
Beschreibung eines potentiellen microRNA-basierten Biomarkers für allergisches Asthma

Jeremias Götschke



München 2018

Aus dem Comprehensive Pneumology Center,
des Helmholtz Zentrum München
Institut für Experimentelle Pneumologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
chem. Leiter: Prof. Dr. med. Oliver Eickelberg

Beschreibung eines potentiellen microRNA-basierten Biomarkers für allergisches Asthma

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jeremias Götschke
aus Freudenstadt
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

PROF. DR. MED. SUSANNE KRAUSS-ETSCHMANN
Berichterstatlerin

PROF. MATTHIAS GRIESE
PROF. KATJA RADON
Mitberichterstatler

DR. MED. KATRIN MILGER
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin

PROF. DR. MED. DENT. REINHARD HICKEL
Dekan

18.01.2018
Tag der mündlichen Prüfung

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Definition	2
1.1.3	Phänotypen	2
1.1.4	Histopathologie	3
1.1.5	T _H 2-Immunantwort des allergischen Asthmas	5
1.1.6	Allergisches Asthma im Mausmodell	7
1.2	Asthmadiagnostik	9
1.2.1	Limitationen der Standarddiagnostik	9
1.2.2	Angewandte Biomarker	9
1.2.3	Potenzielle Biomarker	11
1.3	MicroRNAs	12
1.3.1	Biosynthese und Funktion	12
1.3.2	Nomenklatur	14
1.3.3	MicroRNA und Asthma bronchiale	14
1.3.4	Extrazelluläre microRNA	16
1.3.5	MicroRNA als Biomarker	18
1.4	Zielsetzung	19
2	Versuchstiere, Material und Geräte	21
2.1	Versuchstiere	21
2.2	Material	21
2.3	Geräte und Software	26
3	Methoden	29
3.1	Murine Asthamamodelle	29
3.1.1	Tierhaltung	29
3.1.2	Chronisches Hausstaubmilben-induziertes Asthammodell	29
3.1.3	Akutes Ovalbumin-induziertes Asthammodell	31
3.1.4	Ende der Sensibilisierung und Anästhesie	32
3.1.5	Lungenfunktion	32
3.1.6	Murines Plasma und Vollblutausstrich	33
3.1.7	Töten der Versuchstiere in Narkose	33
3.1.8	Bronchoalveoläre Lavage	34
3.1.9	Histologische Beurteilung der Lungen	36

3.2	Statistik	41
3.2.1	Signifikanzniveau	41
3.2.2	Statistische Testverfahren	41
3.3	Biomarker Identifizierung	42
3.3.1	Abschätzung der Hämolyse	42
3.3.2	RNA Extraktion	42
3.3.3	Gel-Elektrophorese	44
3.3.4	RT-qPCR	46
3.3.5	Auswertung	53
3.3.6	ROC-Analyse	56
3.3.7	Kombination von Biomarkern	56
4	Ergebnisse	59
4.1	Beurteilung des Asthmaphänotyps der Asthmamodelle HDM I - III	59
4.1.1	Atemwegshyperreagibilität	59
4.1.2	Bronchoalveoläre Lavage	59
4.1.3	Differentialblutbild	62
4.1.4	Anteil der Becherzellen	64
4.1.5	Pulmonale Inflammation	65
4.2	Biomarker Identifizierung	68
4.2.1	Abschätzung der Hämolyse	68
4.2.2	Qualitätskontrolle der RNA	68
4.2.3	MicroRNA Screening	70
4.2.4	Validierung der Screeningdaten	73
4.2.5	ROC-Analyse	77
4.2.6	Kombination von Biomarkern	78
4.2.7	Validierung der Biomarkerkombination	79
4.2.8	Expressionsverhalten der microRNAs	81
5	Diskussion	83
5.1	Murine Asthmamodelle	83
5.2	Identifikationsstrategie potentieller Biomarker-microRNAs	83
5.3	Extrazellulär zirkulierende microRNAs	86
5.3.1	Herkunft der microRNAs	86
5.3.2	Interzelluläre Betrachtungsweise	86
5.4	Mögliche Effekte der microRNAs	87
5.4.1	T _H 2-Polarisation	87
5.4.2	Monozytendifferenzierung	89
5.4.3	Atemwegshyperreagibilität	89
5.4.4	Antiinflammatorische Effekte	90
5.4.5	Proinflammatorische Effekte	90
5.4.6	Reifung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	91
5.4.7	Antifibrotische Effekte	92
5.4.8	VEGF	92

5.5 Übertragung auf humane Proben	92
Zusammenfassung	95
Anhang	97
Literaturverzeichnis	107
Danksagung	119
Eidesstattliche Versicherung	121

Abbildungsverzeichnis

1.1	Weltweite Asthmaprävalenz	1
1.2	Mögliche Asthmaphänotypen	4
1.3	T _H 2-Polarisation	6
1.4	Pathophysiologische Bedeutung von T _H 2-Zellen	7
1.5	MicroRNA Biosynthese und Funktion	13
1.6	Extrazelluläre microRNA	17
3.1	Verschiedene HDM-Asthmamodelle	30
3.2	Schema der Asthmainduktion	31
3.3	BAL Aufbereitung	34
3.4	Neubauer Zählkammer	35
3.5	Verschiedene Zelltypen der BAL	35
3.6	Protokoll der histologischen Färbungen	37
3.7	Histologische Kriterien im Staging	40
3.8	Bestimmung des Becherzellanteils	40
3.9	Auswahl des geeigneten Testverfahrens	41
3.10	Protokoll der RNA-Isolation	43
3.11	Elektropherogramm zur Kontrolle der RNA-Extraktion	44
3.12	Protokoll der Gel-Elektrophorese	45
3.13	Reverse Transkription und qPCR	47
3.14	Fluoreszenzsignal einer qPCR	48
3.15	Schmelzkurvenanalyse	49
3.16	Protokoll der reversen Transkription	50
3.17	Protokoll der qPCR	51
3.18	Verteilung der C _t -Werte und microRNA-Quotienten	54
3.19	Auswahl der microRNA-Quotienten	55
4.1	Ergebnisse des Methacholintests	60
4.2	Unterschiede in der Lungenfunktion	60
4.3	Gesamtzellen der BAL	61
4.4	Zellunterschiede der BAL	62
4.5	Mikroskopische Bilder der BAL	63
4.6	Mikroskopische Bilder des Differentialblutbildes	63
4.7	Ergebnisse des Differentialblutbildes	64
4.8	Histologische Auswertung der Asthmarkerkmale	65
4.9	Mikroskopische Bilder der Becherzellen	66
4.10	Mikroskopische Bilder des Stagings	67

4.11	Abschätzung der Hämolyse	69
4.12	Hämolysereihe	69
4.13	P-Werte der microRNA-Quotienten des Screenings	71
4.14	Venn-Plot signifikanter Quotienten und Ergebnisse der Validierung, Teil 1 . .	74
4.15	Ergebnisse der Validierung, Teil 2	75
4.16	Ergebnisse der Validierung, Teil 2	76
4.17	ROC-Kurve der beiden microRNA-Quotienten mit der größten AUC	77
4.18	Festlegung der Kombinationen mittels ROC	79
4.19	Testwerte der erweiterten Validierungsgruppe	80
4.20	Testwerte externer Seren	80
4.21	Expressionsverhalten der microRNAs	81

Tabellenverzeichnis

2.1	Versuchstiere	21
2.2	Glas- und Plastikmaterial	21
2.3	Reagenzien	23
2.4	Oligonukleotide	24
2.5	Geräte und Software	26
3.1	Numerische Bezeichnung der HDM-Tiere	30
3.2	Zusammensetzung der Intrapitonealnarkose	32
3.3	Plasmagewinnung aus Vollblut	33
3.4	Programmierung des Gewebeeinbetters	38
3.5	Anfertigung von Schnitten	38
3.6	Histologische Bewertungsmerkmale	38
3.7	Abschätzung der Hämolyse	42
4.1	Hämolysewerte der Versuchsrunden	68
4.2	Entscheidungstabelle für das Screening	70
4.3	Signifikante microRNA-Quotienten aus dem Screening	72
4.4	Ausgewählte einzelne microRNAs aus dem Screening	72
4.5	AUC-Werte der microRNA-Quotienten	78
5.1	Einfluss der Quotienten auf die Expressionsänderung	85
.2	C _t -Werte der HDM-Tiere	97
.3	C _t -Werte der OVA Asthma- und Kontrollgruppe	99
.4	C _t -Werte der OVA Atopiegruppe	101
.5	C _t -Mittelwerte der Bestätigungstests	105
.6	Layout Serum/Plasma Fokus miRNA PCR Platten	106

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA Analysis of Variance

AUC Area Under the Curve

BAL Bronchoalveoläre Lavage

COPD Chronic Obstructive Pulmonary Disease

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

DNA Desoxyribonukleinsäure

FeNO Fraction of Exhaled Nitric Oxide

GINA Global Initiative for Asthma

GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HDM Hausstaubmilbenextrakt, engl. House Dust Mite

IgE Immunglobulin E

IgM Immunglobulin M

IL Interleukin

IVC individuell belüfteter Käfig

LNA Locked Nucleid Acids

LPS Lipopolysaccharid

LT Leukotrien

MHC Major Histocompatibility Complex

miR microRNA

miRISC microRNA-induced Silencing Complex

mRNA messenger RNA

NO Stickstoffmonoxid

NRQ normalisierte relative Quantität

- OVA** Ovalbumin
- PBS** Phosphat-gepufferte Salzlösung
- PFA** Paraformaldehyd
- qPCR** quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
- RKI** Robert-Koch-Institut
- RNA** Ribonukleinsäure
- ROC** Receiver Operating Characteristic
- RQ** relative Quantität
- RT** Reverse Transkription
- T_H1** Typ1-T-Helferzelle
- T_H2** Typ2-T-Helferzelle
- TNF** Tumor Nekrose Faktor
- TLR** Toll-like-Rezeptor
- VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einführung

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Epidemiologie

Nach aktuellen Schätzungen der GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) ist Asthma bronchiale mit ca. 300 Millionen Betroffenen, 5% der Weltbevölkerung, eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit. Die Mortalität beträgt 250.000 Personen pro Jahr. Die Prävalenz ist weltweit nicht überall gleich. Die höchste Prävalenz findet sich in Schottland (18,4%), die niedrigste in Indonesien (1,1%). Deutschland befindet sich mit 6,9% im Mittelfeld (Abbildung 1.1) [1].

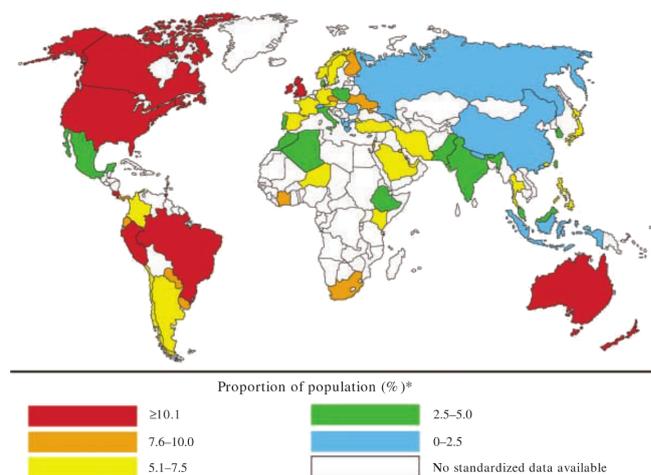


Abbildung 1.1 – Weltweite Asthmaprävalenz. Geographische Verteilung von Asthmaprävalenzen. Abbildung aus [1].

Vom Robert-Koch-Institut (RKI) erhobene Daten zeigten 2010 unter Erwachsenen eine 12-Monats-Prävalenz von 5,3% und eine Lebenszeitprävalenz von 8,8% für Asthma bronchiale [2]. Von Mai 2003 bis Mai 2006 hat das RKI eine Umfrage, den Kinder- und Jugendgesundheitsurvey, bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 0-17 Jahren durchgeführt. Asthma wurde bei 4,7% aller Kinder jemals festgestellt. Die 12-Monats-Prävalenz aller Kinder betrug

3,0%, wobei sich zudem noch Unterschiede bezüglich des Geschlechts und des Alters zeigten. Jungen sind zunächst häufiger betroffen als Mädchen und es gibt jeweils einen Häufigkeitsgipfel bei 11-13-jährigen Jungen (12-Monats-Prävalenz 5,5%) und 14-17-jährigen Mädchen (12-Monats-Prävalenz 4,2%) [3].

1.1.2 Definition

Die GINA definiert Asthma wie folgt:

„Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege in welcher viele Zellen und zelluläre Elemente eine Rolle spielen. Die chronische Entzündung ist mit einer Atemwegsüberempfindlichkeit assoziiert, die zu wiederkehrenden Episoden von Keuchen, Dyspnoe, Engegefühl in der Brust und Husten – vor allem in der Nacht und am frühen Morgen – führt. Diese Episoden sind gewöhnlicherweise mit einer ausgedehnten, aber variablen Atemwegsobstruktion innerhalb der Lunge assoziiert, die oft spontan oder durch Behandlungsmaßnahmen reversibel ist [4].“

1.1.3 Phänotypen

Unter dem Begriff *Phänotyp* versteht man ein durch Erbanlagen und Umwelteinflüsse geprägtes Erscheinungsbild eines Organismus [5]. Während Asthma früher als eine einzige Krankheitsentität angesehen wurde, so unterscheidet man heute verschiedene Asthmaphänotypen mit ihrer jeweils eigenen Ätiologie, Pathogenese, klinischen Manifestation, therapeutischen Erfolgsquote und Prognose [6]. Verschiedene Fachzeitschriften schlagen sogar vor, den verwirrenden Begriff *Asthma* gänzlich abzuschaffen [7].

Bis heute findet sich in den Lehrbüchern die Einteilung in zwei Phänotypen, die vor fast 70 Jahren in dieser Weise klassifiziert wurden [8]. Etwa die Hälfte der Asthmapatienten weist nach konventionellen Kriterien eine Atopie auf. Das bedeutet, dass allergenspezifisches Immunglobulin E (IgE) im Serum erhöht ist. Dies führte zu der Annahme, dass Asthma klinisch und damit indirekt auch mechanistisch in ein extrinsisches, von außen, und ein intrinsisches, von innen kommendes, unterscheidbar ist. Patienten mit extrinsischem Asthma entwickeln die Erkrankung meist in jungen Jahren, sind atopisch und haben identifizierbare Auslöser, andere allergische Erkrankungen wie Rhinitis oder Ekzem und häufig eine positive Familienanamnese bezüglich allergischer Erkrankungen. Intrinsisches Asthma entwickelt sich später im Leben, meist nach dem 40. Lebensjahr. Es ist assoziiert mit Acetylsalicylsäure-induziertem Asthma, jedoch ohne allergische Sensibilisierung. Die Pathobiologie des intrinsischen Asthmas wurde bisher nicht gut verstanden [9].

Doch diese Einteilung verliert zunehmend an praktischer Relevanz. In einer bereits 1989 veröffentlichten epidemiologischen Studie wurde gezeigt, dass der stets mit allergischem Asthma in Verbindung gebrachte erhöhte Serum-IgE-Spiegel eng mit der Prävalenz von selbstberichtetem Asthma verknüpft ist, allerdings unabhängig einer vorliegenden Atopie [10]. Auch fanden sich bei beiden Asthmatypen gleichermaßen eine T-Lymphozyten-Aktivierung und eine eosinophile Infiltration [11], sowie eine erhöhte Anzahl an hochaffinen IgE-Rezeptor-tragenden Zellen [12]. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich die Zytokinspiegel der Typ2-T-Helferzellen (T_H2-Zellen) zwischen atopischen und nicht-atopischen Asthmatikern nicht unterscheiden [13], was auf identische immunpathologische Vorgänge hinweist. Zum anderen hat diese Klassifizierung für die Therapieentscheidung wenig Konsequenz, da in den aktuell geltenden GINA-Leitlinien (März 2013) für die empfohlene Asthmatherapie hauptsächlich der Schweregrad der klinischen Manifestation eine Rolle spielt.

