle Stimulation verursachte DC-Modulation postuliert, die über einen TGF- $\beta$ -abhängigen Mechanismus zu einer allgemein verminderten Reaktionsfreudigkeit von T-Zellen führt (Braat et al., 2004). Zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen des protektiven *L. lactis*-Effektes sollten daher in folgenden Experimenten weitere Zytokine in die Analysen mit einbezogen werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, über welche Rezeptoren *L. lactis* initial von DCs erkannt wird. Diesbezüglich konnte bisher lediglich TLR2 ausgeschlossen werden (Fischer et al., 2011).

Insgesamt stimmen die Zytokindaten der vorliegenden Arbeit mit Resultaten ähnlicher Experimente überein, wobei sich aufgrund des hier gewählten experimentellen Designs erstmalig die Möglichkeit bietet, lokale mit systemischen Effekten zu vergleichen (Daten aus bronchialen Lymphknoten vs. Milz). Dabei zeigte sich bezüglich der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 in der Milz nur ein tendenzieller Abfall in *L. lactis*-behandelten Mäusen, der im Gegensatz zu den Messungen in bronchialen Lymphknoten (IL-5 um 59,9% vermindert,  $p < 0,01$ ; IL-13 um 35,1% vermindert,  $p < 0,05$ ) kein Signifikanzniveau erreichte. Dies geht einher mit den Beobachtungen der Phänotypanalyse, in der *L. lactis* die lokale pulmonale Entzündungsreaktion erfolgreich reduzierte, auf die systemische Komponente des IgE-Spiegels aber keinen Einfluss nehmen konnte. Ebenfalls passend zum fehlenden Einfluss auf den IgE-Spiegel sind die erhobenen IL-4-Daten aus Lymphknoten und Milz, die keine signifikanten Unterschiede durch *L. lactis*-Applikation zeigten. Da IL-4 (zusammen mit IL-13) den Klassenwechsel der B-Zellen hin zu einer IgE-Produktion steuert (Barnes, 2008), ist bei fehlendem *L. lactis*-Einfluss auf IL-4, lokal und systemisch, auch keine Veränderung im OVA-spezifischem IgE-Spiegel zu erwarten.

Möglicherweise moduliert *L. lactis* also nur lokale Effektormechanismen der allergischen Immunantwort oder eine höhere Dosis bzw. eine längere Applikationsdauer sind nötig, um signifikante Effekte auf die Zytokinproduktion auch in der Milz zu messen. Interessant wäre es daher die Auswirkungen von *L. lactis* in einem chronischem Asthma-Mausmodell zu untersuchen, das zudem die Pathologie des

humanen Asthma (airway remodeling, persistierende bronchiale Hyperreagibilität) besser nachzubilden vermag (Nials and Uddin, 2008).

Beim Vergleich der Lymphknoten- und Milzdaten war des Weiteren festzustellen, dass sich in der Milz im Vergleich zu bronchialen Lymphknoten ausschließlich niedrigere absolute Zytokinkonzentrationen messen ließen. Eine Ursache könnte die erfolgte OVA-Restimulation in Zusammenhang mit dem T-Zellmigrationsverhalten sein. Die OVA-Restimulation regt spezifisch die Zellen zur Zytokinproduktion an, die mit dem Antigen in Kontakt geraten sind. Typischerweise zeigen durch Antigenkontakt entstandene T-Effektorzellen ein gewebsspezifisches Migrationsverhalten und akkumulieren bevorzugt am Ort des Antigenkontakts (Kruger and Mooren, 2007), hier also in der Lunge und in den bronchialen Lymphknoten. Dementsprechend wurden in allen Versuchsgruppen in bronchialen Lymphknoten höhere absolute Zytokinkonzentrationen als in der Milz gemessen.

### **4.3 Die *L. lactis*-Applikation hat keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus ausgewählter Genloci**

Einer reduzierten Transkription eines Gens können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen, u.a. eine erhöhte Methylierung der entsprechenden Promotorregion (Kass et al., 1997). Diesem Mechanismus wird vor allem nach Einwirkung von Umweltfaktoren, wie mikrobiellen Stimuli, eine besondere Bedeutung beigemessen (Miller and Ho, 2008; Vuillermin et al., 2009). So wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die auf Protein- und mRNA-Ebene gefundenen Differenzen der Zytokinexpression und -produktion zwischen den Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Methylierungsstadi der zugehörigen genomischen Loci assoziiert sind. Um dies zu überprüfen wurde mittels Bisulfitbehandlung und Pyrosequenzierung der Methylierungszustand der proximalen Promotorbereiche von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  analysiert.

Dabei zeigten sich für IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  keine signifikanten Veränderungen der Methylierung durch *L. lactis*-Applikation an OVA-sensibilisierte Tiere. Zur Erklärung für die fehlenden signifikanten Unterschiede der Methylierungsstadi, trotz vorliegenden Differenzen der Zytokinkonzentrationen auf mRNA- und Protein-Ebene, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden, wie der in der vorliegenden Arbeit gewählte Messzeitpunkt, die für die Analyse gewählten DNA-Regionen, die Existenz weiterer

regulativer Mechanismen zusätzlich zur DNA-Methylierungen sowie das gewählte experimentelle Design.

Bezüglich des Messzeitpunktes ist eine zeitliche Dynamik der DNA-Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors aus anderen Experimenten bekannt. In einem Pränatal-Modell führte die intranasale Exposition von Muttertieren mit dem ebenfalls aus der mikrobiellen Flora des Kuhstalls isolierten Bakterium *A. lwoffii* zu signifikant erhöhter Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors in CD4<sup>+</sup> Zellen der Nachkommen am Tag 4 nach der Geburt. 6 Wochen später war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (persönliche Information R.Teich). Auch wenn den Methylierungsvorgängen in Pränatal-Modellen möglicherweise andere Mechanismen zu Grunde liegen, sollte in weiterführenden Experimenten mit *L. lactis* der Methylierungsstatus zusätzlich im zeitlichen Verlauf analysiert werden.

Da in der vorliegenden Arbeit nur einige wenige CpGs untersucht wurden, wäre es ferner möglich, dass Methylierungsunterschiede in hier nicht analysierten CpGs vorliegen, denn zur Transkriptionskontrolle müssen nicht sämtliche CpGs einer Promotorregion verändert sein. So konnte für IFN $\gamma$  (Jones and Chen, 2006) und Foxp3 (Floess et al., 2007), dem entscheidenden Transkriptionsfaktor in der Treg-Differenzierung, gezeigt werden, dass nur bestimmte CpGs innerhalb der Promotorregionen regulativ aktiv sind. Zusätzlich ist neben den Promotorregionen inzwischen eine Vielzahl von Genregionen bekannt, die im Bezug auf die Gentranskription eine regulatorische Funktion besitzen. Bedeutende übergeordnete regulative DNA-Abschnitte für den Th-2-Zytokin-Lokus, der die Gene für IL-4, IL-5 und IL13 umfasst, sind u.a. die Enhancer (Genexpression aktivierende Region) CNS-I und CNS-II sowie die weit strangaufwärts liegende Region LCR. Es handelt sich hierbei um nicht-kodierende Sequenzen, die zwischen den Genen lokalisiert sind, zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind und übergreifend die Expression mehrerer distal gelegener Gene beeinflussen können (Wilson et al., 2009). Möglicherweise bestehen in diesen nicht untersuchten Genabschnitten entscheidende Methylierungsunterschiede nach *L. lactis*-Behandlung, die eine Assoziation mit den beobachteten Differenzen der Zytokinkonzentrationen aufweisen.

Weiterhin existiert neben der DNA-Methylierung mit dem Mechanismus der Histonmodifikation eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsregulation. Histonmodifikationen umfassen z.B. posttranslationale Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung der Histonproteine (Berger, 2007). Anders als die DNA-

Methylierung, welche die direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflusst, bewirken Histonmodifikationen eine Veränderung der Chromatinstruktur, wodurch u.a. eine geschlossene oder eine geöffnete Chromatinstruktur entsteht und entsprechend Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren frei werden können. Dabei ist allein durch Histonmodifikationen eine veränderte Genexpression induzierbar, ohne dass Veränderungen der DNA-Methylierung auftreten (Umlauf et al., 2004). Histon-Modifikationen werden als Mechanismus angesehen, mit der eine Zelle kurzfristig auf Umwelteinflüsse mit veränderter Gentranskription reagieren kann, während Methylierungen entscheidender für langfristige Expressionsinhibition verantwortlich sind (Reik, 2007). In der vorliegenden Arbeit könnte also die *L. lactis*-Exposition über einen ungenügenden Zeitraum erfolgt sein, so dass über den Mechanismus der Histonmodifikation zwar eine Beeinflussung des Phänotyps und der Proteinproduktion erfolgt ist, nicht aber eine dauerhafte epigenetische Fixierung des veränderten Zellverhaltens über den Mechanismus der DNA-Methylierung. Weitere Studien müssten klären, über welchen Zeitraum der protektive *L. lactis*-Effekt persistiert und ob eine längere *L. lactis*-Exposition schließlich doch in veränderten Methylierungsmustern resultiert. Geeignet hierzu wären chronische Asthma-Maus-Modelle (Wegmann et al., 2005; Nials and Uddin, 2008). Zudem sollte im Akut-Modell auch der Mechanismus der Histonmodifikation analysiert werden.

Des Weiteren ist zu beachten, dass identische Methylierungsstadien nicht zwangsläufig mit identischer transkriptioneller Aktivität gleichzusetzen sind. Permissive epigenetische Modifikationen, wie eine niedrige Methylierung, erlauben lediglich die Transkription, indem sie Transkriptionsfaktoren ermöglichen zu binden, sie erzwingen diese aber nicht. Zusätzlich beeinflussen posttranskriptionelle Abläufe wie Splicen, nukleozelluläre Transporte und mRNA-Degradation die gemessenen mRNA-Spiegel sowie translationale Mechanismen die Proteinspiegel, so dass der Methylierungsstatus nicht zwangsläufig mit der mRNA- und Proteinkonzentration assoziiert sein muss.

Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit die Methylierung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht, die Daten zur Zytokinexpression (mRNA und Protein) dagegen stammen von OVA-stimulierten MNCs. Zwar gelten Th-Zellen als wesentliche Produzenten von IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$ , dennoch sind hierzu auch andere Zellen in der Lage z.B. B-Zellen, Monozyten und natürlichen Killer T-Zellen (IL-10) (Borish and Steinke, 2003), Mastzellen und eosinophile Granulozyten (IL-5) (Greenfeder et al., 2001), B-Zellen und APCs (IFN $\gamma$ ) (Schroder et al., 2004). Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden,

dass diese für die veränderten Zytokinkonzentrationen verantwortlich waren, so dass in weiterführende Studien eine genaue Differenzierung der MNC-Subpopulationen vorgenommen werden sollte.

Trotz fehlender signifikanter Methylierungsunterschiede durch die *L. lactis*-Applikation zeigte sich beim IFN $\gamma$ -Promotor in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen bronchialer Lymphknoten eine tendenziell höhere Methylierung an sämtlichen untersuchten CpG-Positionen in der Gruppe *L. lactis*/OVA verglichen mit der Positivkontrollgruppe (PBS/OVA). Passend hierzu fanden sich in den Überständen OVA-stimulierter MNCs bronchialer Lymphknoten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in der Tendenz erniedrigte IFN $\gamma$ -Titer in *L. lactis*-behandelten OVA-sensibilisierten Tieren. Dies weist darauf hin, dass zumindest auf lokaler Ebene in dieser Zellsubpopulation Methylierungsdifferenzen eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen könnten.

Bei fehlendem signifikanten Einfluss der *L. lactis*-Applikation auf den Methylierungsstatus des IFN $\gamma$ -Promotors wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beobachtung gemacht, dass OVA-sensibilisierte Mäuse im Vergleich zu PBS-pseudosensibilisierten Tieren in CD4<sup>+</sup>Zellen bronchialer Lymphknoten immer eine höhere Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors aufwiesen. Signifikant waren diese Unterschiede an den Positionen -212, -178, -59 und -50 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen, sowie an den Positionen -212, -178, -59 und -39 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen. Dieser Effekt trat auch nach *L. lactis*-Applikation zwischen den Gruppen *L. lactis*/PBS und *L. lactis*/OVA auf. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede an den Positionen -212, -178, -59, -50 und -39 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen und an den Positionen -212 und -178 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen. Da eine Hypermethylierung mit verminderter Genexpression assoziiert ist und im pathogenetischen Asthma-Modell der Th1/Th2-Balance mit einer Reduktion des Th1-Zytokins IFN $\gamma$  in asthmatischen, OVA-sensibilisierten Mäusen gerechnet wird, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Hierzu im Widerspruch stehen die IFN $\gamma$ -Konzentrationen auf mRNA- und Proteinebene. Dort waren entgegen der Erwartung die IFN $\gamma$ -Spiegel in OVA-sensibilisierten Mäusen tendenziell höher als in pseudosensibilisierten Tieren. Ursächlich hierfür könnte das Verfahren der OVA-spezifischen Restimulation sein. Die allergenspezifische Restimulation steigert die Zytokinsekretion sensibilisierter Zellen. Da in PBS-Tieren keine Sensibilisierung erfolgte, fand in dort isolierten MNCs keine Stimulation statt. Somit sind die dort gemessenen Konzentrationen am ehesten als IFN $\gamma$ -Ausgangsniveau zu betrachten. Es ist anzunehmen, dass bei unspezifischer Stimulation in PBS-Tieren höhere IFN $\gamma$ -

Konzentrationen gemessen worden wären als in OVA-Tieren, korrelierend mit dem niedrigeren Methylierungsgrad. Leider konnte aufgrund von zu geringer Menge an gewonnenem Zellmaterial nur die spezifische Stimulation erfolgen, da diese Arbeit vorrangig auf den Effekt der *L. lactis*-Behandlung fokussierte.