Aus diesen Gründen wird versucht, geeignetere Phänotypen zu finden [9, 14]. Dabei sollen Cluster-Analysen [15, 16, 17], aber auch immunbiologische Studien [18] helfen. Ein Beispiel einer möglichen Einteilung in unterschiedliche Phänotypen zeigt Abbildung 1.2. Eine endgültige anerkannte Klassifizierung in Phänotypen gibt es bisher nicht. Der im Titel dieser Dissertation verwendete Begriff *allergisches Asthma* beschreibt einen Phänotyp, der durch ein externes Allergen induziert wurde.

1.1.4 Histopathologie

In Bronchialbiopsien von Asthmapatienten zeigt sich eine mukosale Infiltration durch Entzündungszellen. Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten emigrieren von den Gefäßen in die Bronchialschleimhaut [19]. Lymphozyten kommen unabhängig des Asthmaschweregrads in großen sowie kleinen Atemwegen vor, was deren repräsentative Bestimmung anhand einer proximalen Bronchialbiopsie erlaubt. Eosinophile hingegen könnten relativ zum Schweregrad ausgeprägt sein [20]. Ebenso sind Mastzelldegranulationen und Anhäufungen von Kollagen neben der epithelialen Basalmembran zu beobachten [19]. Allerdings scheint das histologische Bild stark von dem ausgeprägten Asthmaphänotyp abhängig zu sein. So ist zum Beispiel das plötzlich auftretende tödliche Asthma (sudden-onset fatal asthma) immunhistologisch durch eine relative Armut an Eosinophilen charakterisiert, während dafür Neutrophile vorherrschen [21].

Ein weiteres histopathologisches Merkmal ist ein Gewebsumbau, das sogenannte *airway remodelling*. Wie auch die Entzündungszellen selbst, setzen die mitinvolvierten Bronchialepithelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen Mediatoren, Zytokine und Chemokine frei. Dies führt zu strukturellen Veränderungen in der Bronchialwand, dessen Ausmaß positiv zur Schwere der Asthmaerkrankung korreliert [22]. Zu diesen Veränderungen gehören die Verdickung der Ba-

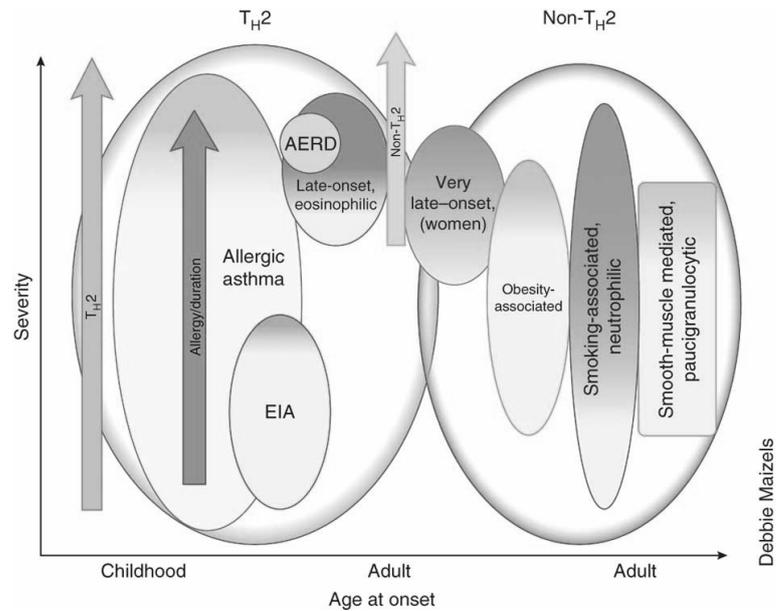


Abbildung 1.2 – Mögliche Asthmaphänotypen. Theoretische Einteilung der sich herauskristallisierenden Asthmaphänotypen, basierend auf der Unterscheidung in T_H2-Asthma und Nicht-T_H2-Asthma. T_H2-Asthma besteht sowohl aus frühauftretendem (early-onset allergic asthma) und spätaufretendem (late-onset) Asthma über eine Spannweite von Schweregraden (Severity). Es ist wahrscheinlich, dass die Mehrzahl des frühauftretenden allergischen Asthmas mild ist, aber eine steigende Komplexität von Immunprozessen zu einer schwerwiegenderen Form führen kann. Spätaufretendes eosinophiles Asthma ohne traditionelle allergische Elemente und Acetylsalicylsäure-induziertes Asthma (AERD) sind eher schwerwiegend, während belastungsinduziertes Asthma (EIA) eine mildere Form von T_H2-Asthma darstellt. Nicht-T_H2 Asthma enthält sehr spätaufretendes (very late-onset), Übergewicht-assoziiertes (obesity-associated), Rauchen-assoziiertes (smoking-related) und neutrophiles (neutrophilic) Asthma und Asthma, bei dem die Betroffenen wenig Entzündung zeigen. Die Intensität der Farben repräsentiert die Verteilung des Schweregrades; die relative Größe der Kreise deutet auf den relativen Anteil der Betroffenen hin. Abbildung aus [9].

salmembran durch vermehrte Kollagenablagerung, die Hypertrophie und / oder Hyperplasie der glatten Bronchialmuskulatur, Gefäßalteration und -proliferation und eine erhöhte Anzahl an muzinproduzierenden Becherzellen [23, 24, 25, 26].

Die vaskulären Veränderungen beinhalten die Zunahme der Intima. Während der äußere Gefäßdurchmesser unverändert bleibt, geht die Hypertrophie der Intima zu Lasten des Gefäßlumens. Das Ausmaß der Intimaverdickung, das im Verhältnis zur Erkrankungsdauer steht, ist außerdem mit einer Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur assoziiert [27]. Für die gefäßspezifischen Veränderungen ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) verantwortlich, der in bronchoalveolären Spülungen asthmatischer Patienten erhöht vorkommt [28]. Eine erhöhte Sekretion von VEGF aus Fibroblasten ist nach Inhalation von Hausstaubmilbenextrakt (HDM) zu beobachten [29].

Die Hyperplasie von Becherzellen resultiert aus einer Transformation von sekretorischen

Zellen der distalen Luftwege. Diese reagieren auf HDM, ebenso wie auf T_H2 -Zytokine mit einer Synthese des Transkriptionsfaktors SPDEF (engl. SAM pointed domain-containing ETS factor), der die Differenzierung in Becherzellen erlaubt [30].

Allerdings scheint das airway remodelling nicht direkt mit der bronchialen Entzündungsreaktion zusammenzuhängen. So lässt sich das airway remodelling im Mausmodell auch ohne messbare eosinophile Entzündungszeichen generieren [31].

1.1.5 T_H2 -Immunantwort des allergischen Asthmas

Auf Antigene, das heißt körperfremde, molekulare Strukturen mit potentiell pathologischen Eigenschaften, kann das humane Immunsystem unterschiedlich reagieren. Eingeteilt werden kann die Immunantwort durch die Art von T-Helfer-Zelle (T_H -Zelle), die dabei vorrangig involviert ist. Asthma mit atopischen Merkmalen weist vor allem eine Beteiligung der T_H2 -Zelle auf (T_H2 -Polarisation), weshalb darauf näher eingegangen wird.

Nach aktuellen Konzepten wird ein Antigen zuerst von bronchialem Epithel wahrgenommen [32]. Verantwortliche Sensoren sind Toll-like-Rezeptoren. Dabei handelt es sich um die Schlüsselkomponente des angeborenen Immunsystems [33]. Toll-like-Rezeptoren erkennen molekulare Muster pathogener Allergene, woraufhin die Zelle proallergische Zytokine ausschüttet (Thymic stromal lymphopoietin, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-25 und IL-33) [34]. Dies führt zur Migration von Entzündungszellen, unter anderem dendritischer Zellen [35]. Dendritische Zellen sind nicht konstitutiv von Geburt an in der tracheobronchialen Schleimhaut vorhanden. Vielmehr wird ihr pulmonales Auftreten durch infektiöse Stimuli ausgelöst [36]. GM-CSF, der sowohl vom Bronchialepithel als auch von Entzündungszellen freigesetzt wird, führt zur Reifung der aus dem Knochenmark migrierten dendritischen Zellen zu vollständig kompetenten Antigen-präsentierenden Zellen [37]. Dendritische Zellen exprimieren – wie auch das Bronchialepithel – Toll-like-Rezeptoren. Dadurch haben sie die Möglichkeit, Allergene aufzunehmen, diese in kleine Peptide zu prozessieren und sie anschließend durch den Major Histocompatibility Complex (MHC) I / II gegenüber T-Zell-Rezeptoren von naiven T_H -Zellen zu präsentieren [38].

Im Rahmen der allergischen Sensibilisierung differenzieren die naiven T_H -Zellen großteils zu T_H2 -Zellen. Während für die Entwicklung zu T_H1 -Zellen Interferon- γ vorhanden sein muss, ist für die T_H2 -Differenzierung IL-4 obligatorisch. Jedoch bleibt die Herkunft dieses Zytokins bisher unklar [39]. Zwei Theorien ranken sich um die Frage nach der Quelle von IL-4. Die erste ist, dass eine T_H2 -Immunantwort automatisch auftritt, falls keine T_H1 - oder T_H17 -begünstigenden Zytokine vorhanden sind oder wenn nur eine schwache Interaktion zwischen dem MHC-II-Rezeptor der dendritischen Zelle und dem T-Zell-Rezeptor herrscht. Dies resultiert in der IL-4-Produktion durch naive $CD4^+$ -T-Zellen [35]. Die zweite Theorie lässt das

benötigte IL-4 von akzessorischen Zellen kommen, besonders Mastzellen, basophile Granulozyten oder natürliche Killerzellen [40].

Liegt nun eine Bindung zwischen einer dendritischen Zelle mit präsentiertem Allergenprodukt an dessen MHC-II-Rezeptor und dem T-Zell-Rezeptor vor und ist Interleukin-4 anwesend, ändert sich das Expressionsverhalten der T_H -Zelle. Der Transkriptionsfaktor STAT6 induziert die Expression von GATA3. Dieses bewirkt wiederum, dass der Locus für das IL-4-Gen für die Transkription zugänglich wird. Mit der nun erlangten Fähigkeit IL-4 zu produzieren ist die T_H2 -Differenzierung abgeschlossen (Abbildung 1.3) [41].

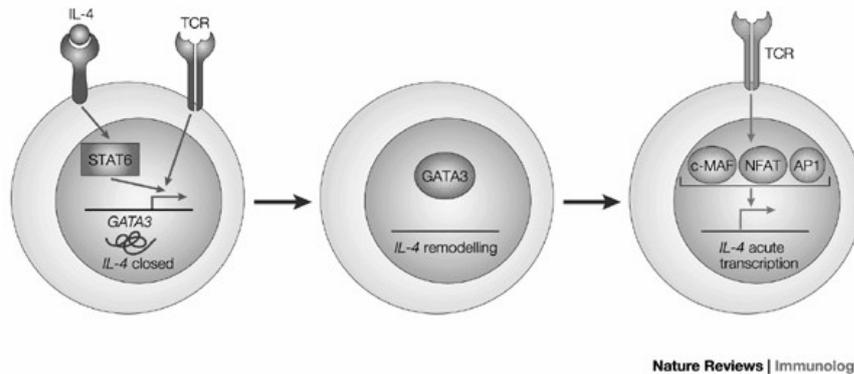


Abbildung 1.3 – T_H2 -Polarisation. Eine naive T_H -Helfer-Zelle reguliert unter dem Einfluss von IL-4 und Antigen, präsentiert durch den T-Zell-Rezeptor (TCR), die GATA3-Expression nach oben. Das GATA3-Protein induziert eine Umformung des IL-4 Locus, was für eine komplett differenzierte T_H2 -Zelle charakteristisch ist. Abbildung aus [41].

Nach erfolgter Differenzierung verbleiben einige der T_H2 -Zellen an der Bronchialschleimhaut, um die T_H2 -Immunantwort durch Interaktionen mit den dendritischen Zellen aufrecht zu halten [42], die mit ihren Fortsätzen Kontakt zum Lumen bewahren [43]. Andere wandern in die angrenzenden Lymphknoten. Dort begünstigt deren Freisetzung von IL-4 in den B-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel von Immunglobulin M (IgM) zu IgE [44, 37]. Mit Antigen besetzte IgE-Antikörper werden von den hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf den Mastzellen erkannt. Dies führt zu deren Aktivierung und darauffolgender Degranulation von proinflammatorischen Mediatoren [45]. Dazu gehören Histamin, Cysteinyl-Leukotriene und Prostaglandin D₂, das wiederum zu einer zusätzlichen Rekrutierung von Eosinophilen und T_H2 -Zellen führt [46]. Weitere Effekte zeigt IL-4 in der Bronchialmuskulatur, wo es unter anderem die Synthese von Eotaxin, einem Chemokin zur Anlockung eosinophiler Granulozyten, stimuliert [47]. Zudem ist es an der Metaplasie des Epithels zu Becherzellen involviert [48].

T_H2 -Zellen produzieren neben IL-4 mehrere T_H2 -typische Zytokine (Abbildung 1.4). Dazu gehören jene, die in der näheren Umgebung des IL-4-Gens auf Chromosom 5q31 angelegt sind. Es handelt sich um IL-3, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF [49]. IL-13 hat ähnliche Effek-

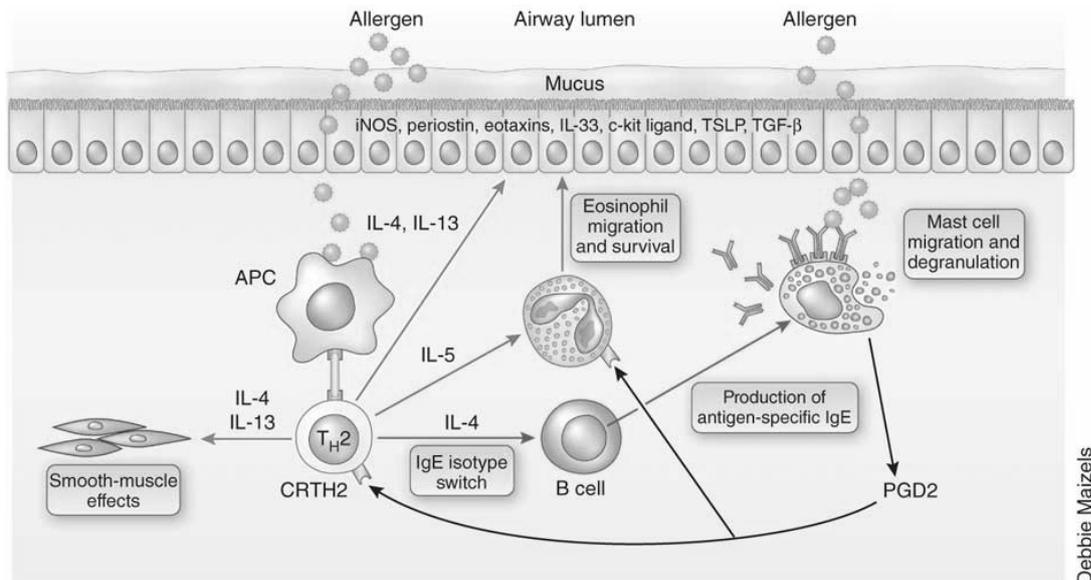


Abbildung 1.4 – Pathophysiologische Bedeutung von T_H2 -Zellen. Zytokine von T_H2 -Zellen tragen zur eosinophilen und allergischen Entzündung bei und initiieren epitheliale sowie glattmuskuläre Veränderungen. APC, Antigen-präsentierende Zelle; CRTH2, chemoattractant receptor-homologous molecule exprimiert auf T_H2 -Zellen; iNOS, induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase; PGD2, Prostaglandin D2; TSLP, thymic stromal lymphoprotein. Abbildung aus [9].

te wie IL-4 [50, 51]. Zusätzlich hat IL-13 einen direkten Effekt auf die Bronchialmuskulatur. RhoA, ein monomeres GTP-Bindeprotein, ist ein Schlüsselprotein der glatten Muskelkontraktion. IL-13 ist für dessen Hochregulation verantwortlich [52].