## 4.4 Unterschiede in der IFN $\gamma$ Grund-Methylierung

### 4.4.1 IFN $\gamma$ Grund-Methylierung in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-

#### Zellen

Bei den Absolutwerten der IFN $\gamma$ -Methylierung fiel unabhängig von den Versuchsgruppen eine stets stärkere Methylierung in CD25<sup>+</sup>-Zellen verglichen mit CD25<sup>-</sup>-Zellen auf. CD25 entspricht der Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors. Nach Antigenpräsentation durch APCs an naive Th0-Zellen beginnen diese CD25 zu exprimieren (Murphy and Walport, 2008). Ebenso ist CD25 als Oberflächenprotein auf Tregs vertreten, so dass im vorliegenden Versuchsaufbau eine Unterscheidung aktivierter T-Zellen und regulatorischer T-Zellen nicht möglich ist. In weiterführenden Experimenten sollte daher zur Differenzierung das zusätzliche Einbeziehen des inzwischen etablierten Treg-spezifischen Markers Foxp3 erfolgen (Sakaguchi, 2011). Für CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Zellen wäre dann eine Hypermethylierung des IFN $\gamma$ -Promotors einhergehend mit einer verminderten Proteinexpression im Vergleich zu CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>-Zellen erklärbar, da Tregs (CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Zellen) typischerweise kein IFN $\gamma$ , sondern IL-10 sezernieren.

### 4.4.2 IFN $\gamma$ Grund-Methylierung in Lymphknoten und Milz

Der IFN $\gamma$ -Promotor von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der Milz war, unabhängig von der Versuchsgruppe, immer stärker methyliert als in bronchialen Lymphknoten. Es konnte somit gezeigt werden, dass im Körper zirkulierende T-Zellen verschiedene Methylierungsgrade einer Genregion aufweisen in Abhängigkeit vom lymphatischen Organ, aus dem sie isoliert wurden. Da im Mausmodell die asthmatische Entzündungsreaktion durch pulmonalen Allergenkontakt provoziert wurde, scheint es sinnvoll, dass in der Lunge ansässige T-Zellen einen geringeren Methylierungsstatus des IFN $\gamma$ -Promotors und möglicherweise auch weiterer Zytokin-codierender Genregionen aufweisen. Eine insgesamt niedrigere Methylierung würde es der Zelle erlauben, rascher die Expression benötigter Proteine zu initiieren und somit schneller

auf wechselnde Umwelteinflüsse zu reagieren. Interessant wäre es folglich, zum besseren Verständnis epigenetischer Mechanismen im experimentellen Asthma, den Methylierungsstatus weiterer Asthma-relevanter Genregionen einer T-Zell-Population zu einem Zeitpunkt in den verschiedenen Organen des Immunsystems zu vergleichen.

## 4.5 Ausblick

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die von Debarry *et al.* (Debarry et al., 2007) beschriebenen Asthma-protektiven Effekte einer *L. lactis*-Behandlung OVA-sensibilisierter Mäuse auf den Phänotyp erfolgreich nachgebildet werden konnten. In weiteren Analysen zur Aufdeckung der Wirkmechanismen konnte eine tendenzielle Reduktion sämtlicher gemessener Zytokinkonzentrationen in Lymphknoten und Milz nach *L. lactis*-Behandlung nachgewiesen werden bei stärkeren Effekten auf lokaler Ebene (Lymphknoten-Daten). Es erfolgte keine signifikante Steigerung der Konzentrationen von IL-10 oder IFN $\gamma$ . Somit kann der protektive Effekt einer *L. lactis*-Behandlung weder auf eine Induktion regulativer immunologischer Mechanismen durch Tregs zurückgeführt werden noch auf die Induktion einer Th1-Antwort zum Ausgleich einer etwaigen Th1/Th2-Dysbalance. Möglicherweise könnte zukünftig die Analyse zusätzlicher Zytokine weiteren Aufschluss über die Wirkungsweise von *L. lactis* bieten. So wird aktuell eine Induktion der kürzlich entdeckten Th17-Zellen durch ein bäuerliches Umfeld diskutiert, die durch IL-17-Sekretion regulativ auf die Th1/Th2-Balance einwirken könnten (Schaub et al., 2009).

In Methylierungsanalysen konnte keine Assoziation zwischen Zytokinexpression und –produktion mit dem Methylierungsstatus nachgewiesen werden. Hier gilt es zukünftig CpG-Motive weiterer regulativer DNA-Regionen und den epigenetischen Mechanismus der Histonmodifikation mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Denn trotz des in der vorliegenden Arbeit fehlenden Nachweises epigenetischer Veränderungen nach mikrobieller Stimulation, sind diese bei Betrachtung anderer Studien mit Viren (Mikovits et al., 1998), Bakterien (Nardone et al., 2007) oder Parasiten (Gutierrez et al., 2004) mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten.

Die gefundenen Differenzen in der Grund-Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors zwischen Milz und Lymphknoten sprechen für ein hochkomplexes, lokalisationsabhängiges epigenetisches Geschehen im Rahmen der Immunisierung, so dass zukünftig *in vitro* Experimente helfen könnten, Einzelaspekte besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Als ursächlich für in den letzten Jahrzehnten stetig steigenden Prävalenzen von Asthma bronchiale in industrialisierten Ländern werden neben einer genetischen Prädisposition vor allem Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Die Hygiene-Hypothese bestätigend konnten epidemiologische Studien eine Reduktion allergischer Erkrankungen durch Exposition gegenüber mikrobiellen Komponenten im bäuerlichen Umfeld belegen. In Folge wurde das apathogene, Gram-positive Bakterium *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) aus dem Stallstaub traditioneller Kuhställe isoliert. Im Tiermodell führte die intranasale Applikation von *L. lactis* an Ovalbumin (OVA)-sensibilisierte und -provozierte BALB/c-Mäuse zur signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt bestätigt werden. Des Weiteren wurden die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht. Aus immunologischer Sicht geht Asthma mit einer Dominanz T-Helfer (Th)2-spezifischer Zytokine einher, bei Reduktion Th1- und Treg-spezifischer Zytokine. Daher wurden die Zytokinsekretionsmuster in mononukleären Zellen (MNCs), isoliert aus bronchialen Lymphknoten (lokale Reaktion) und der Milz (systemische Reaktion), untersucht. Dabei führte die *L. lactis*-Applikation lokal zu einer signifikante Reduktion der Th2-Antwort (Interleukin (IL)-5, IL-13). In der Milz waren die Th2-Zytokine tendenziell reduziert. Bei bestehenden immunologischen Konzepten einer Th1/Th2-Dysbalance oder einer Treg-Suppression als kausale Faktoren der Asthmaentstehung, konnte die protektive *L. lactis*-Wirkung mit keinem der beiden Modelle erklärt werden, da sich neben der reduzierten Th2-Antwort auch eine tendenzielle Reduktion Th1- (Interferon gamma (IFN $\gamma$ )) und Treg-spezifischer Zytokine (IL-10) fand.