IL-3 und IL-5 stimulieren die Produktion und Aktivierung von Eosinophilen [53, 54, 55]. Die daraufhin von den Eosinophilen freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren sind stark an der asthmatypischen Atemwegsentzündung beteiligt. Hierzu gehören Bronchialepithelschaden [56], Dysfunktion der cholinergen Nervenrezeptoren [57], bronchiale Hyperreagibilität und verstärkte Mukusproduktion [58].

IL-9 wird nicht direkt von T_H2 -Zellen produziert, sondern von T_H9 -Zellen. Diese T_H -Untergruppe differenziert sich unter Einfluss von IL-4 und Transforming Growth Factor β leicht aus T_H2 -Zellen [59]. IL-9 stimuliert unter anderem die T-Zell-Proliferation, die IgE-Produktion von B-Zellen und das Mastzellwachstum und -überleben [60].

1.1.6 Allergisches Asthma im Mausmodell

Asthma ist eine überwiegend humane Erkrankung, welche bei Tieren selten vorkommt. In der Veterinärmedizin ist zwar bekannt, dass zum Beispiel Katzen [61] und Pferde [62] ein mit dem Menschen vergleichbares Asthma entwickeln können, jedoch zeigt keiner der häufig für

Asthmaversuche verwendete Modellorganismen (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hase) natürlicherweise eine asthmatische Erkrankung. Trotzdem sind einige dieser Modelle hilfreich, um mechanistische Grundlagen des allergischen Asthmas zu verstehen. Die Maus wird hierbei am häufigsten eingesetzt, da sie einfach zu züchten, zu halten und zu handhaben ist. Außerdem sind für die Maus bereits ein weites Spektrum an spezifischen Reagenzien verfügbar, die eine präzise Modellanalyse erlauben und gentechnisch veränderte Tiere sind erhältlich [63]. Ein häufig für Asthmodelle verwendete Mäuseinzuchtlinie ist Balb/c. Bekannt ist bereits, dass weibliche Tiere einen stärkeren Asthmaphänotyp ausprägen als männliche [64] und Jungtiere ab einem Alter von 2 bis 3 Wochen in der Lage sind, einen Asthmaphänotyp zu entwickeln [65].

Um eine dem allergischen Asthma pathobiologisch ähnliche Konstellation in der Maus hervorzurufen, gibt es zwei Typen von möglichen Induktionsmöglichkeiten: Akute und chronische allergische Modelle. Das Attribut akut wird für Modelle verwendet, welche asthmaähnliche, allergische Atemwegsentzündungen innerhalb weniger Tage (abhängig vom Protokoll) hervorrufen. Dabei sind für gewöhnlich mehrfache systemische Applikationen des Allergens in Kombination mit einem Adjuvans nötig. Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid stimulieren bekannterweise eine T_H2 -Reaktion des Immunsystems, wenn es einem Antigen ausgesetzt ist [66]. Prominentester Vertreter des akuten Typs ist das Ovalbumin (OVA)-induzierte Asthma [67]. Mit akuten Modellen lassen sich schnell entstehende Merkmale von humanem Asthma reproduzieren [66]. Die Ätiologie und den natürlichen Verlauf können sie jedoch nicht nachahmen, da sich dieser langsam in einem mehrstufigem Prozess entwickelt [63].

Daher werden chronische Modelle eingesetzt, in welchen mit humanem Asthma vergleichbare Lungenveränderungen langsam über mehrere Wochen unter einer kontinuierlichen intranasalen Applikation eines Allergens entstehen. Hierunter entwickeln sich auch Merkmale chronischer Lungenveränderungen wie zum Beispiel Aspekte des airway remodelling (Unterabschnitt 1.1.4) [68].

Obwohl das chronische Modell gegenüber dem akuten deshalb in mancher Hinsicht eine Verbesserung darstellt, gibt es noch viele Unterschiede zum humanen Asthma [66]. Ein Charakteristikum chronischem Asthmas ist die Zunahme der bronchialen glatten Muskulatur [69]. Sie tritt allerdings im Tiermodell nicht auf [70], es sei denn die Tiere werden einer sehr starken Antigendosierung exponiert [71]. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Entzündung im Tiermodell nicht auf die Atemwege begrenzt bleibt, sondern auch eine parenchymale und vaskuläre Inflammation zu beobachten ist [70]. Auch gibt es im Gegensatz zum humanen wenig bis keine Rekrutierung von Mastzellen in das Bronchialepithel [72]. Außerdem ist OVA kein typisches Allergen bei humanem Asthma. Deswegen wurden Modelle mit weiteren Allergenen wie beispielsweise HDM entwickelt. Trotzdem sind Erkenntnisse aus Tiermodellen

demnach nur bedingt auf den Menschen übertragbar.

1.2 Asthmediagnostik

1.2.1 Limitationen der Standarddiagnostik

Die Diagnose von Asthma erfolgt grundsätzlich auf der Basis der geschilderten Asthmasymptome. Meistens wird noch ein Lungenfunktionstest durchgeführt, um die reversible Atemwegsobstruktion und die bronchiale Hyperreagibilität bewerten zu können. Während bei älteren Kindern und Erwachsenen eine solche Lungenfunktionsmessung meist problemlos durchgeführt werden kann, ist dies bei Patienten mit mangelnder Kooperationsmöglichkeit schwierig. Meist handelt es sich hierbei um Säuglinge und Kleinkinder. Während der infektreichen Zeit des Jahres erkranken sie zwei- bis dreimal an einer viralen, obstruktiven Bronchitis, welche sich sehr schwer von einem Asthma bronchiale abgrenzen lässt. In der Regel kommt es zum vollständigen Ausheilen und die Kinder bleiben beschwerdefrei [73]. Jedoch entwickeln etwa 30% - 60%¹ dieser Kinder ein Asthma [74, 75]. Bei der betreffenden Patientengruppe bis zum Kleinkindalter handelt es sich damit zu Beginn häufig um rezidivierende obstruktive Ventilationsstörungen, verursacht durch Atemwegsinfektionen. Zur Abgrenzung zu einem Asthma bronchiale bestehen nur sehr vage Kriterien wie zum Beispiel „mehr als 3 Episoden mit pfeifenden Atemgeräuschen während der letzten 6 Monate“ [73].

Mit dem zunehmenden Bewusstsein, dass es sich bei Asthma bronchiale nicht um eine homogene Erkrankung, sondern vielmehr um eine Gruppe von heterogenen Subtypen bzw. Phänotypen handelt und dem anbrechenden Zeitalter der personalisierten Medizin, stellt sich außerdem die Frage, wie man eben jene Phänotypen diagnostizieren kann. Die Bronchoskopie inklusive Biopsien und die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) werden als Goldstandard angesehen, um die Atemwegsentzündung beurteilen zu können. Jedoch sind diese Diagnoseverfahren zu invasiv, um sie allgemein in der Standarduntersuchung einzusetzen [76, 77]. Eine Antwort darauf könnten geeignete Biomarker sein.

1.2.2 Angewandte Biomarker

Biomarker oder auch biologische Marker sind körperliche Zeichen oder Laborwerte, die im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen auftreten und mutmaßlich diagnostischen und/oder prognostischen Nutzen haben [78]. Lesko et al. schreiben einem geeigneten Biomarker folgende Eigenschaften zu [78]:

¹Das Risiko hängt vom Virus ab. Stärkster viraler Riskofaktor ist das Rhinovirus. Das Respiratory Syncytial Virus ist ebenfalls wichtig, jedoch weniger risikobehaftet [74].

- Klinisch relevant,
- sensitiv und spezifisch,
- zuverlässig,
- nichtinvasiv und
- einfach zu handhaben.

Bisher haben folgende Biomarker Einzug in die klinische Asthmadiagnostik erhalten.

Eosinophile im Sputum

Es besteht eine enge Beziehung zwischen den Zellen, die man in bronchialen Biopsien, bronchoalveolären Lavagen und im Sputum messen kann [79]. Deshalb ist die Sputuminduktion mit hypertoner Salzlösung eine gute Methode, um einen Einblick in die Art der Entzündung zu bekommen. Es lassen sich je nach Zellzusammensetzung vier verschiedene Subtypen kategorisieren. Einen eosinophilen, einen neutrophilen, sowie einen Mischtyp und einen paucigranulösen Typ mit wenigen Entzündungszellen [80]. Klinisch relevante Aussagen lassen sich bisher hauptsächlich anhand der Eosinophilen treffen. So korreliert die Frequenz der Asthmaanfälle bei Kindern mit dem Vorkommen von Eosinophilen [81]. Auch gibt es Anhaltspunkte dafür, dass der eosinophile Typ in der Behandlung besser auf Kortikosteroide anspricht [82].

Zusammenfassend können Eosinophile im Sputum ein hilfreicher Biomarker zur Asthmakontrolle sein. Ein Ansteigen der Eosinophilen deutet auf mögliche Asthma-Exazerbationen hin. Die Induktion von Sputum kann einfach bei Erwachsenen durchgeführt werden. Bei Kleinkindern kann es allerdings herausfordernd sein, eine angemessene Probe zu gewinnen [83].

Stickstoffmonoxid in expirierter Atemluft

Stickstoffmonoxid (NO) entsteht, wenn die Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase zu L-Citrullin katalysiert wird. Die Expression der NO-Synthase wird durch viele inflammatorische Zytokine induziert. Es ist unklar, welche Zellen genau für die erhöhte NO-Produktion verantwortlich sind, aber die Herkunft aus Bronchialepithelzellen und Eosinophilen ist am wahrscheinlichsten [84]. Bei vorliegender Asthmaerkrankung kann in der Expirationsluft eine prozentuale Erhöhung von NO (Fraction of Exhaled Nitric Oxide (FeNO)) festgestellt werden [85]. Dies ist jedoch nicht spezifisch für Asthma, da andere Erkrankungen ebenfalls mit einer

Entzündung der Atemwege einhergehen [73]. Zudem gibt es durch individuelle Basisaktivität der NO-Synthase und/oder unterschiedlich starke Beiträge nicht-entzündungsabhängiger Faktoren eine hohe Variabilität der FeNO, was die Aussagekraft einschränkt [86].

Hintergrund der FeNO-Messung zur Asthmakontrolle ist, dass eine hohe FeNO ein Hinweis auf eine stattfindende eosinophile Atemwegsentzündung sein kann und somit für das baldige Auftreten eines Asthmaanfalls spräche [87]. Dieser könnte dann mit einer temporären Verstärkung der Therapiemaßnahmen zu verhindern versucht werden. Doch Metaanalysen zeigen, dass eine Asthmakontrolle basierend auf FeNO-Messungen Exazerbationen weder verringert noch zu einer besseren Asthmakontrolle führt [88]. Trotzdem kann die FeNO eine Weichenstellung in der Therapieentscheidung sein. Eine erhöhte FeNO spricht für ein besseres Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide als auf Leukotrienrezeptorantagonisten [89].

1.2.3 Potenzielle Biomarker

Auf der Suche nach weiteren Biomarkern, die eine Asthmadignose erleichtern oder eine Einteilung in bestimmte Phänotypen oder Therapiemuster erlauben, sind einige heranreifende Biomarker zu nennen.

Periostin

Periostin ist ein matrizzelluläres Protein. Es wird in beschädigtem oder sich umformenden Gewebe vermehrt exprimiert und bindet extrazelluläre Matrixproteine [90]. IL-13 sorgt für dessen Hochregulation [91]. In einer Studie zur Asthmatherapie mit einem IL-13-Antikörper (Lebrikizumab) fiel auf, dass Patienten mit einem erhöhten Periostin-Spiegel im Blut besser auf die Therapie ansprachen [92]. Es wurde auch festgestellt, dass der Periostin-Spiegel mit der eosinophilen Atemwegsentzündung korreliert [93]. All dies verspricht einen möglichen Biomarker, der eine Aussage über die vorliegende Immunreaktion trifft und Wegweiser in der Therapie ist.

Flüchtige organische Verbindungen – „breathprints“

Exspirierte Atemluft enthält tausende, flüchtige organische Verbindungen, deren Muster – auch *breathprints* genannt – abhängig von vorliegenden Lungenerkrankungen variieren. Elektronische Geruchssensoren können diese Muster erkennen [94]. Diese „elektronischen Nasen“ sind in der Lage, Asthmapatienten sowohl von Gesunden zu unterscheiden [95] als auch von Patienten mit Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) [96]. Die Beurteilung der organischen Verbindungen im Expirat ist eine vielversprechende Methode mit hoher Benutzerfreundlichkeit. Bisher steht eine Validierung der klinisch relevanten Geruchsmuster in einer

großen Versuchsgruppe noch aus. Auch die Frage, inwieweit diese zur Therapieentscheidung beitragen, ist noch offen. Eine große europaweite Studie (U-BIOPRED) findet hierzu gegenwärtig statt [77].

Leukotrien E₄

Cysteinyl-Leukotrien (LT) C₄ und D₄ sind proinflammatorische Mediatoren, die an der Asthmapathogenese beteiligt sind. Sie können von verschiedenen Zellen freigesetzt werden. Dazu gehören Eosinophile, Mastzellen (vgl. Unterabschnitt 1.1.5) und Neutrophile. LTC₄ und LTD₄ werden im Plasma rasch zu dem weniger aktiven LTE₄ metabolisiert. Ein Teil des LTE₄ wird renal ausgeschieden [77]. Die Messung des im Urin vorkommenden LTE₄ ist eine sensitive und nicht-invasive Methode, um die Cysteinyl-Leukotrien-Produktion und dessen Veränderungen im gesamten Organismus zu bestimmen [97]. Hilfreich zeigt sich eine Bestimmung von LTE₄ im Urin, um das Therapieansprechen auf Leukotrien-Antagonisten vorherzusagen. Eine Aussage über die Schwere der Atemwegsentzündung oder die Lungenfunktion lässt sich damit allerdings nicht erzielen [98].

Die Suche nach Biomarkern ist noch lange nicht abgeschlossen. Mit der Entdeckung der microRNA (Abschnitt 1.3), deren Beteiligung an der Asthmapathogenese (Unterabschnitt 1.3.3) und die erfolgreiche Etablierung von microRNA-Biomarkern (Unterabschnitt 1.3.5) für andere Erkrankungen lassen sich eventuell auf diesem Feld neue Biomarker für Asthma etablieren.