Im Rahmen der Pathogenese von Asthma bronchiale werden epigenetische Veränderungen als klärendes Bindeglied zwischen Gen-Umweltinteraktionen und der Fehlfunktion des Immunsystems vermutet. Für den epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung konnte eine Assoziation mit der T-Zell-Differenzierung gezeigt werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit bei nachgewiesenen Differenzen der Zytokinkonzentration durch *L. lactis*-Behandlung in weiteren Experimenten die DNA-Methylierung von CpGs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen in Promotorregionen Th1-, Th2- und Treg-typischer Zytokine analysiert. Hier konnten in den untersuchten DNA-Abschnitten für IL-5, IL-10 und IFN $\gamma$  keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob stattdessen

Methylierungsunterschiede in weiter distal des Transkriptionsstarts gelegenen regulativen DNA-Regionen oder der epigenetische Mechanismus der Histonmodifikation mit dem Asthma-protectiven *L. lactis*-Effekt assoziiert sind.

Schließlich deuten in der vorliegenden Arbeit gefundene signifikante Unterschiede der Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors zwischen OVA-sensibilisierten Tieren und PBS (Phosphate Buffered Saline)-pseudosensibilisierten Tieren darauf hin, dass der epigenetische Mechanismus der DNA-Methylierung im Rahmen von Immunisierungsprozessen eine Rolle spielt. Signifikante Differenzen der Grund-Methylierung des IFN $\gamma$ -Promotors zwischen T-Zellen bronchialer Lymphknoten und der Milz zeigen, dass eine separate Analyse lokaler und systemischer Effekte in diesem Modell erforderlich ist.

## 5.1 Summary

Both environmental and genetic factors are thought to be responsible for the increasing prevalence of asthma in industrialized countries in the last decades. Confirming the hygiene hypothesis, epidemiological studies have demonstrated a reduction of allergic disease after exposition to microbial components in a farming environment. Subsequently the apathogenic, gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) G121 was isolated from the stable dust of rural cow sheds. In a mouse model the intranasal application of *L. lactis* to Ovalbumin (OVA)-sensitized and -challenged BALB/c-mice significantly reduced the development of an asthmatic phenotype. The present work confirmed this result. Furthermore underlying molecular effects were examined. From an immunological point of view asthma is associated with a dominance of T-helper (Th)2 cytokines and a reduction of Th1- and regulatory T-cell (Treg)-specific cytokines. Consequently cytokine secretion patterns in mononuclear cells isolated out of bronchial lymph nodes (indicating local reaction) and the spleen (indicating systemic reaction) were analysed. In the lymph nodes, application of *L. lactis* resulted in a significant reduction of Th2-cytokines (IL-5, IL-13). In the spleen, Th2 cytokines were reduced. According to existing immunological concepts, either a Th1/Th2-imbalance or a Treg suppression is a causal factors in the development of asthma. However neither of the models could explain the protective *L. lactis* effect, as in addition to the reduced Th2-immune-response Th1- (interferon-gamma (IFN $\gamma$ )) and Treg-specific cytokines (IL-10) tended to be likewise reduced.

In the asthma pathogenesis, epigenetic changes are suspected to be the missing link between gene-environment interactions and dysfunction of the immune system. For the epigenetic mechanism of DNA methylation an association with T-cell differentiation was shown. Accordingly, having shown differences in cytokine concentrations by *L. lactis* treatment, in further analysis the DNA methylation in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-cells of CpGs in promoter regions of Th1-, Th2- and Treg-specific cytokines were analysed. No significant differences in the analysed DNA sequences were found for IL-5, IL-10 and IFN $\gamma$ . Further analysis could clarify, whether there are differences in DNA methylation in regulatory regions more distal to the transcription start or if the epigenetic mechanism of histone modification is associated with the protective *L. lactis* effect.

Finally significant differences in the methylation of the IFN $\gamma$  promoter between OVA-sensitized and PBS (Phosphate buffered Saline) pseudo-sensitized animals indicate that the epigenetic process of DNA methylation plays a role in immunization processes. Significant differences in basic methylation of the IFN $\gamma$  promoter between T-cells isolated out of bronchial lymph nodes and the spleen show that separate analyses of local and systemic effects are required in this model.

## 6 Literaturverzeichnis

Afshar, R., B. D. Medoff, and A. D. Luster, 2008, Allergic asthma: a tale of many T cells: *Clin.Exp.Allergy*, v. 38, no. 12, p. 1847-1857.

Agarwal, S., and A. Rao, 1998, Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation: *Immunity*, v. 9, no. 6, p. 765-775.

Anderson, G. P., 2008, Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease: *Lancet*, v. 372, no. 9643, p. 1107-1119.

Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao, 2006, Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 24, p. 607-656.

Antequera, F., 2003, Structure, function and evolution of CpG island promoters: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 60, no. 8, p. 1647-1658.

Anway, M. D., A. S. Cupp, M. Uzumcu, and M. K. Skinner, 2005, Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility: *Science*, v. 308, no. 5727, p. 1466-1469.

Asher, M. I., S. Montefort, B. Bjorksten, C. K. Lai, D. P. Strachan, S. K. Weiland, and H. Williams, 2006, Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys: *Lancet*, v. 368, no. 9537, p. 733-743.

Aune, T. M., L. A. Penix, M. R. Rincon, and R. A. Flavell, 1997, Differential transcription directed by discrete gamma interferon promoter elements in naive and memory (effector) CD4 T cells and CD8 T cells: *Mol.Cell Biol.*, v. 17, no. 1, p. 199-208.

Bach, J. F., 2002, The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases: *N.Engl.J.Med.*, v. 347, no. 12, p. 911-920.

Bahadori, K., M. M. Doyle-Waters, C. Marra, L. Lynd, K. Alasaly, J. Swiston, and J. M. FitzGerald, 2009, Economic burden of asthma: a systematic review: *BMC.Pulm.Med.*, v. 9, p. 24.

Barnes, P. J., 2008, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: *J.Clin.Invest*, v. 118, no. 11, p. 3546-3556.

Bateman, E. D. et al., 2008, Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary: *Eur.Respir.J.*, v. 31, no. 1, p. 143-178.

Berger, S. L., 2007, The complex language of chromatin regulation during transcription: *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 407-412.

Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory: *Genes Dev.*, v. 16, no. 1, p. 6-21.