1.3 MicroRNAs

MicroRNAs (miRs) sind kurze, 19-24 Nukleotide lange, nicht kodierende Ribonukleinsäuren (RNA), die messenger RNA (mRNA) durch mRNA-Degradation oder Verringerung der Translation regulieren können [99]. 1993 wurde sie zum ersten Mal beschrieben [100]. Computeranalysen lassen vermuten, dass mehr als 60% der humanen proteinkodierenden Gene von microRNAs reguliert werden können [101]. MicroRNAs sind für die Entwicklung von großer Bedeutung. Mäuseembryonen sterben, wenn sie keine microRNAs synthetisieren können [102].

1.3.1 Biosynthese und Funktion

Am Beginn der Biosynthese steht die Transkription des microRNA-Gens zur pri-microRNA (primary microRNA, Primärtranskript). Verantwortlich dafür sind die RNA Polymerase II [104] und RNA Polymerase III (Abbildung 1.5a) [105]. Schätzungsweise liegt die Hälfte der miR-Gene innerhalb der Introne von mRNA-Genen. Die übrigen befinden sich außerhalb oder

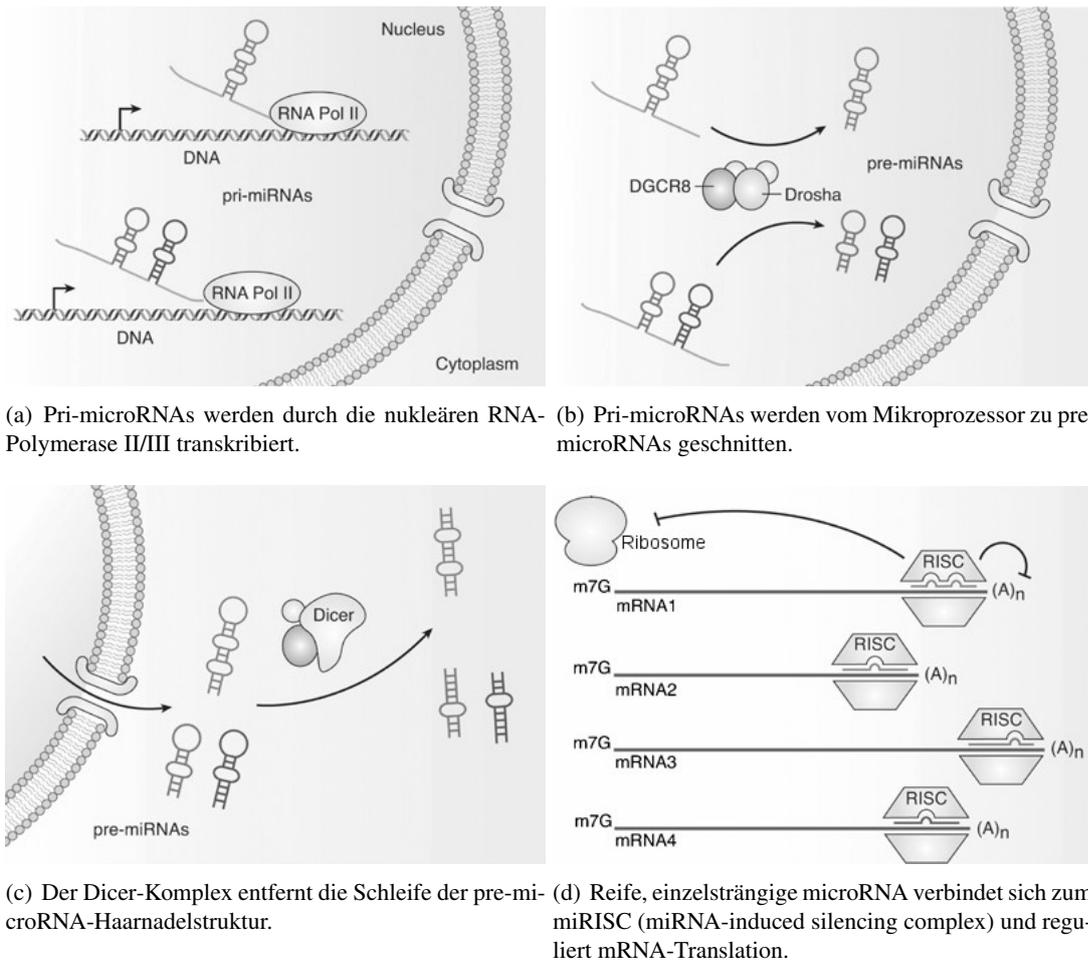


Abbildung 1.5 – MicroRNA Biosynthese und Funktion. Abbildung aus [103].

in Exonen untranslatierter Gene [106]. Über die Transkriptionsregulation ist bislang wenig bekannt. Es konnten aber auch schon Transkriptionsfaktoren für die Transkription der miRs identifiziert werden, die auch in der Transkription protein-kodierende Gene involviert sind [107]. Während manche pri-microRNAs die Information für eine einzige reife miR tragen, enthalten andere gleich eine Reihe von miRs. Die pri-microRNA formt unperfekte Haarnadel-, Stamm- und Schleifenstrukturen. Ein kernständiger Proteinkomplex, auch genannt Mikroprozessor, trennt die pre-microRNAs (precursor-microRNA) vom Primärtranskript ab. Dieser Mikroprozessor besteht unter anderem aus einer RNase, der Drosha Typ III RNase und einem Bindeprotein für doppelsträngige RNA, DGCR8 (Abbildung 1.5b) [103].

Pre-microRNAs sind etwa 65 Nukleotide lang und besitzen eine Haarnadelstruktur. Exportin-5, ein Protein zur Ausschleusung nukleärer Moleküle ins Zytoplasma, bedingt den Export

der pre-miRNA durch eine nukleäre Pore ins Zellplasma [108]. Dort sorgt ein weiterer Proteinkomplex mit einer RNase, die Dicer Typ III RNase dafür, dass aus pre-miRNAs reife miRs werden (Abbildung 1.5c) [109]. Meist dient ein Strang der pre-miRNA als reife RNA. Die reife microRNA verbindet sich mit einem letzten Proteinkomplex zum sogenannten microRNA-induced Silencing Complex (miRISC). Dieser Proteinkomplex besteht aus Argonautenproteinen, welche die Eigenschaft besitzen RNA zu binden [110]. Der miRISC kann nun eine partiell komplementäre Basenpaarung mit der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) einer mRNA eingehen [111]. Die Fähigkeit diese Bindung einzugehen wird weitgehend durch die freie Energie der ersten acht Nukleotide in der 5'-Region der microRNA bestimmt [112]. Durch die Bindung wird die Translation inhibiert und/oder eine Deadenylierung und schrittweise Degradierung der Ziel-mRNA initiiert (Abbildung 1.5d) [111]. In einzelnen Fällen wurde berichtet, dass die Translation gesteigert wurde [113].

1.3.2 Nomenklatur

Damit die Vielzahl an gefundenen microRNAs übersichtlich bleibt, werden folgenden Regeln in der Namensgebung der microRNAs beachtet [114].

MiRs erhalten eine fortlaufende Nummer. So war zum Zeitpunkt als dieser Text geschrieben wurde die humane microRNA miR-8089 die letzte aufgelistete miR. Die nächste microRNA wird miR-8090 genannt werden, vorausgesetzt deren Sequenz ähnelt nicht vorherigen microRNAs. Sollte dies der Fall sein, so bekommt sie bei identischer Sequenz denselben Namen. Allerdings wird bei der Herkunft aus einem anderen Genlokus ein Zusatz angegeben. So wurde zum Beispiel die humane miR-101 auf zwei unterschiedlichen Genloki, aber mit identischer Sequenz gefunden. In der Nomenklatur hat dies zur Folge, dass die zuerst entdeckte miR-101-1 und die zweite miR-101-2 genannt wird. Sollten sich die Sequenzen nur um ein oder zwei Basen unterscheiden, so wird statt einem numerischen Zusatz ein Buchstabe angehängt. Die humane miR-27a hat demnach eine ihr sehr ähnliche miR-27b.

Eine letzte Regel gibt es in dem Fall, dass aus einer pre-miRNA durch das Entfernen der Haarnadelschleife zwei reife und funktionierende microRNAs entstehen. Ist dies der Fall, so erhalten die miRs dieselbe Nummer, allerdings mit einem unterschiedlichen Zusatz. Die microRNA, die auf dem 5'-Arm der pre-miRNA lag, bekommt den Zusatz „-5p“, während die microRNA, die auf dem 3'-Arm der pre-miRNA lag, den Zusatz „-3p“ bekommt.

1.3.3 MicroRNA und Asthma bronchiale

In den vergangenen Jahren konnten einige microRNAs mit Asthma bronchiale in Verbindung gebracht werden.

Asthmarisiko. Ein Beispiel für posttranskriptionelle Genregulation durch microRNAs ist das humane Leukozyten Antigen G (HLA-G). Bestimmte Allele des HLA-G-Gens lassen eine Aussage über das Risiko als Kind an Asthma bronchiale zu erkranken zu. Ein G/C Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP: single nucleotide polymorphism) bei +3142 in der 3'-UTR der HLA-G-mRNA entscheidet, ob bestimmte microRNA eine stabile Bindung eingehen können oder nicht. Liegt an dieser Stelle ein Guanin (G) vor, kann eine signifikant stabilere Bindung mit den *miR-148a*, *miR-148b* und *miR-152* eingegangen werden. Dies führt zur Inhibition der HLA-G-Protein-Expression. Bei einer homozygoten Ausprägung von +3142G beobachtet man unter 6-jährigen Kindern von Asthma-erkrankten Müttern eine geringere Prävalenz als unter Gleichaltrigen mit gesunden Müttern [115].

Neben SNPs auf Protein-kodierenden Molekülen scheinen auch Punktmutationen innerhalb der microRNA selbst eine Rolle zu spielen. So scheint² ein SNP der pre-microRNA von *miR-146a* (rs 2910164 G/C) sowie ein SNP der pre-microRNA von *miR-149* (rs 2292832 C/T) das Asthmarisiko innerhalb einer chinesischen Population zu beeinflussen [116].

T_H2-Polarisation. *miR-21* spielt eine zentrale Rolle im Einstellen der T_H1- oder T_H2-Immunantwort auf ein Antigen. Ein gezieltes Ausschalten von miR-21 im Mausmodell führt zu einer Verminderung der Eosinophilie in der Lunge, sowie zu einem signifikant erhöhten Spiegel von Interferon γ , ein T_H1-Zytokin. Verantwortlich dafür ist eine Verringerung der Expression von IL-12 durch die Bindung von miR-21 an IL-12p35, welches durch den IL-12/Interferon γ -Pathway die Expression von Interferon γ negativ beeinflusst und sich daher T-Zellen vornehmlich zu T_H2-Zellen differenzieren [117].

Eine Studie legte die Bedeutung von *miR-126* in einem Mausmodell mit Hausstaubmilben-induziertem Asthma dar. Die Versuchsgruppe, die während der Sensibilisierungsphase noch zusätzlich intranasal einen selektiven miR-126-Antagomir erhielten, zeigte eine geringere Ausprägung des Asthma-Phänotyps. Die miR-126-Blockade führt zu einer erhöhten Expression von POU domain class 2 associating factor 1, der den Transkriptionsfaktor PU.1 aktiviert, welcher dann durch negative Regulation der GATA3-Expression die T_H2-Zell-Funktion beeinträchtigt [118].

T_H2-Zytokine Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde verwendet, um die Rolle von *miR-145* zu zeigen. Hierbei enthielten bereits mit Hausstaubmilbenextrakt sensibilisierte Tiere ein miR-145 Antagomir, worunter die proinflammatorischen Zytokine IL-13 und IL-5 und die Asthmasymptome abfielen. Es stellte sich heraus, dass die antiinflammatorische Wirkung von miR-

²Effekte von SNPs gelten heute nur als gesichert, wenn deren Effekt in mindestens 2 unabhängigen Kohorten validiert wurde.

145 Antagomir mit denen einer Steroidbehandlung vergleichbar ist [119].

Die Stimulation des humanen Bronchialepithels mit Tumor Nekrose Faktor α und dem proinflammatorischen Zytokin IL-4 führt zu einer Reduktion der translationalen Repression durch *let-7*, *miR-155* und *miR-29a*. Diese und noch andere Veränderungen führen wiederum zu einer Produktionssteigerung von Entzündungsmediatoren [120]. Die Familie der *let-7 microRNAs* inhibiert als ein Hauptregulationsfaktor die IL-13 Expression in IL-13-produzierenden Zellen [121]. Zur *miR-155* ist zudem bekannt, dass ein verringertes Expressionsniveau in CD4⁺ T-Zellen mit der Schwere einer allergischen Asthmaerkrankung korreliert. Es wird vermutet, dass *miR-155* eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Asthma spielt [122].

Mastzellen *MiR-221* und *miR-222* sind während der Mastzellaktivierung hochreguliert [123]. Sie tragen zur Regulation der Degranulation, der Zytokinproduktion und der Zellverankerung bei [124]. Eine Inhibition von *miR-221* verringert die Atemwegsentzündung bei Ovalbumin-induzierten Asthmatiermodellen [125].

Bronchialmuskulatur *miR-221* spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Proliferation der alveolären glatten Muskulatur. *miR-221* inhibiert dort die Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitoren p21WAF1 und p27kip1, führt damit zur Hyperproliferation und verstärkt die Freisetzung von IL-6 [126].

Neuere Erkenntnisse fügen dem hinzu, dass die Expression von RhoA negativ durch *miR-133a* reguliert wird, welche von IL-13 zumindest teilweise supprimiert wird. Damit wirkt *miR-133a* indirekt auf die Kontraktilität der Bronchialmuskulatur [127].

Weitere microRNAs. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin, durch *miR-106a* gehemmt wird. Die Durchführung eines etablierten Asthma-Modells mit *miR-106a*-Knockout-Mäusen zeigte zudem eine signifikante Verringerung der meisten Asthmarkerkmale [128].

VEGF lässt sich in asthmatischem Lungengewebe erhöht feststellen [129]. Nach einer Asthmasensibilisierung im Mausmodell lassen sich erhöhte Werte für VEGF in Alveolarmakrophagen messen. Erhöht man die *miR-20b* Konzentration in diesen Zellen, fällt das VEGF-Proteinlevel. Umgekehrt kann in normalen Alveolarmakrophagen durch Inhibition der *miR-20b* eine Steigerung von VEGF erzeugt werden [130].

1.3.4 Extrazelluläre microRNA

MicroRNAs sind jedoch nicht nur intrazellulär zu finden, sondern kommen auch extrazellulär vor und sind unter anderem in Serum, Plasma, Speichel und Urin nachweisbar [131]. Um

vor dem Abbau durch RNasen [132] geschützt zu sein, liegt die extrazelluläre microRNA in zwei verschiedenen Formen vor: Lipidbasiert in Vesikeln oder lipidfrei an Proteine gebunden (Abbildung 1.6) [133].

Der lipidfreie Teil der extrazellulären microRNA findet sich in einem Komplex mit Argonautenproteinen aus dem miRISC wieder. Für deren Auftreten gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen könnte es sich dabei um Nebenprodukte zugrunde gegangener Zellen handeln [134], zum anderen könnte die Möglichkeit bestehen, dass funktionierende miRISCs von vitalen Zellen freigesetzt werden [135]. Die lipidbasierte, in Vesikeln befindliche microRNA kann durch unterschiedliche Mechanismen entstehen. Es gibt Exosomen mit einem Durchmesser von 40-100 nm. Sie werden von multivesikulären Endosomen sezerniert [136]. Daneben gibt es die etwas größeren Mikrovesikel, die sich direkt von der Zelloberfläche ab-schnüren [137]. Wie auch bei den lipidfreien microRNAs besteht die Möglichkeit, dass microRNA auch in Apoptosekörperchen vorkommt [138].