- Bird, A., 2007, Perceptions of epigenetics: *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 396-398.
- Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, and S. L. Reiner, 1998, Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle: *Immunity*, v. 9, no. 2, p. 229-237.
- Blumer, N., S. Sel, S. Virna, C. C. Patrascan, S. Zimmermann, U. Herz, H. Renz, and H. Garn, 2007, Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring: *Clin.Exp.Allergy*, v. 37, no. 3, p. 348-357.
- Borish, L. C., and J. W. Steinke, 2003, 2. Cytokines and chemokines: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 111, no. 2 Suppl, p. S460-S475.
- Boyce, J. A., and K. F. Austen, 2005, No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models: *J.Exp.Med.*, v. 201, no. 12, p. 1869-1873.
- Braat, H., B. J. van den, T. E. van, D. Hommes, M. Peppelenbosch, and D. S. van, 2004, *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function: *Am.J.Clin.Nutr.*, v. 80, no. 6, p. 1618-1625.
- Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, L. Grize, U. Neu, F. H. Sennhauser, H. S. Varonier, J. C. Vuille, and B. Wuthrich, 1999, Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution: *Clin.Exp.Allergy*, v. 29, no. 1, p. 28-34.
- Casalta, E., and M. C. Montel, 2008, Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus: *Int.J.Food Microbiol.*, v. 126, no. 3, p. 271-273.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl, 2003, Conversion of peripheral CD4+: *J.Exp.Med.*, v. 198, no. 12, p. 1875-1886.
- Chu, H. W., J. M. Honour, C. A. Rawlinson, R. J. Harbeck, and R. J. Martin, 2003, Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice: *Infect.Immun.*, v. 71, no. 3, p. 1520-1526.
- Conrad, M. L. et al., 2009, Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78: *J.Exp.Med.*, v. 206, no. 13, p. 2869-2877.
- Cortes-Perez, N. G., S. Ah-Leung, L. G. Bermudez-Humaran, G. Corthier, P. Langella, J. M. Wal, and K. del-Patient, 2009, Allergy therapy by intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* Producing bovine beta-lactoglobulin: *Int.Arch.Allergy Immunol.*, v. 150, no. 1, p. 25-31.
- Couper, K. N., D. G. Blount, and E. M. Riley, 2008, IL-10: the master regulator of immunity to infection: *J.Immunol.*, v. 180, no. 9, p. 5771-5777.

- Debarry, J. et al., 2007, *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 119, no. 6, p. 1514-1521.
- Doganci, A., K. Sauer, R. Karwot, and S. Finotto, 2005, Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice: *Clin.Rev.Allergy Immunol.*, v. 28, no. 3, p. 257-270.
- Ege, M. J. et al., 2006, Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 117, no. 4, p. 817-823.
- Ege, M. J. et al., 2008, Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 122, no. 2, p. 407-12, 412.
- Erb, K. J., J. W. Holloway, A. Sobeck, H. Moll, and G. G. Le, 1998, Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia: *J.Exp.Med.*, v. 187, no. 4, p. 561-569.
- Feinberg, A. P., 2007, Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease: *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 433-440.
- Fischer, K., K. Stein, A. J. Ulmer, B. Lindner, H. Heine, and O. Holst, 2011, Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2: *Glycobiology*.
- Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki, and T. F. Gajewski, 1993, Differential regulation of murine T lymphocyte subsets: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 11, p. 29-48.
- Floess, S. et al., 2007, Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells: *PLoS.Biol.*, v. 5, no. 2, p. e38.
- Fraga, M. F. et al., 2005, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 102, no. 30, p. 10604-10609.
- Fu, L. H., B. Cong, Y. F. Zhen, S. J. Li, C. L. Ma, Z. Y. Ni, G. Z. Zhang, M. Zuo, and Y. X. Yao, 2007, [Methylation status of the IL-10 gene promoter in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients]: *Yi.Chuan*, v. 29, no. 11, p. 1357-1361.
- Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky, 2008, The development of allergic inflammation: *Nature*, v. 454, no. 7203, p. 445-454.
- Gehring, M., W. Reik, and S. Henikoff, 2009, DNA demethylation by DNA repair: *Trends Genet.*, v. 25, no. 2, p. 82-90.
- Georas, S. N., F. Rezaee, L. Lerner, and L. Beck, 2010, Dangerous allergens: why some allergens are bad actors: *Curr.Allergy Asthma Rep.*, v. 10, no. 2, p. 92-98.
- Greenfeder, S., S. P. Umland, F. M. Cuss, R. W. Chapman, and R. W. Egan, 2001, Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease: *Respir.Res.*, v. 2, no. 2, p. 71-79.

- Gutierrez, M. I., A. K. Siraj, H. Khaled, N. Koon, W. El-Rifai, and K. Bhatia, 2004, CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer: *Mod.Pathol.*, v. 17, no. 10, p. 1268-1274.
- Hark, A. T., C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse, and S. M. Tilghman, 2000, CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus: *Nature*, v. 405, no. 6785, p. 486-489.
- Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra, 2005, Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 5, no. 4, p. 271-283.
- Heard, E., and C. M. Distech, 2006, Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome: *Genes Dev.*, v. 20, no. 14, p. 1848-1867.
- Heinrich, J., B. Hoelscher, B. Jacob, M. Wjst, and H. E. Wichmann, 1999, Trends in allergies among children in a region of former East Germany between 1992-1993 and 1995-1996: *Eur.J.Med.Res.*, v. 4, no. 3, p. 107-113.
- Hermann, A., S. Schmitt, and A. Jeltsch, 2003, The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 34, p. 31717-31721.
- Herold, G., 2010, *Innere Medizin: Verlag Arzt + Information*, p. 344.
- Herz, U., A. Braun, R. Ruckert, and H. Renz, 1998, Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness: *Clin.Exp.Allergy*, v. 28, no. 5, p. 625-634.
- Herz, U. et al., 1996a, The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma: *Immunol.Cell Biol.*, v. 74, no. 2, p. 209-217.
- Herz, U., U. Lumpp, A. Daser, E. W. Gelfand, and H. Renz, 1996b, Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses: *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 409, p. 25-32.
- Holgate, S. T., and R. Polosa, 2008, Treatment strategies for allergy and asthma: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, no. 3, p. 218-230.
- Hopfenspirger, M. T., and D. K. Agrawal, 2002, Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice: *J.Immunol.*, v. 168, no. 5, p. 2516-2522.
- Horsthemke, B., and J. Wagstaff, 2008, Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region: *Am.J.Med.Genet.A*, v. 146A, no. 16, p. 2041-2052.
- Humbert, M., S. R. Durham, P. Kimmitt, N. Powell, B. Assoufi, R. Pfister, G. Menz, A. B. Kay, and C. J. Corrigan, 1997, Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 99, no. 5, p. 657-665.
- Illingworth, R. et al., 2008, A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci: *PLoS.Biol.*, v. 6, no. 1, p. e22.

- Illingworth, R. S., and A. P. Bird, 2009, CpG islands--'a rough guide': *FEBS Lett.*, v. 583, no. 11, p. 1713-1720.
- Im, S. H., A. Hueber, S. Monticelli, K. H. Kang, and A. Rao, 2004, Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 45, p. 46818-46825.
- Imboden, M., A. Nieters, A. J. Bircher, M. Brutsche, N. Becker, M. Wjst, U. ckermann-Liebrich, W. Berger, and N. M. Probst-Hensch, 2006, Cytokine gene polymorphisms and atopic disease in two European cohorts. (ECRHS-Basel and SAPALDIA): *Clin.Mol.Allergy*, v. 4, p. 9.
- Jankovic, D., and G. Trinchieri, 2007, IL-10 or not IL-10: that is the question: *Nat.Immunol.*, v. 8, no. 12, p. 1281-1283.
- Jones, B., and J. Chen, 2006, Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development: *EMBO J.*, v. 25, no. 11, p. 2443-2452.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A. P. Wolffe, 1998, Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription: *Nat.Genet.*, v. 19, no. 2, p. 187-191.
- Kass, S. U., D. Pruss, and A. P. Wolffe, 1997, How does DNA methylation repress transcription?: *Trends Genet.*, v. 13, no. 11, p. 444-449.
- Klose, R. J., and A. P. Bird, 2006, Genomic DNA methylation: the mark and its mediators: *Trends Biochem.Sci.*, v. 31, no. 2, p. 89-97.
- Korthals, M., M. J. Ege, C. C. Tebbe, M. E. von, and J. Bauer, 2008, Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust: *J.Microbiol.Methods*, v. 73, no. 1, p. 49-56.
- Kotsimbos, A. T., and Q. Hamid, 1997, IL-5 and IL-5 receptor in asthma: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 92 Suppl 2, p. 75-91.
- Kruger, K., and F. C. Mooren, 2007, T cell homing and exercise: *Exerc.Immunol.Rev.*, v. 13, p. 37-54.
- Kuperman, D. A., X. Huang, L. L. Koth, G. H. Chang, G. M. Dolganov, Z. Zhu, J. A. Elias, D. Sheppard, and D. J. Erle, 2002, Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma: *Nat.Med.*, v. 8, no. 8, p. 885-889.
- Lack, G., H. Renz, J. Saloga, K. L. Bradley, J. Loader, D. Y. Leung, G. Larsen, and E. W. Gelfand, 1994, Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization: *J.Immunol.*, v. 152, no. 5, p. 2546-2554.
- Lambrecht, B. N., and H. Hammad, 2009, Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma: *Immunity.*, v. 31, no. 3, p. 412-424.
- Lander, E. S. et al., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome: *Nature*, v. 409, no. 6822, p. 860-921.

- Lee, C. G., A. Sahoo, and S. H. Im, 2009, Epigenetic regulation of cytokine gene expression in T lymphocytes: *Yonsei Med.J.*, v. 50, no. 3, p. 322-330.
- Lloyd, C. M., and C. M. Hawrylowicz, 2009, Regulatory T cells in asthma: *Immunity.*, v. 31, no. 3, p. 438-449.
- Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley, 2004, The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report: *Allergy*, v. 59, no. 5, p. 469-478.
- Mathur, M., K. Herrmann, X. Li, Y. Qin, J. Weinstock, D. Elliott, J. Monahan, and P. Padrid, 1999, TRFK-5 reverses established airway eosinophilia but not established hyperresponsiveness in a murine model of chronic asthma: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 159, no. 2, p. 580-587.
- Maziak, W., T. Behrens, T. M. Brasky, H. Duhme, P. Rzehak, S. K. Weiland, and U. Keil, 2003, Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany: *Allergy*, v. 58, no. 7, p. 572-579.
- Mehra, A., K. H. Lee, and V. Hatzimanikatis, 2003, Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations: *Biotechnol.Bioeng.*, v. 84, no. 7, p. 822-833.
- Mikovits, J. A. et al., 1998, Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, no. 9, p. 5166-5177.
- Miller, R. L., and S. M. Ho, 2008, Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 177, no. 6, p. 567-573.
- Moffatt, M. F. et al., 2007, Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma: *Nature*, v. 448, no. 7152, p. 470-473.
- Mosmann, T. R., and R. L. Coffman, 1989, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 7, p. 145-173.
- Murdoch, J. R., and C. M. Lloyd, 2009, Chronic inflammation and asthma: *Mutat.Res.*
- Murphy, K. P. T., and M. Walport, 2008, *Janeway's Immunobiology*: Garland Science.
- Nakajima, H., and K. Takatsu, 2007, Role of cytokines in allergic airway inflammation: *Int.Arch.Allergy Immunol.*, v. 142, no. 4, p. 265-273.
- Nardone, G., D. Compare, C. P. de, N. G. de, and A. Rocco, 2007, Helicobacter pylori and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis: *Dig.Dis.*, v. 25, no. 3, p. 225-229.
- Nials, A. T., and S. Uddin, 2008, Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge: *Dis.Model.Mech.*, v. 1, no. 4-5, p. 213-220.

- Nie, L., G. Wu, and W. Zhang, 2006, Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis: *Genetics*, v. 174, no. 4, p. 2229-2243.
- Ober, C., and S. Hoffjan, 2006, Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery: *Genes Immun.*, v. 7, no. 2, p. 95-100.
- Ohno, H., S. Tsunemine, Y. Isa, M. Shimakawa, and H. Yamamura, 2005, Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 suppresses total and antigen specific immunoglobulin E production in mice: *Biol.Pharm.Bull.*, v. 28, no. 8, p. 1462-1466.
- Peters, M. et al., 2006, Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness: *Thorax*, v. 61, no. 2, p. 134-139.
- Pohlers, D., A. Siegling, E. Buchner, C. B. Schmidt-Weber, E. Palombo-Kinne, F. Emmrich, R. Brauer, and R. W. Kinne, 2005, Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis: *Arthritis Res.Ther.*, v. 7, no. 3, p. R445-R457.
- Radon, K., V. Ehrenstein, G. Praml, and D. Nowak, 2004, Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood: an age-dependent relationship: *Am.J.Ind.Med.*, v. 46, no. 4, p. 349-356.
- Reik, W., 2007, Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development: *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 425-432.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter, 2001, Epigenetic reprogramming in mammalian development: *Science*, v. 293, no. 5532, p. 1089-1093.
- Renz, H., K. Bradley, J. Saloga, J. Loader, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand, 1993, T cells expressing specific V beta elements regulate immunoglobulin E production and airways responsiveness in vivo: *J.Exp.Med.*, v. 177, no. 4, p. 1175-1180.
- Repa, A. et al., 2003, Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy: *Vaccine*, v. 22, no. 1, p. 87-95.
- Riedler, J. et al., 2001, Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey: *Lancet*, v. 358, no. 9288, p. 1129-1133.
- Robinson, D. S., 2000, Th-2 cytokines in allergic disease: *Br.Med.Bull.*, v. 56, no. 4, p. 956-968.
- Romagnani, S., 2004, Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 113, no. 3, p. 395-400.
- Romagnani, S., 2006, Regulation of the T cell response: *Clin.Exp.Allergy*, v. 36, no. 11, p. 1357-1366.
- Russo, V. E. A. M. R. A. & A. D. e., 1996, Russo, V. E. A. M. R. A. & A. D. e. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury.