Es gibt Anhaltspunkte, dass extrazelluläre microRNAs von anderen Zellen aufgenommen werden und diese dort die Translation beeinflussen [139, 138, 140]. Somit könnten microRNAs an der interzellulären Kommunikation beteiligt sein [141, 133].

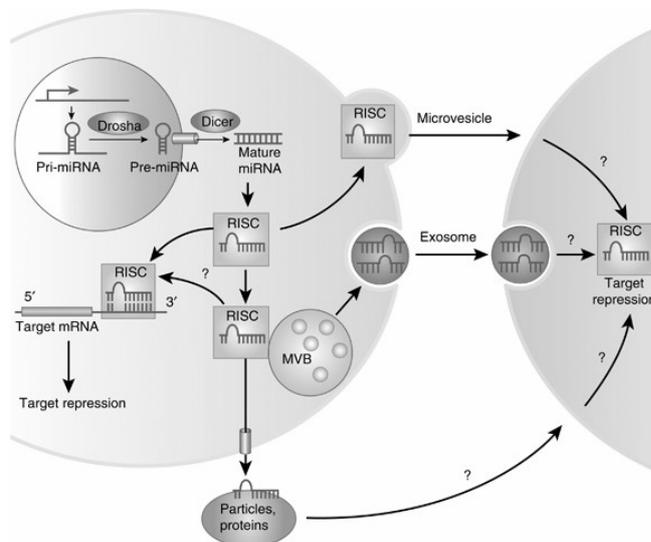


Abbildung 1.6 – Extrazelluläre microRNA kommen Lipid-basiert in Vesikeln (Exosomen, Mikrovesikel) oder lipidfrei mit Proteinen vor. Auch die Herkunft aus nekrotisierten oder apoptotischen Zellen ist möglich (hier nicht abgebildet). Abbildung aus [142].

1.3.5 MicroRNA als Biomarker

Extrazellulär zirkulierende microRNAs bieten einige potenzielle Vorteile als informative Biomarker im Vergleich zu Biomarkern auf Proteinbasis. Zum Beispiel hindert eine zu geringe Menge die Erkennung von Proteinen, während kleinste Mengen microRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und erkannt werden können. Hinzu kommt, dass Proteine verschiedenste post-translationale Modifikationen erhalten können, welche die Exaktheit der Messung beeinflussen. Dem gegenüber sind microRNAs sehr homogen [99]. Ein weiterer Vorteil ist, dass extrazelluläre microRNAs aus Körperflüssigkeiten meist leicht und wenig invasiv gewonnen werden können. Zudem ist für Serum nachgewiesen, dass microRNA-Spiegel innerhalb einer Spezies stabil, reproduzierbar und konsistent sind [143]. In der Handhabung zeichnen sich microRNAs durch ihre Robustheit aus. Sie sind bemerkenswert unempfindlich gegenüber enzymatischem Abbau, wiederholtem Einfrieren und Auftauen, längerem Aufbewahren bei Raumtemperatur und pH-Wert-Schwankungen [144, 145]. Die Tatsache, dass microRNAs meist hochkonserviert zwischen den Spezies zu finden sind, birgt den praktischen Nutzen, dass Forschungsergebnisse aus Modellorganismen einfacher auf die humane Situation übertragen werden können [146].

Bereits heute sind microRNAs als Biomarker einsetzbar. Veränderungen bestimmter microRNA-Spiegel in Plasma, Serum, Urin und Speichel wurden schon mit vorwiegend onkologischen Krankheiten in Verbindung gebracht [99]. MiR-141 im Plasma ermöglicht beispielsweise eine Aussage darüber, ob ein Prostatakarzinom vorliegt oder nicht [145]. Das Verhältnis von miR-126 zu miR-182 aus Urinproben erlaubt Blasenkarzinome zu erkennen [147]. Auch ist bekannt, dass erniedrigte Spiegel von miR-125a und miR-200a im Speichel mit einem oralen Plattenepithelkarzinom assoziiert werden können [148].

Auch wurden bereits Erkenntnisse zu Veränderungen der microRNA-Expression in Lymphozyten aus dem peripheren Blut gewonnen. Liu et al. fand eine Hochregulierung von miR-221 und miR-485-3p bei sechs pädiatrischen Asthmapatienten im Vergleich zu einer ebenso großen Kontrollgruppe. Gleichmaßen waren diese microRNAs auch in einem OVA-induzierten Mausmodell verändert [149].

1.4 Zielsetzung

Die hohe Prävalenz von allergischem Asthma bronchiale im Kindesalter und die Schwierigkeit, dieses im Vorschulalter von anderen Ursachen kindlichen Giemens zuverlässig zu unterscheiden, wirft die Frage nach ergänzenden diagnostischen Möglichkeiten auf. Eine sichere Unterscheidung hätte therapeutische, präventive sowie vermutlich auch psychologische Auswirkungen für die Betroffenen. Die gesicherte Diagnose von Asthma, zieht eine konsequente Inhalationstherapie nach sich, wobei gegebenenfalls frühzeitig Steroide eingesetzt werden. Zudem muss im Rahmen der Allergenreduktion von bestimmten Haustiere abgeraten werden. Kann dagegen ein Asthma ausgeschlossen werden, stünde der Haustierhaltung primär nichts im Weg und besorgte Eltern könnten hinsichtlich des selbstlimitierenden Verlaufs der vermutlich viralen Erkrankung beruhigt werden. Eine Inhalationstherapie wäre dabei nur vorübergehend bis zum Abklingen der Symptome notwendig.

MicroRNAs sind kleine regulatorische RNAs, die evolutionär stark konserviert sind. Zudem sind sie sehr stabil und in einfach zugänglichen Biomaterialien wie Serum oder Speichel nachweisbar. Dies eröffnet neue, zu prüfende Optionen hinsichtlich der Entwicklung von prädikativen Biomarkern für Asthma. Während die Lungenfunktionsprüfung stark von der Mitarbeit des Patienten abhängt, könnten Biomarker auf microRNA-Basis im Blut einen von der Mitarbeit des Patienten unabhängigen Hinweis auf die Erkrankung geben.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war daher im Tiermodell zunächst zu prüfen, welche microRNAs bei bereits vorliegendem Asthma im Serum verändert nachweisbar sind.

Im Einzelnen sollten die folgenden Fragen untersucht werden:

1. Nach welchem Protokoll kann zuverlässig ein murines Asthmodell mit HDM-Extrakt erzeugt werden?
2. Sind microRNA-Spiegel im Serum bei Vorliegen eines asthmatischen Phänotyps verändert?
3. Gibt es microRNA-Veränderungen, die unabhängig von dem auslösenden Allergen sind und somit in einem bereits vorhandenen OVA-Modell als auch in dem etablierten HDM-Modell zu finden sind?
4. Lassen sich damit sensibilisierte Individuen von allergischen unterscheiden?
5. Ist von veränderten microRNAs bereits bekannt, dass diese von pathobiologischer Bedeutung für Asthma bronchiale sind?

2 Versuchstiere, Material und Geräte

2.1 Versuchstiere

Tabelle 2.1 – Versuchstiere

HDM-Versuch I	weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 3 Wochen Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA
HDM-Versuch II	weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 8 Wochen Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA
HDM-Versuch III	weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 5 Wochen Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA

2.2 Material

Tabelle 2.2 – Glas- und Plastikmaterial

96-Well PCR-Platten	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Serum/Plasma Focus micro RNA PCR Panel I u. II EXIQON, Vedbaek, Denmark PCR 96-Well TW-MT-Platte, Low Profile, Semi Skirt, Eckschnitt H12 (712282) Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Biopsie-Eindeckkassetten	Histosette® I M490 Simport, Bernard-Pilon, Kanada
Einmal-Injektions-Kanüle	Sterican® 0.45 x 12 mm BL/LB, 26G x 1/2" B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Elektrophorese-Chips	RNA Pico Chips Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Färbeküvetten	Glaskasten mit Deckel aus SMG-Glas Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen Färbeeinsatz, SMG-Glas Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen Drahtbügel für Färbeeinsatz Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen
Käfige	VentiRack™, Typ CU-31 BioZone, Ramsgate, Kent, UK
Mikroskopische Deckgläser	24 x 65 mm, Glasdicke 0,13 - 0,17 mm R. Langenbrinck Labortechnik, Emmendingen
Neubauer Zählkammer	Zählkammer Neubauer improved Carl Roth GmbH & Co. KG
Objektträger	Superfrost® Plus Gerhard-Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen	Combitips advanced® 0,2ml EPPENDORF AG, Hamburg SafeSeal Tips® professional Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Plasmaröhrchen	Microvette® SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Safe-lock Tube 0,5 ml/1,5 ml, PCR-clean EPPENDORF AG, Hamburg DNA LoBind Tube 0,5 ml/1,5 ml, PCR-clean EPPENDORF AG, Hamburg
Seal Film für PCR	Adhesive Clear PCR Seal, Sheets Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Tabelle 2.3 – Reagenzien

2-Propanol	Rotipuran® $\geq 99,8\%$, p.a., ACS, ISO Carl Roth GmbH & Co. KG
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® ohne Calcium, ohne Magnesium Life Technologies™, Carlsbad, USA
Eindeckmittel	Entellan® (107960) Merck KGaA, Darmstadt
Hausstaubmilbenextrakt	Ganzkörperextrakt, Dermatophagoides pteronyssinus GREER®, Lenoir, USA
Histologische Färbung	Eosin Y (115935) Merck KGaA, Darmstadt Ethanol absolut SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim Mayers Hämatoxylin (109249) Merck KGaA, Darmstadt Natriumhydrogensulfit 39% (806356) Merck KGaA, Darmstadt Perjodsäure (100524) Merck KGaA, Darmstadt Salzsäure 32% (100319) Merck KGaA, Darmstadt Schiffisches Reagenz (109033) Merck KGaA, Darmstadt
Isofluran	Isofluran CP® CP-PHARMA®, Burgdorf
PCR-Reagenzien	miRCURY LNA™, SYBR® Green master mix EXIQON, Vedbaek, Denmark
Reverse Transkription Kit	miRCURY LNA™, Universal cDNA Synthesis Kit EXIQON, Vedbaek, Denmark

RNA-Isolation	miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids EXIQON, Vedbaek, Denmark
Schnell-Färbung	Diff-Quick Staining Set (REF 130832) Medion Grifols Diagnostics AG, Düringen, Schweiz
Trypanblau	Trypan Blue solution (T8154) SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Ultrareines Wasser	Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 2.4 – Oligonukleotide

Primer	microRNA LNA™ PCR primer sets EXIQON, Vedbaek, Denmark
	hsa-miR-15a-5p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
	hsa-miR-21-5p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
	hsa-miR-22-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
	hsa-miR-23a-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
	hsa-miR-25-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
	hsa-miR-27a-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
	hsa-miR-29a-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
	hsa-miR-29c-3p LNA™ PCR primer set, UniRT Zielsequenz: UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA

hsa-miR-93-5p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG

hsa-miR-130a-3p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU

hsa-miR-140-3p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: UACCACAGGGUAGAACCACGG

hsa-miR-148-3p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU

hsa-miR-191-5p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

hsa-miR-223-3p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA

hsa-miR-320a LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: AAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA

hsa-miR-342-3p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU

hsa-miR-425-5p LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA

hsa-miR-451a LNA™ PCR primer set, UniRT
Zielsequenz: AAACCGUUACCAUACUGAGUU

UniSp6, LNA™ Control Primer Set
Zielsequenz: spike-in, Universal cDNA Synthesis Kit

2.3 Geräte und Software

Tabelle 2.5 – Geräte und Software

Blutbild-Differenziergerät	Assistent Counter AC-12 Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Eismaschine	ZBE 70-35 ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Elektrophorese	2100 Bioanalyser Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gewebeeinbettter	MICROM STP 420D THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, USA
Inkubator 37°C	Heraeus BK 6160 THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, USA
Isofluran-Verdampfer	VIP 3000 Isoflurane vaporizer MDS Matrx, Orchard Park, USA
Kühlgeräte	COP 30, Kühlplatte MEDITE GmbH, Burgdorf Gefrierschrank -20°C LIEBHERR AG, Bulle, Schweiz Gefrierschrank -80°C, U725-G EPPENDORF AG, Hamburg Kühlschrank 4°C LIEBHERR AG, Bulle, Schweiz PCR-Cooler EPPENDORF AG, Hamburg
Mikroskope	Axio Imager 2 Carl Zeiss, Jena, Deutschland BX 51 mit Prior H101A motorized stage OLYMPUS, Tokyo, Japan Diaplan Wild Leitz GmbH, Wetzlar

Paraffin-Ausgießstation	MICROM EC 350-2 THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, USA
PCR-Geräte	Mastercycler® gradient EPPENDORF AG, Hamburg LightCycler® 480 II Instrument F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz
Pipetten	Research plus / Multipette® stream EPPENDORF AG, Hamburg
Plattformschüttler	Vibramax 110 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Plethysmograph	FinePointe™ series RC system Buxco Research Systems, Wilmington, USA
Präzisionswaage	572 KERN & SOHN GmbH, Balingen
Rotationsmikrotom	Hyrax M55 Carl Zeiss, Jena Schnitt-Transfer-System Carl Zeiss, Jena Cool Cut Carl Zeiss, Jena SEC 35, low profile blades MICROM, Walldorf
Software	2100 Expert Software for Bioanalyser Agilent Technologies, Santa Clara, USA AxioVision Carl Zeiss, Jena Excel 2010 Microsoft Corporation, Redmond, USA FinePointe™ Software Buxco Research Systems, Wilmington, USA

	NanoDrop 1000 3.8.0 Measurement Software THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, USA
	PRISM 5 for Windows GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
	R Version 3.0.1 The R Foundation for Statistical Computing
	Texworks Version 0.4.4 r.1003 (MikTeX 2.9) GNU General Public License
	Visiopharm Integrator System V. 3.6.5.0 VISIOPHARM, Hoersholm, Denmark
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, US.A
Spritze	Omnifix [®] -F 0,01 ml - 1 ml B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Trockentisch	Heating and Drying Table 13801 MEDAX GmbH & Co. KG, Rendsburg
Vortexmischer	MS3 basic IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifugen	Centrifuge 5430 mit 96-well Einsatz EPPENDORF AG, Hamburg
	MCF 2360 LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
	Mikro 200 / Universal 32 R Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zytozentrifuge	Shandon Cytospin 2 mit Zytotrichter THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, USA

3 Methoden

3.1 Murine Asthmodelle

3.1.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen (IVC) gehalten. Diese standen in einem isolierten Raum, der nur mit sauberer Schutzkleidung betreten werden durfte. Die Beleuchtung des Raums folgte einem invertierten 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Die Tiere wurden ad libitum mit üblichem Nagetierfutter und Wasser versorgt.

Das Tierversuchsvorhaben *Pränatale Prägung von Asthma und Klärung zugrunde liegender Mechanismen* (Gz.55.2-1-54-2532-101-10) wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.1.2 Chronisches Hausstaubmilben-induziertes Asthmodell

Weibliche Balb/c Mäuse wurden zufällig einer Versuchs- und einer Kontrollgruppe gleicher Größe zugeteilt. Es wurden mehrere Versuchsrunden unterschiedlicher Gruppengröße und Dauer durchgeführt, wie sie Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1 zu entnehmen sind. Um Verwechslungen zu vermeiden, bekamen die Tiere eine über die Versuchsrunden hinweg durchlaufende Nummerierung.

Die Provokation, im weiteren *Challenge* genannt, des Asthmaphänotyps erfolgte durch intranasale Applikation von Hausstaubmilbenextrakt (HDM). Die Challenge fand dreimal pro Woche werktags statt. Hierfür wurde HDM in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert, nach den Angaben in Abbildung 3.1, und den Versuchstieren auf die Nase pipettiert.