- Sakaguchi, S., 2011, Regulatory T cells: history and perspective: *Methods Mol.Biol.*, v. 707, p. 3-17.
- Salminen, S. et al., 1998, Demonstration of safety of probiotics -- a review: *Int.J.Food Microbiol.*, v. 44, no. 1-2, p. 93-106.
- Sanchez-Abarca, L. I. et al., 2010, Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting: *Blood*, v. 115, no. 1, p. 107-121.
- Saraiva, M., and A. O'Garra, 2010, The regulation of IL-10 production by immune cells: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 10, no. 3, p. 170-181.
- Schaub, B., J. Liu, S. Hoppler, I. Schleich, J. Huehn, S. Olek, G. Wieczorek, S. Illi, and M. E. von, 2009, Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 123, no. 4, p. 774-782.
- Schoenborn, J. R., M. O. Dorschner, M. Sekimata, D. M. Santer, M. Shnyreva, D. R. Fitzpatrick, J. A. Stamatoyannopoulos, and C. B. Wilson, 2007, Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma: *Nat.Immunol.*, v. 8, no. 7, p. 732-742.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, 2004, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions: *J.Leukoc.Biol.*, v. 75, no. 2, p. 163-189.
- Schubeler, D., M. C. Lorincz, D. M. Cimbora, A. Telling, Y. Q. Feng, E. E. Bouhassira, and M. Groudine, 2000, Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation: *Mol.Cell Biol.*, v. 20, no. 24, p. 9103-9112.
- Skadhauge, L. R., K. Christensen, K. O. Kyvik, and T. I. Sigsgaard, 2000, [Significance of genetic and environmental factors for asthma. A population-based study of 11.688 Danish twin pairs]: *Ugeskr.Laeger*, v. 162, no. 26, p. 3726-3729.
- Skapenko, A., G. U. Niedobitek, J. R. Kalden, P. E. Lipsky, and H. Schulze-Koops, 2004, Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10: *J.Immunol.*, v. 172, no. 10, p. 6427-6434.
- Soroosh, P., and T. A. Doherty, 2009, Th9 and allergic disease: *Immunology*, v. 127, no. 4, p. 450-458.
- Strachan, D. P., 1989, Hay fever, hygiene, and household size: *BMJ*, v. 299, no. 6710, p. 1259-1260.
- Takai, D., and P. A. Jones, 2002, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, no. 6, p. 3740-3745.
- Tost, J., 2010, DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker: *Mol.Biotechnol.*, v. 44, no. 1, p. 71-81.
- Traves, S. L., and L. E. Donnelly, 2008, Th17 cells in airway diseases: *Curr.Mol.Med.*, v. 8, no. 5, p. 416-426.

- Trinchieri, G., S. Pflanz, and R. A. Kastelein, 2003, The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses: *Immunity.*, v. 19, no. 5, p. 641-644.
- Ulrey, C. L., L. Liu, L. G. Andrews, and T. O. Tollefsbol, 2005, The impact of metabolism on DNA methylation: *Hum.Mol.Genet.*, v. 14 Spec No 1, p. R139-R147.
- Umlauf, D., Y. Goto, R. Cao, F. Cerqueira, A. Wagschal, Y. Zhang, and R. Feil, 2004, Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes: *Nat.Genet.*, v. 36, no. 12, p. 1296-1300.
- Vercelli, D., 2008, Discovering susceptibility genes for asthma and allergy: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, no. 3, p. 169-182.
- von Mutius E., C. Fritsch, S. K. Weiland, G. Roll, and H. Magnussen, 1992, Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison: *BMJ*, v. 305, no. 6866, p. 1395-1399.
- Vuillermin, P. J., A. L. Ponsonby, R. Saffery, M. L. Tang, J. A. Ellis, P. Sly, and P. Holt, 2009, Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease: *Allergy*, v. 64, no. 3, p. 348-353.
- Waddington, C. H., 1942, The epigenotype: *Endeavour*, p. 18-20.
- Waterland, R. A., and R. L. Jirtle, 2003, Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation: *Mol.Cell Biol.*, v. 23, no. 15, p. 5293-5300.
- Wegmann, M., H. Fehrenbach, A. Fehrenbach, T. Held, C. Schramm, H. Garn, and H. Renz, 2005, Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma: *Clin.Exp.Allergy*, v. 35, no. 10, p. 1263-1271.
- Wen, H. J., Y. C. Lin, Y. L. Lee, and Y. L. Guo, 2006, Association between cord blood IgE and genetic polymorphisms of interleukin-4, the beta-subunit of the high-affinity receptor for IgE, lymphotoxin-alpha, and tumor necrosis factor-alpha: *Pediatr.Allergy Immunol.*, v. 17, no. 7, p. 489-494.
- White, G. P., E. M. Hollams, S. T. Yerkovich, A. Bosco, B. J. Holt, M. R. Bassami, M. Kusel, P. D. Sly, and P. G. Holt, 2006, CpG methylation patterns in the IFNgamma promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics: *Pediatr.Allergy Immunol.*, v. 17, no. 8, p. 557-564.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T. Y. Neben, C. L. Karp, and D. D. Donaldson, 1998, Interleukin-13: central mediator of allergic asthma: *Science*, v. 282, no. 5397, p. 2258-2261.
- Wilson, C. B., E. Rowell, and M. Sekimata, 2009, Epigenetic control of T-helper-cell differentiation: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 9, no. 2, p. 91-105.
- World Health Organization, 2008, *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. Geneva: World Health Organization.

Wu, C., G. Yang, L. G. Bermudez-Humaran, Q. Pang, Y. Zeng, J. Wang, and X. Gao, 2006, Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice: *Int.Immunopharmacol.*, v. 6, no. 4, p. 610-615.

Yoder, J. A., C. P. Walsh, and T. H. Bestor, 1997, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites: *Trends Genet.*, v. 13, no. 8, p. 335-340.

Yoshimoto, T., K. Yasuda, H. Tanaka, M. Nakahira, Y. Imai, Y. Fujimori, and K. Nakanishi, 2009, Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells: *Nat.Immunol.*, v. 10, no. 7, p. 706-712.

Young, H. W. et al., 2007, Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 37, no. 3, p. 273-290.

Yssel, H., and H. Groux, 2000, Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases: *Int.Arch.Allergy Immunol.*, v. 121, no. 1, p. 10-18.

Zhu, J., and W. E. Paul, 2010, Heterogeneity and plasticity of T helper cells: *Cell Res.*, v. 20, no. 1, p. 4-12.