Die Mäuse der Kontrollgruppe bekamen parallel eine Applikation mit einem identischen Volumen reiner PBS. Da auch sehr junge Tiere an den Versuchsreihen teilnahmen, wurden die Applikationsvolumina angepasst.

Ablauf der intranasalen Applikation

Eine Sauerstoffflasche wurde mit ca. 1 bar Druck an einen Isofluran-Verdampfer angeschlossen. Der nun mit dem Inhalationsnarkotikum angereicherte Sauerstoff wurde in einen IVC mit

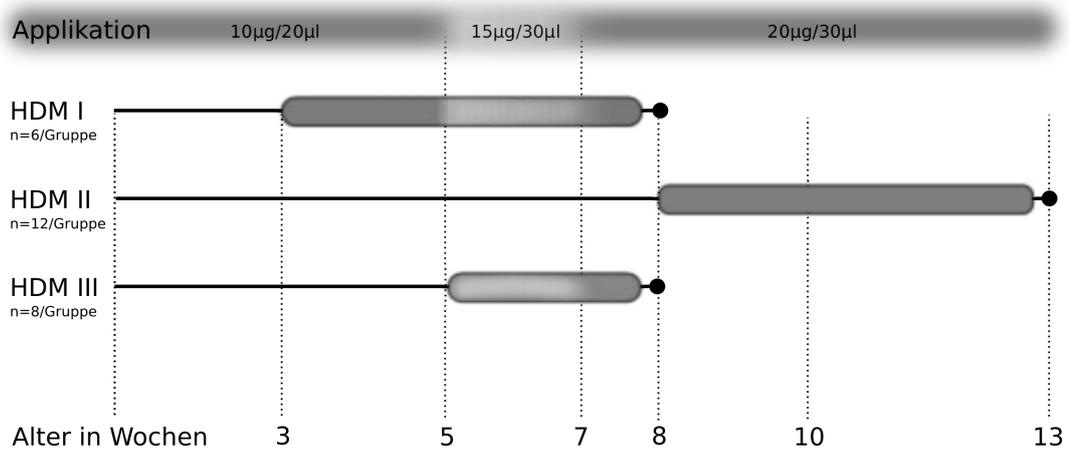


Abbildung 3.1 – Verschiedene HDM-Asthmamodelle. Jede Versuchsreihe (HDM I - III) unterschied sich in Dauer und/oder Beginn von den anderen. Die Applikationsdosis wurde dem Alter der Tiere angepasst.

Tabelle 3.1 – Numerische Bezeichnung der HDM-Tiere

Versuchsrunde	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	Applikationen
HDM I	1 - 6	7 - 12	15x in 5 Wochen
HDM II	13 - 24	25 - 36	15x in 5 Wochen
HDM III	37 - 44	45 - 52	9x in 3 Wochen

einem Fluss zwischen 150 und 200 ml/min weitergeleitet, in welchen die Tiere eines IVCs zuvor umgesetzt wurden. Nach einer Minute wurden die sedierten Tiere nacheinander für die intranasale Applikation entnommen (Abbildung 3.2). Zwischen jedem Tier sorgte das konsequente Schließen des Deckels dafür, dass die Isofluran-Konzentration für die verbliebenen Tiere hoch genug blieb. Weil bei dieser Arbeitsweise stets Isofluran aus dem Kunststoffkäfig entwich, wurde konsequent unter dem Abzug gearbeitet.

Mäuse atmen obligat nasal, weshalb ein dortiges Aufbringen von Flüssigkeit zur Aspiration führte. Der darauf folgende physiologische Hustenreflex konnte an deutlich sichtbaren Zwerchfellkontraktionen visuell verfolgt werden. Während dieser Zeit wurden die Mäuse an deren Nacken in aufrechter Position gehalten bis der Hustenreiz abklang. Daraufhin wurden sie bäuchlings auf ihrem Käfigstreu in Oberkörperhochlagerung platziert um ein zu starkes Abhusten in der Aufwachphase zu verhindern. Innerhalb weniger Minuten war die Wirkung des Inhalationsnarkotikums abgeklungen. Abschließend erfolgte eine inspektorische Kontrolle der Atmung und des Verhaltens der Tiere. Gleichmäßige Atembewegungen, Putzen des Felles und Bewegung im Käfig zeugten von einem guten Allgemeinzustand.

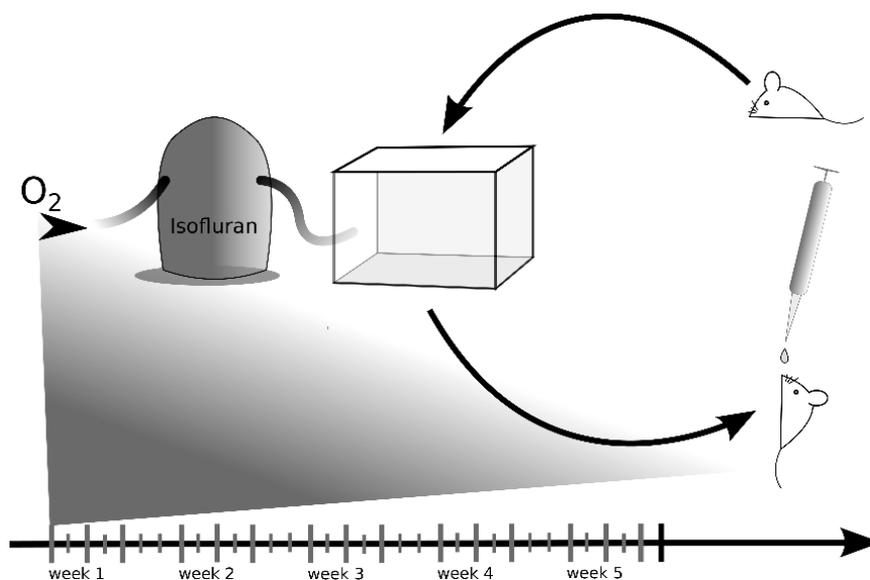


Abbildung 3.2 – Schema der intranasalen Applikation am Beispiel von HDM II

3.1.3 Akutes Ovalbumin-induziertes Asthmodell

Dieses Modell wurde im Vorfeld von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von PROF. DR. SUSANNE KRAUSS-ETSCHMANN etabliert und charakterisiert. Im Unterschied zum HDM-Modell wurden bei der Asthmainduktion mit Ovalbumin (OVA) mehrere intraperitoneale Applikatio-

nen durchgeführt. Es gab zwei Versuchsreihen (OVA I und II) mit jeweils 6 Tieren pro Gruppe. Die ebenfalls weiblichen Balb/c-Mäuse waren zu Beginn des Protokolls 8 Wochen alt. An Tag 7, 14, 28, 42 und 56 wurden der Versuchs- und Atopiegruppe eine intraperitoneale Applikation mit 1 µg OVA plus dem Adjuvans Aluminumhydroxid bzw. der Kontrollgruppe mit PBS plus Adjuvans verabreicht. Die intraperitoneale Injektion von OVA imitierte die Entwicklung einer Atopie. An Tag 70 und 71 erhielten die Tiere eine intranasale Provokation. Die Versuchsgruppe bekam 1%-Lipopolysaccharid-armes OVA, während die Kontroll- und Atopiegruppe PBS aspirierte.

3.1.4 Ende der Sensibilisierung und Anästhesie

Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach der letzten intranasalen Applikation mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert und auf eine Wärmeplatte gelegt bis der Zwischenzehenreflex vollständig erloschen war. Die Zusammensetzung der Narkose zeigt Tabelle 3.2. Pro 10 g Körpergewicht wurden 110 µl Narkotikum injiziert.

Tabelle 3.2 – Zusammensetzung der Intraperitonealnarkose

Substanz	Wirkstoffklasse	Menge in ml
Ketamin 10%	Analgetikum, Anästhetikum	1
Xylazin 2%	Sedativum	0,25
PBS	Salzlösung	6

Folgende Prozeduren wurden in dieser Reihenfolge bei jedem Tier durchgeführt: Methacholintest (Kapitel 3.1.5), Blutentnahme zur Plasmagewinnung und Blutausstrich (Unterabschnitt 3.1.6), letaler Blutentzug (Unterabschnitt 3.1.7), Gewinnung und Aufbereitung der bronchoalveoläre Lavage (Unterabschnitt 3.1.8), Lungenteilresektion mit histologischer Fixation links (Unterabschnitt 3.1.9) und Kryokonservierung der rechten Lunge in flüssigem Stickstoff für molekulare Analysen.

3.1.5 Lungenfunktion

Die narkotisierten Tiere wurden tracheotomiert, eine Trachealkanüle bis vor die Trachealbifurkation vorgeschoben und mit Seidenfaden fixiert. Nach fachgerechtem Anschließen des unbeschränkten Ganzkörperplethysmographen an die Trachealkanüle bekamen sie unter kontinuierlicher Resistancemessung über einen Vernebler PBS bzw. Methacholin zur Inhalation appliziert. Begonnen wurde mit PBS, gefolgt von 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml und 25,0 mg/ml Methacholin. Jede Messung dauerte 2 min und enthielt jeweils 3 deep-breath-recruiting Manöver zur Wiederbelüftung kollabierter Lungenabschnitte mit einer anschließender Pause von

30 s. Die nächste Applikation wurde eingeleitet, nachdem sich etwaige Sofortreaktionen eingependelten.

Die Resistancewerte des Methacholintests wurden auf zwei Einflussvariablen untersucht: Ein Faktor war die Gruppenzugehörigkeit des Versuchstiers (HDM vs. PBS), der andere die stufenweise ansteigende Methacholinkonzentration.

3.1.6 Murines Plasma und Vollblutausstrich

Mit einer Kapillare wurde retrobulbär ca. 200 µl Blut entnommen und in ein EDTA-beschichtetes Plasmaröhrchen geleitet. Die anschließende Plasmagewinnung wurde unmittelbar nach dem Protokoll in Tabelle 3.3 durchgeführt.

Bei der zweiten und dritten HDM-Versuchsrunde wurde ein weiterer Tropfen Blut aus der Kapillare auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem anderen sauberen Objektträger ausgestrichen. Nach dem Trocknen über Nacht in einem Wärmeschrank (37°C) erfolgte das Färben des Ausstrichs mit einer Schnell-Färbung: Jeder Objektträger wurde fünfmal für jeweils eine Sekunde hintereinander in jede der vier Färbelösungen getaucht und zwischen jeder Färbelösung mit einem Tuch abgetupft. Abschließend wurde er getrocknet, eingedeckelt und erneut getrocknet.

Dann wurde mithilfe eines Mikroskops und einem Zählgerät die Zellzusammensetzung bestimmt. Gezählt wurden jeweils 100 Leukozyten unter 40facher Vergrößerung (Axio Imager 2, Zeiss) mit Öl. War die Identität einer Zelle schwer auszumachen, wurde auf eine 63fache oder 100fache Vergrößerung erhöht.

Tabelle 3.3 – Plasmagewinnung aus Vollblut

1	20 min mit 1300 x g bei 4°C zentrifugieren
2	Überstand vorsichtig in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) pipettieren
3	10 min mit 3000 x g bei 4°C zentrifugieren
4	Überstand aliquotieren (0,5 ml Eppendorfgefäße) und einfrieren (-80°C)

3.1.7 Töten der Versuchstiere in Narkose

Nach fachgerechter Applikation der Intraperitonealnarkose erfolgte das Töten der Versuchstiere durch letalen Blutentzug gemäß der RICHTLINIE TIERSCHUTZ 3.01 DES BUNDESAMTS FÜR VETERINÄRWESEN, ABSCHNITT B5.

Das betroffene Versuchstier wurde auf einem Polystyrolschaumstoffbrett rücklings an allen Extremitäten fixiert, damit das Abdomen für die Laparotomie gut zugänglich war. Ein oberer sowie unterer Medianschnitt und die Darmverlagerung nach rechts ermöglichten ein visuell

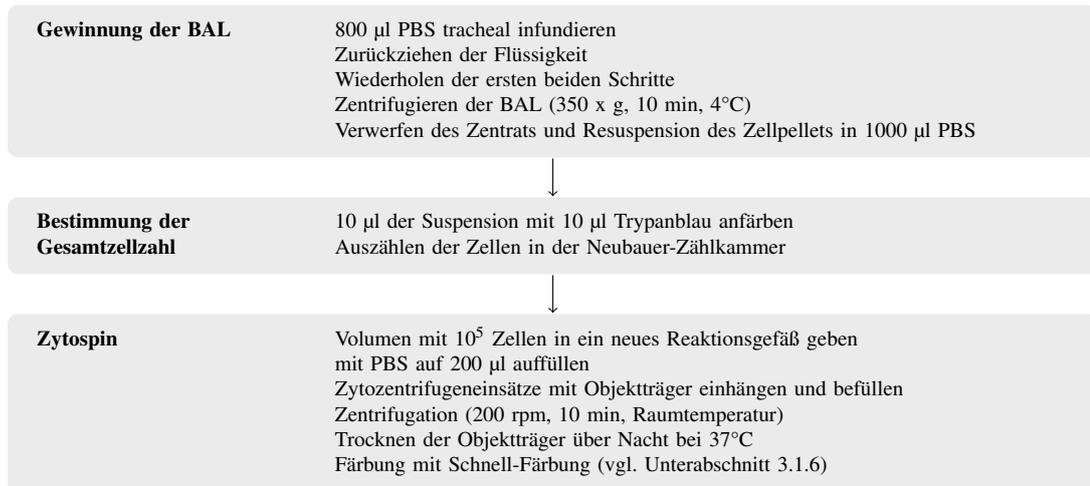


Abbildung 3.3 – BAL Aufbereitung

kontrolliertes Durchtrennen der Vena cava inferior. Das entströmende Blut wurde mit Tupfern abgefangen.

3.1.8 Bronchoalveoläre Lavage

Über die für die Lungenfunktion angebrachte Trachealkanüle wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Den Ablauf beschreibt Abbildung 3.3.

Die zum Zählen verwendete Neubauer-Zählkammer besteht aus 3 x 3 Großquadraten. Da das Deckglas einen Abstand von 0,1 mm zum Objektträger hat und ein Großquadrat 1 x 1 mm misst, errechnet sich ein Volumen von 0,1 mm³ pro Großquadrat. Die Anzahl der Zellen in den 4 Eckquadraten (L in Abbildung 3.4) wurde gezählt. Unter Berücksichtigung der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau wurde mit folgender Formel die Zellkonzentration c pro µl bestimmt:

$$c = \underbrace{\frac{L}{4} \cdot 10}_{c \text{ pro } \mu\text{l}} \cdot \underbrace{2}_{\text{Ausgleich Trypanblau}} = L \cdot 5$$

Mithilfe eines Blutbild-Differenziergeräts wurden insgesamt 200 Zellen unter dem Mikroskop bestimmt, um die relative Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen zu ermitteln. Die vier hauptsächlich vorkommenden und wichtigsten Zelltypen zur Beurteilung der BAL sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

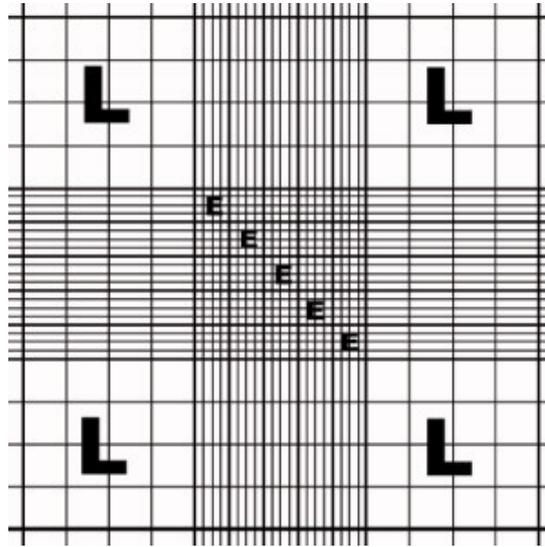


Abbildung 3.4 – Neubauer Zählkammer. Die Leukozyten wurden in den mit L bezeichneten 4 äußeren Großquadranten gezählt, wovon jedes ein Volumen von 0,1 μ l repräsentiert. Abbildung aus Carl Roth Online Shop.

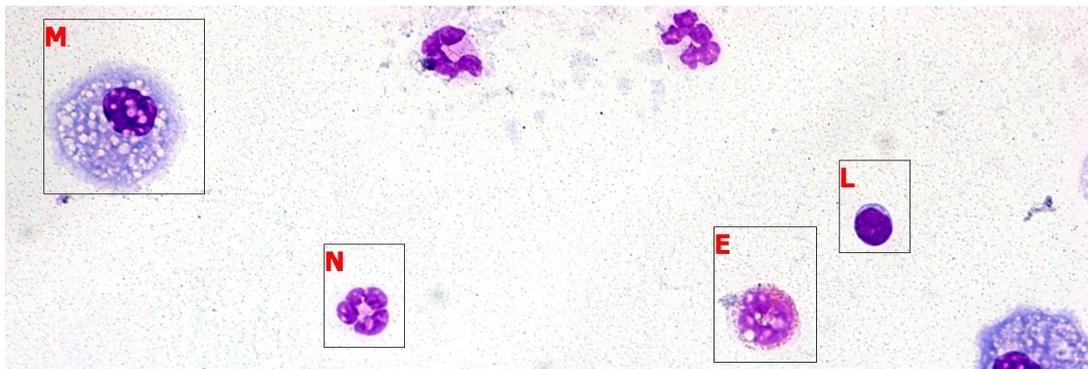


Abbildung 3.5 – Verschiedene Zelltypen der BAL. M, Makrophage; N, neutrophiler Granulozyt; E, eosinophiler Granulozyt; L, Lymphozyt.

3.1.9 Histologische Beurteilung der Lungen

Nach erfolgter bronchoalveolärer Lavage wurde der Thorax eröffnet, die Rippen beiseite geklappt, das Zwerchfell entfernt, der linke Vorhof angeschnitten, das rechte Herz punktiert und mit reichlich PBS durchgespült, bis sich die Lunge sichtbar weiß verfärbte. Im folgenden wurden die rechten Lungenflügel am rechten Hauptbronchus mit einem Seidenfaden abgeschnürt, wenige Millimeter distal davon scharf entfernt und für nicht dieses Projekt betreffende Versuche kryokonserviert. Die Trachealkanüle wurde nun mit einer 10 cm höher aufgehängten Flasche mit Paraformaldehyd (PFA) verbunden, woraufhin nach dem Öffnen des 3-Wege-Hahns PFA mit einem konstanten Druck in den linken Lungenlappen infundiert. Nach 10 min wurde die Flasche abgetrennt, die Lunge herauspräpariert und zur Fixierung über Nacht in PFA gelagert.

Die fixierten Lungen wurden in neue Biopsie-Eindeckkassetten gelegt und nach dem Protokoll in Tabelle 3.4. in einem Gewebereinbettter (Tissue Processor) entwässert. Nach Abschluss des Entwässerungsverfahrens wurden die Lungenlappen an der Paraffin-Ausgießstation oberflächennah in Paraffinblöcke eingebettet, nach Tabelle 3.5 mit dem Rotationsmikrotom zugeschnitten und dem Protokoll in Abbildung 3.6 folgend gefärbt.

Von jedem Versuchstier wurde je ein Lungenschnitt in HE- und PAS-Färbung angefertigt. Die HE-Färbung erlaubte in der anschließenden mikroskopischen Auswertung eine Aussage über diverse lungenmorphologische Veränderungen, während mit der PAS-Färbung das Auftreten von Becherzellen beurteilt wurde.

Staging

Zur Objektivierung mikroskopisch sichtbarer, Asthma-assoziierte Lungenveränderungen wurden verschiedene Merkmale anhand HE-gefärbter Lungenschnitte geprüft (Abbildung 3.7) und nach Tabelle 3.6 mit Punkten belegt. Insgesamt gab es 6 Punkte.

Bestimmung des Becherzellanteils

Um das Auftreten von Becherzellen im Vergleich zu normalem Bronchialepithel objektiv zu quantifizieren, wurde die Auswertung mit einem Mikroskop durchgeführt, das mit einem Computer verbunden und mit einem elektronischem Objektivhalter (BX 51, Olympus) ausgestattet war. Nachdem manuell der Bereich des Lungenschnitts auf dem Objektträger festgelegt wurde, suchte sich der Computer randomisiert 120 Sichtfelder der Größe $340 \times 256 \mu\text{m}$ innerhalb des Schnittes aus (Abbildung 3.8). Dem nun auf einem Monitor mit 40facher Vergrößerung dargestellten Sichtfeld wurde eine Ebene mit 12×7 , gleichmäßig verteilten schwarzen Kreuzfäden aufgelegt. Gezählt wurden die Kreuze, die auf die Bronchialschleimhaut fielen.

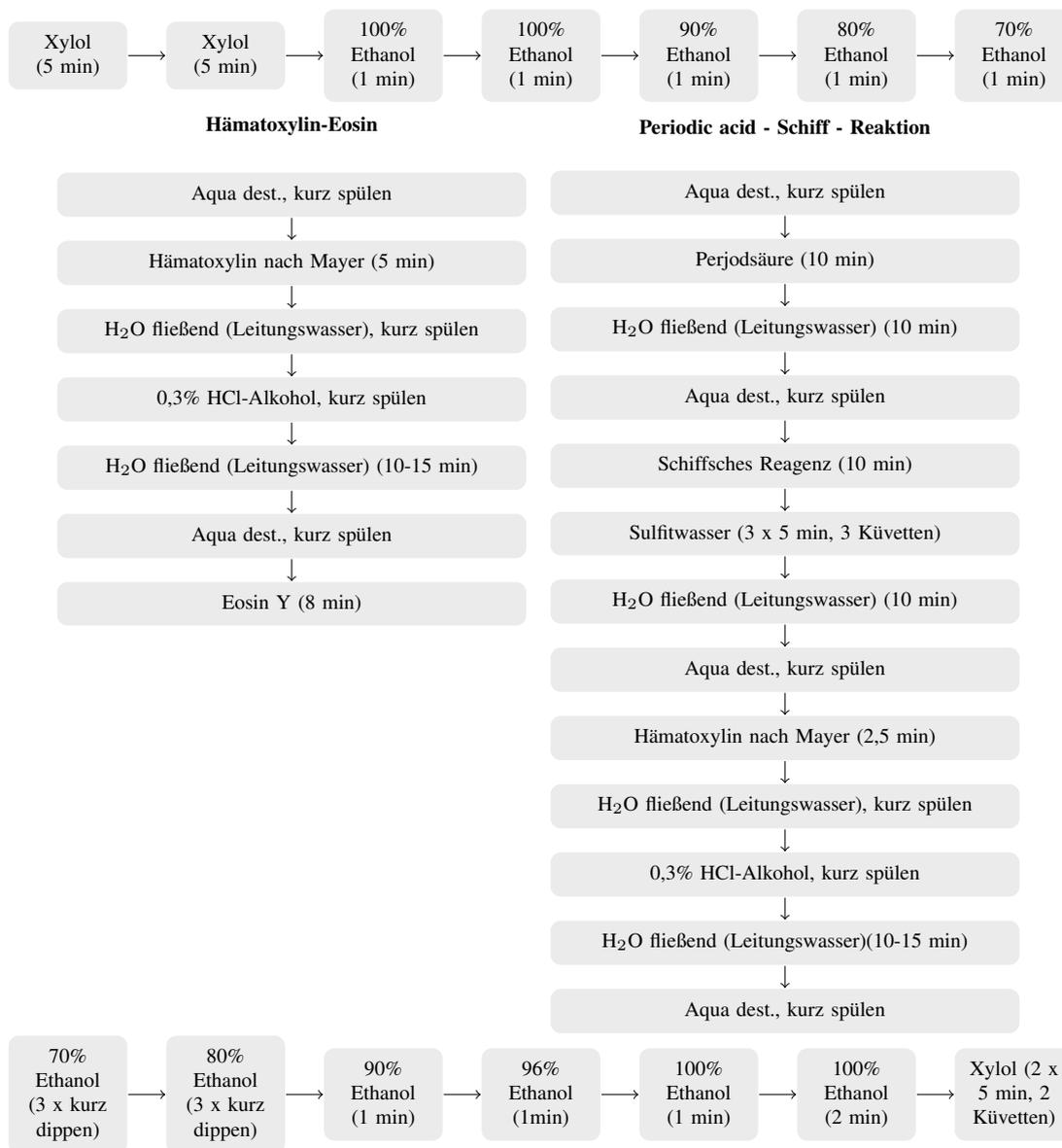


Abbildung 3.6 – Protokoll der histologischen Färbungen von HE- und PAS-Färbung. Das obere horizontale Flussdiagramm zeigt das Protokoll für die Entparaffinierung. Dies ist für HE und PAS identisch. Die beiden vertikalen Abfolgen im mittleren Teil beschreiben das Vorgehen für HE (li.) und PAS (re.). Am Schluss werden HE sowie PAS mit demselben Ablauf entwässert, so wie es die untere horizontale Prozedurreihe zeigt.

Tabelle 3.4 – Programmierung des Gewebeeinbettlers (Tissue Processor)

	Reagenz	Dauer in Minuten	Temperatur in °C
1	70% Ethanol	60	–
2	96% Ethanol	60	–
3	96% Ethanol	120	–
4	96% Ethanol	120	–
5	100% Ethanol	60	–
6	100% Ethanol	120	–
7	100% Ethanol	120	–
8	Xylol	60	–
9	Paraffin	60	60
10	Paraffin	120	60

Tabelle 3.5 – Anfertigung von Schnitten

1	Paraffinblock mindestens 10 min auf Kühlplatte (-10°C) legen
2	Trimmen (Dicke: 20 µm) bis Schnittfläche zentral im Lungenlappen liegt
3	Paraffinschnitte (Dicke: 3 µm) anfertigen
4	Schnitte aus Auffangbecken (37°C) auf Objektträger aufziehen
5	10 min auf Wärmeplatte (39°C) trocknen
6	Trocknen über Nacht im Wärmeschrank (37°C)

Tabelle 3.6 – Histologische Bewertungsmerkmale

Merkmal	Prüfung	Punkte
peribronchiale Infiltration		
Häufigkeit	> 80%	1
Dichte	Interzellularabstand < Zelldurchmesser	1
perivaskuläre Infiltration		
Häufigkeit	100%	1
	> 50%	0,5
Dichte	Interzellularabstand < Zelldurchmesser	1
Sonstiges		
Infiltratausdehnung	3 x Infiltratdurchmesser > 70µm	1
Bronchialhypertrophie	vaskuläre Muscularisverdickung bei > 50% der kleinen Gefäße	1

Traf das Kreuz eine Becherzelle, wurde es als Becherzelle gezählt. Traf das Kreuz eine beliebige andere Zelle, wurde es als Nicht-Becherzelle gezählt. Nachdem ein Sichtfeld ausgezählt wurde, fuhr der Computer den elektronischen Objektivhalter zum nächsten, zufällig bestimmten Sichtfeld. Die Ebene mit den Kreuzen blieb immer konstant.

Der relative Anteil an Becherzellen wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Becherzellanteil} = \frac{n_{\text{Becherzellen}}}{n_{\text{Becherzellen}} + n_{\text{Nicht-Becherzellen}}}$$

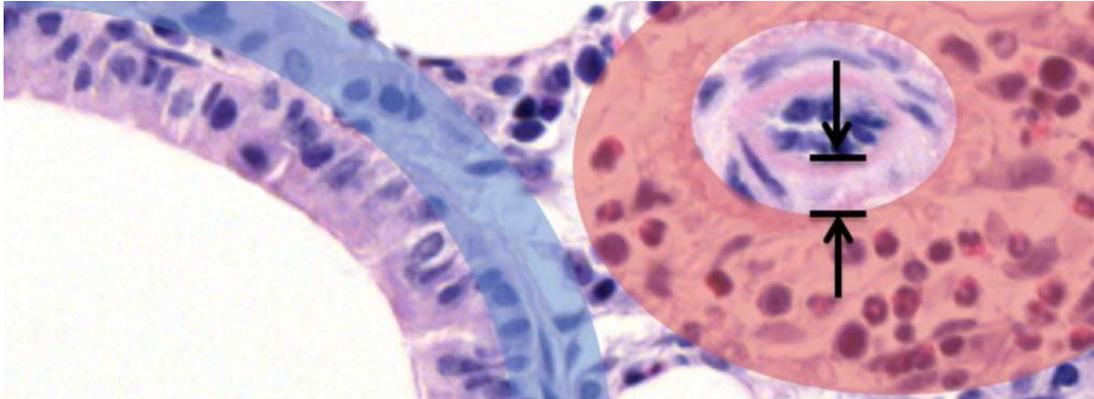


Abbildung 3.7 – Histologische Kriterien im Staging. Das Ausmaß peribronchialer (blau) und perivaskulärer (rot) Entzündungsinfiltrate spielte für die Bewertung im Staging eine entscheidende Rolle. Aber auch die Größe der Infiltrate (hier nicht dargestellt) und etwaige Bronchialmuskulaturverdickungen (Pfeile) wurden bewertet.

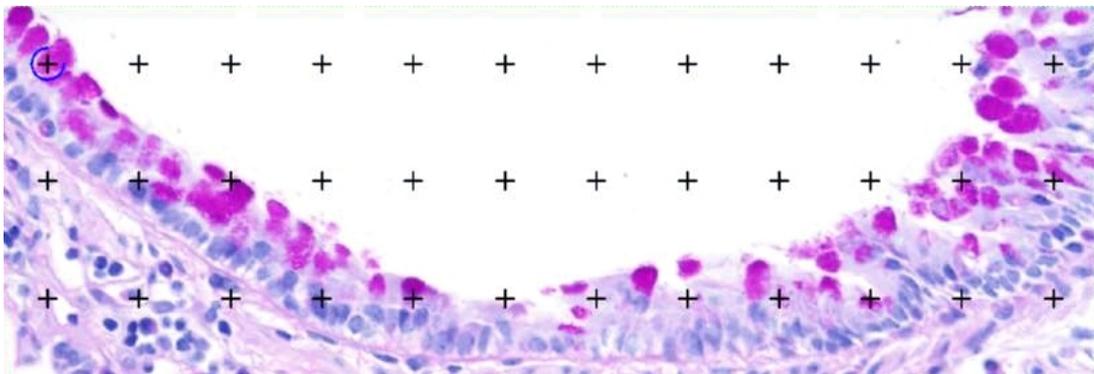


Abbildung 3.8 – Bestimmung des Becherzellanteils

3.2 Statistik

3.2.1 Signifikanzniveau

Um die Nullhypothese abzulehnen, wurde für alle durchgeführten statistischen Untersuchungen eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ akzeptiert. P-Werte innerhalb von Graphen wurden mit Symbolen abgekürzt. Ein Stern (*) bedeutet ein p-Wert $< 0,05$, zwei Sterne (**) ein p-Wert $< 0,01$ und drei Sterne (***) ein p-Wert $< 0,001$.

3.2.2 Statistische Testverfahren

Die Auswahl des geeigneten Testverfahrens wurde für jeden Test individuell nach Abbildung 3.9 bestimmt. Abweichungen davon gab es bei der Lungenfunktion und den microRNA-Quotienten. Für letztere wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen mit dem Welch-Test bewertet.

Daten der pulmonalen Resistancemessung wurden mit der zweifachen univariaten parametrischen Varianzanalyse (ANOVA, engl. *analysis of variance*) bewertet. Die ANOVA berechnet eine Reihe von p-Werten. Einer beantwortet die Frage, inwiefern die Zugehörigkeit zu einer Gruppe die Resistance bei zunehmender Methacholinkonzentration beeinflusst. Post-Hoc-Tests wurden im Anschluss an die ANOVA angewandt, um einzelne Gruppen separat beurteilen zu können. Der dafür angewandte Bonferronitest korrigierte die Einzelfehlerwahrscheinlichkeiten des multiplen Testens auf eine Gesamtfehlerwahrscheinlichkeit $\alpha < 0,05$. Der p-Wert der einzelnen Messungen wurde damit adjustiert und konnte wie gewohnt abgeschätzt werden.

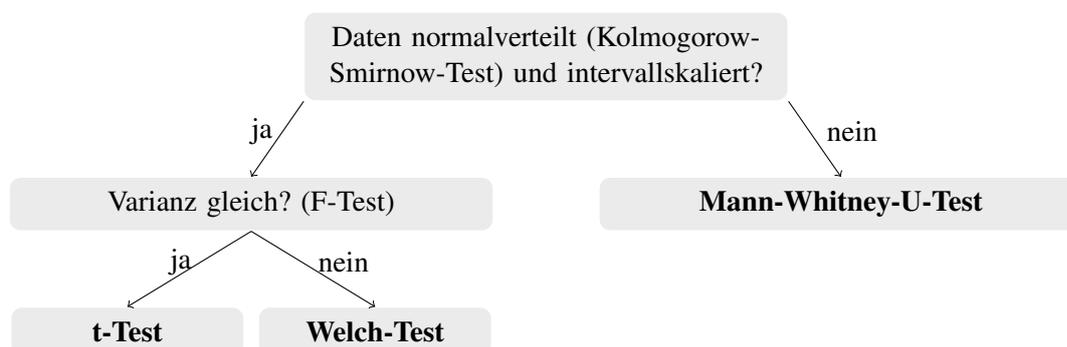


Abbildung 3.9 – Auswahl des geeigneten Testverfahrens

3.3 Biomarker Identifizierung

3.3.1 Abschätzung der Hämolyse

Da Erythrozyten microRNA enthalten hat die Hämolyse einen bedeutenden Einfluss auf microRNAs in Plasma und Serum [150]. Eine Quantifizierung erfolgte indirekt über die Bestimmung des Hämoglobins durch photospektrometrische Messungen der Plasmaproben nach Tabelle 3.7. Hämoglobin absorbiert Licht der Wellenlänge $\lambda = 415$ nm am stärksten. Die Extinktion E_λ wird anhand des Verhältnisses zwischen einfallender und ausfallender Strahlung berechnet, wobei I_0 die einfallende und I die ausfallende Lichtmenge ist:

$$E_\lambda = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Je kleiner E_{415} ausfiel, desto weniger Hämoglobin war aus hämolysierten Zellen in der Probe enthalten. Um einschätzen zu können ab welcher E_{415} eine relevante Expressionsänderung der microRNAs geschieht, wurde eine Hämolysereihe angefertigt. Für die unterschiedlich hämolysierten Seren wurde die E_{415} sowie die Expression von miR-451a bestimmt. MiR-451a ist in Erythrozyten hoch exprimiert und deshalb in hämolysiertem Plasma erhöht nachweisbar [151].

Tabelle 3.7 – Abschätzung der Hämolyse

1	Plasmaproben auf Eis auftauen, vortexen und herunterzentrifugieren
2	Reinigung und Kalibrierung des Spektrophotometers mit ultrareinem Wasser
3	1,5 μ l Plasma auf die Messstelle pipettieren
4	Bestimmung der Extinktion bei 415 nm
5	Messstelle gründlich reinigen

3.3.2 RNA Extraktion

Im ersten Schritt werden membranöse Bestandteile lysiert und Proteine ausgefällt. Der nach Zentrifugation entstandene Überstand wird in einen Zentrifugations-Filter pipettiert. Dessen Harzbeschichtung bindet Moleküle abhängig von der Ionen-Konzentration, die durch die Zugabe von Isopropanol so angepasst wurde, dass hauptsächlich RNA daran haften bleibt. Die übrigen Proteine und DNA werden entweder durchgespült oder vor dem Filter festgehalten. Die gebundene RNA wird anschließend mit der Wash Solution I und II gewaschen, um alle verbliebenen Unreinheiten zu beseitigen. Die aufgereinigte RNA wird in RNase-freiem Wasser eluiert. Lag das zur Verfügung stehende Anfangsvolumen unter den im Protokoll verlangten 50 μ l, wurde die Menge des Eluats dementsprechend angepasst. Das genaue Protokoll ist der Abbildung 3.10 zu entnehmen.

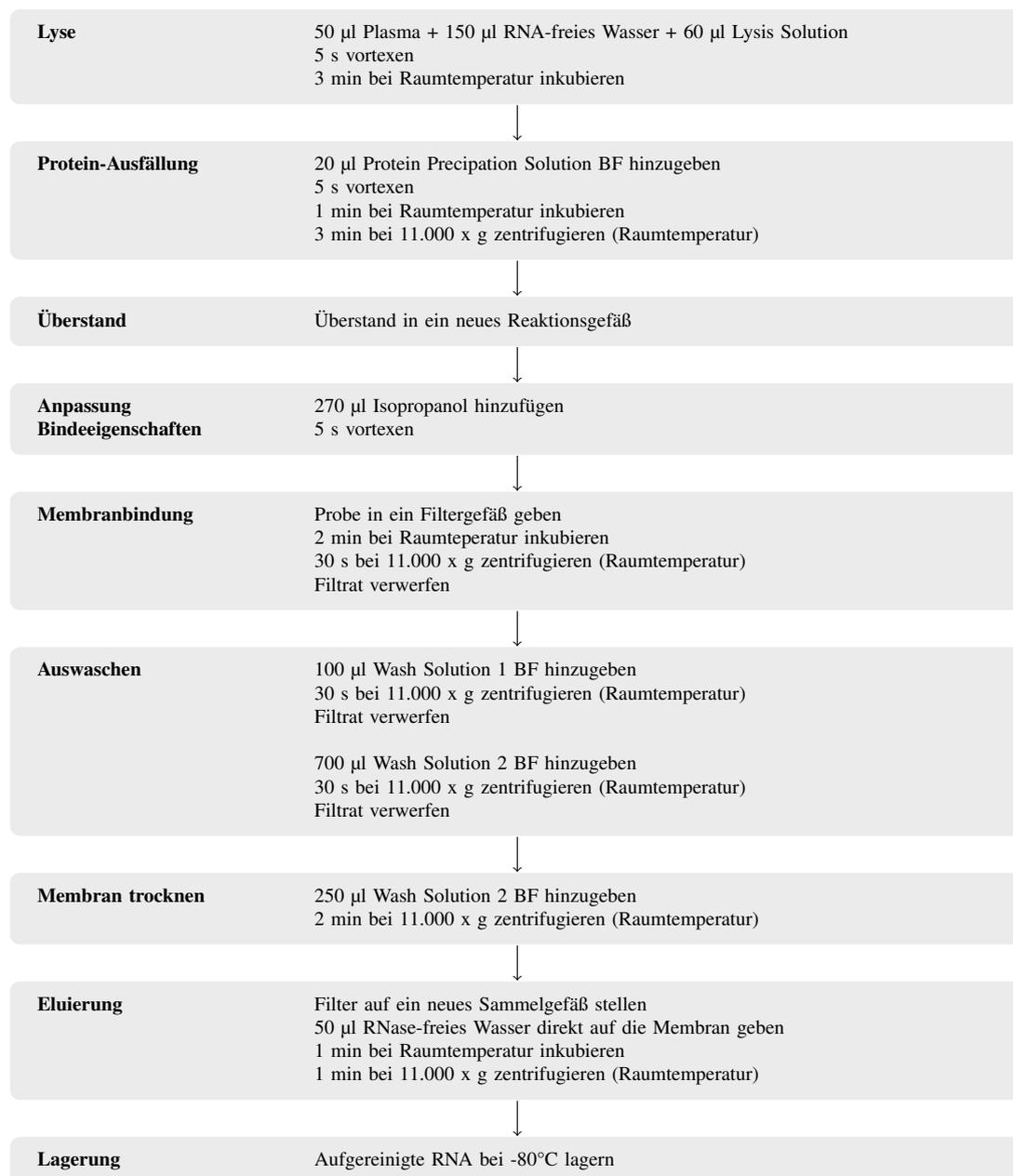


Abbildung 3.10 – Protokoll der RNA-Isolation

3.3.3 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese weist Moleküle bestimmter Länge und Ladung nach. Da microRNAs sehr kurz und niedrig konzentriert sind, wurde ein hochempfindliches Chipsystem verwendet. Es diente in erster Linie dazu, die Qualität der RNA zu beurteilen und Verunreinigungen mit längerer, intrazellulär vorkommender RNA auszuschließen. Die Vorgehensweise ist Abbildung 3.12 zu entnehmen.

Ohne Kontamination stellt sich das Elektropherogramm wie in Abbildung 3.11 dar. Der erste Peak bei 25 Nukleotiden (nt) ist ein hinzugegebener Marker. Über ihn kann die Konzentration der RNA berechnet werden. Direkt nach dem Peak folgt eine breitere Welle, die aufzeigt, dass kurze Moleküle vorhanden sind, die microRNA und andere kleine RNA enthalten. Die Spannweite des Signals der microRNA von 30-300 nt erklärt sich durch die Auslegung des Systems auf lange Nucleinsäuren (4000 nt und größer). Verfolgt man den Graph weiter nach rechts, bleibt die Linie auf Nullniveau. Bei Kontamination der Probe mit zellulärer RNA wären bei 2000 nt und 4000 nt zwei deutliche Peaks der 18 S- bzw. 28 S-Untereinheit der Ribosomen zu erkennen.

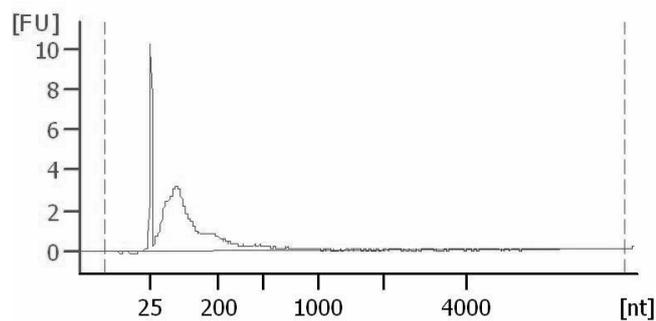


Abbildung 3.11 – Elektropherogramm zur Kontrolle der RNA-Extraktion ohne Kontamination. Die berechnete Konzentration der microRNA lag hier bei 129 pg/ μ l.

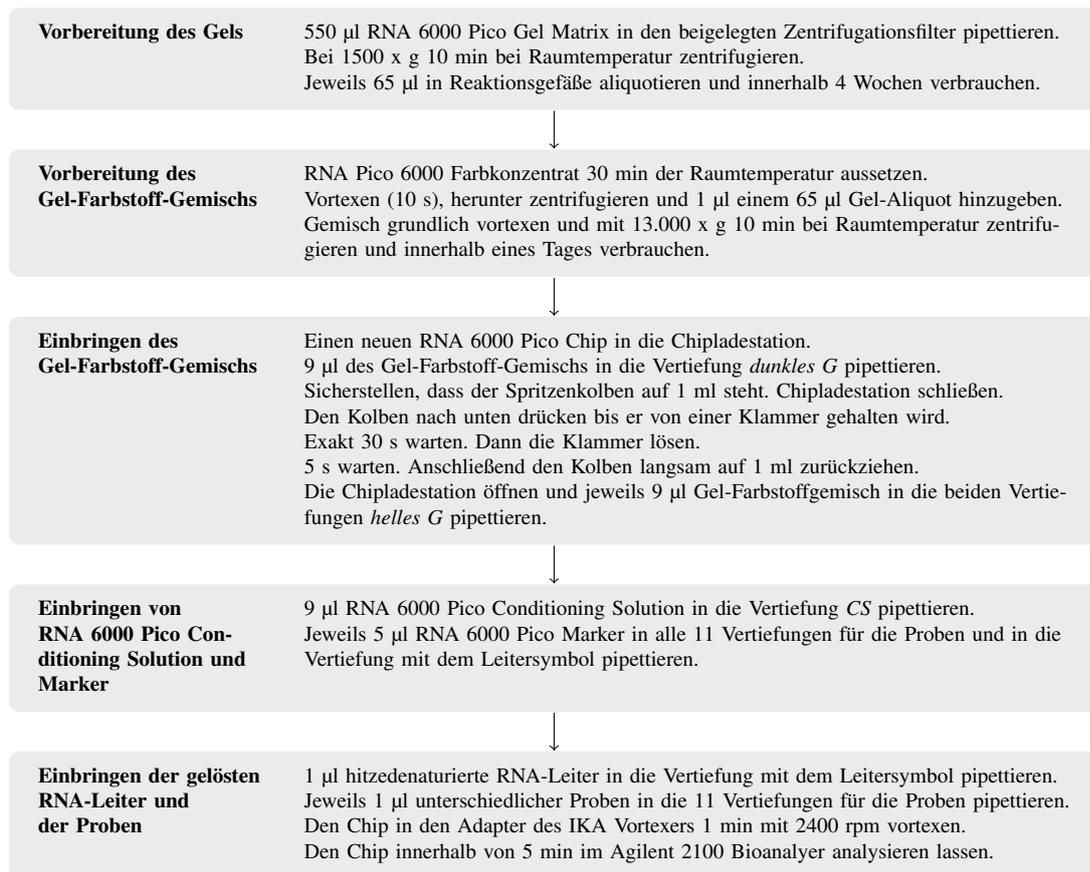


Abbildung 3.12 – Protokoll der Gel-Elektrophorese mit Agilent Bioanalyser nach Agilent RNA 6000 Pico Assay Protokoll (Version März 2008).

3.3.4 RT-qPCR

RT-qPCR steht für reverse Transkription (RT) mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und verbindet als ein *in vitro* Verfahren die Amplifikation spezifischer Oligonukleotide mit deren Konzentrationsmessung.

Das zu vervielfältigende Substrat muss als Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorliegen. Folglich ist im ersten Schritt eine Transkription von RNA zu komplementärer DNA (cDNA) notwendig. Eine schematische Darstellung der RT-qPCR zeigt Abbildung 3.13.

Da reife microRNAs von kurzer Länge sind, bedient man sich zweier Besonderheiten, damit eine möglichst spezifische Primerbindung erfolgt. Die Primersequenz besteht neben gewöhnlichen Desoxyribonukleosidtriphosphaten aus Locked Nucleid Acids (LNA), welche die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Basenpaarung erhöhen und somit die Sensitivität des Verfahrens steigern [153]. Zweitens korreliert die Genauigkeit der Primerbindung mit dessen Länge. Nun liegt es allerdings in der Natur der microRNAs, dass diese sehr kurz