Zuhdi, A. M., F. M. Piazza, D. M. Selby, N. Letwin, L. Huang, and M. C. Rose, 2000, Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 22, no. 3, p. 253-260.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

5-Aza	5-Azacytidin
A	Adenin
<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
AK	Antikörper
ALEX	Allergien und Endotoxin
Al(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALB	Bagg Albino
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled device
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
CGI	CpG-Insel
CNS	conserved non-coding sequences
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DAMP	Damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ECHRS	European Community Respiratory Health Survey
EDTA	Ethylene Diamin Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszens-activated Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum

G	Guanin
GRAS	generally recognized as safe
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HS	Hypersensitive site
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.n.	Intranasal
i.p.	intraperitoneal
ISAAC	International study of Asthma and Allergies in Childhood
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LCR	Locus Control Region
MACS	Magnetic Bead Assisted Cell Sorting
MBD	Methyl CpG Binding Domain
MCh	Methacholin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MSR	Methylgruppen-sensitive Restriktionsenzyme
NaOH	Natriumhydroxid
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PRR	Pattern Recognition Receptor
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PAS	Perjodsäure-Schiff
PE	Phycoerythrin

RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
SAM	S-Adenosylmethionin
SCARPOL	Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptomes with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	single nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Receptor
Treg	regulatorische T-Zelle
U	Uracil
VE	vollentsalzt
VPT	Vacuum Prep Tool
VPW	Vacuum-Prep-Worktable
WHO	World Health Organisation

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome bei 13- bis 14-jährigen Jugendlichen .....	2
Abbildung 2:	Überblick über die asthmatische Früh- und Spätreaktion.....	5
Abbildung 3:	Interaktionen von Immunzellen im Rahmen der asthmatischen Entzündungsreaktion .....	7
Abbildung 4:	Mechanismus der DNA-Methylierung.....	12
Abbildung 5:	Mögliche Mechanismen der Transkriptionshinhibition durch DNA-Methylierung.....	14
Abbildung 6:	Mögliche Rolle epigenetischer Mechanismen als Bindeglied von genetischer Prädisposition und Umweltexposition in der Pathogenese des Asthma bronchiale .....	16
Abbildung 7:	Schema des Versuchsaufbaus zur Induktion und Analyse einer akuten allergischen Atemwegsentzündung und intranasaler <i>L. lactis</i> -Applikation .....	20
Abbildung 8:	Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen.....	22
Abbildung 9:	Prinzip des ELISA .....	30
Abbildung 10:	Prinzip des Flowcytomix-Kits.....	37
Abbildung 11:	Bisulfitmodifikation, PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung .....	44
Abbildung 12:	Pyrosequenzierung .....	51
Abbildung 13:	Einfluss der <i>L. lactis</i> -Behandlung auf die Atemwegsreagibilität	54
Abbildung 14:	Einfluss der <i>L. lactis</i> -Behandlung auf das zelluläre Infiltrat im Lungengewebe.....	55
Abbildung 15:	Einfluss der <i>L. lactis</i> -Behandlung auf die Zahl mukusproduzierender Becherzellen im Bronchialsystem – große Atemwege .....	56
Abbildung 16:	Einfluss der <i>L. lactis</i> -Behandlung auf die Zahl mukusproduzierender Becherzellen im Bronchialsystem – kleine Atemwege .....	57
Abbildung 17:	Muc5ac-mRNA-Konzentration im Lungengewebe .....	58
Abbildung 18:	Leukozytenzellzahlen in der bronchoalveolären Lavage.....	59

---

<b>Abbildung 19:</b>	<b>Zellzahlen der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage.....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 20:</b>	<b>OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum..</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 21:</b>	<b>mRNA-Konzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Lymphknotenzellen .....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 22:</b>	<b>Zytokinsekretion in OVA-stimulierter mononukleärer Lymphknotenzellen .....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 23:</b>	<b>mRNA-Konzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Milzzellen.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 24:</b>	<b>Zytokinkonzentrationen in OVA-stimulierten mononukleären Milzzellen.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 25:</b>	<b>Methylierung der proximalen Promotoren von IL-5 in T-Zellen bronchialer Lymphknoten .....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 26:</b>	<b>Methylierung der proximalen Promotoren von IL-10 in T-Zellen bronchialer Lymphknoten .....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 27:</b>	<b>Methylierung des proximalen IFN<math>\gamma</math>-Promotors in T-Zellen bronchialer Lymphknoten .....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 28:</b>	<b>DNA-Methylierung des proximalen IFN<math>\gamma</math>-Promotors in T-Zellen der Milz.....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 29:</b>	<b>Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten CD25<sup>+</sup>-Zellen und den schwächer methylierten CD25<sup>-</sup>-Zellen in Lymphknoten sowie in der Milz.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 30:</b>	<b>Differenz der mittleren Methylierung zwischen den stärker methylierten T-Zellen in der Milz und den schwächer methylierten T-Zellen bronchialer Lymphknoten. ....</b>	<b>82</b>

---

<b>Tabelle 1:</b>	<b>MCh-Exposition.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Primersequenzen der quantitativen PCR.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Primersequenzen für die Polymerasekettenreaktion der bisulfitbehandelten Proben.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Primerdaten der Sequenzierprimer.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN<math>\gamma</math>- Promotors zwischen CD25<sup>-</sup>-Zellen und CD25<sup>+</sup>-Zellen.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabelle 6:</b>	<b>Vergleich der Grund-Methylierung des proximalen IFN<math>\gamma</math>- Promotors zwischen CD4<sup>+</sup>Zellen aus bronchialen Lymphknoten und der Milz.....</b>	<b>81</b>

## 9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Daut, Feuser, Garn, Gotzen,  
Gudermann, Hertl, Klenk, Kann, Koolmann, Kroll, Lill,  
Lohhoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer,  
Oertel, Rausch, Renz, Röper, Rothmund, Schäfer, Seifart,  
Steiniger, Vogelmeier, Weihe, Werner, Westermann

in Poitiers:

Magnin, Hankard, Rouffineau

in Kassel:

Löser, Tegtmeyer, Hesterberg

in Fort-de-France:

Roudie

## **10 Curriculum vitae**

Die Seite 118 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## 11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz angefertigt. Ihm danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit die Dissertation in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Dr. R. Teich möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit danken, die zur Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit entscheidend beigetragen haben. Besonderer Dank gilt Dr. R. Teich für die Erstkorrektur des Manuskripts und das außerordentliche Engagement, dass trotz größerer räumlicher Distanz ein stetes Fortschreiten der Arbeit ermöglichte.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. H. Garn als Referent zur Verfügung zu stehen und insbesondere ihm und Frau Dr. Kesper für die konstruktive Kritik nach Durchsicht des Manuskripts und die Hilfe auf den letzten Metern.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung danke ich Anja Spies-Naumann, Thomas Ruppersberg, Steffi Achenbach und Andreas Hildenberg sowie allen übrigen technischen Mitarbeitern des Instituts.

Ein weiteres Dankeschön gilt Stephanie Brand für die wissenschaftlichen und technischen Ratschläge, wenn es manchmal nicht so richtig weiterging.

Ebenfalls danken möchte ich den „Mit-Doktoranden“ Lisa und Björn sowie den Humanbiologinnen Eva und Jenny für die abwechslungsreiche Zeit im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Freunden bedanken, die während der Fertigstellung dieser Arbeit stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte hatten.

Schließlich gilt natürlich besonderer Dank meiner Freundin Sara, unserem Sohn Joshua und meiner Familie, die mich in allen Situationen stets unterstützt haben und ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Molekulare Mechanismen der allergieprotektiven Wirkung von *Lactococcus lactis* im Mausmodell des akuten allergischen Asthma“

in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. H. Garn ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift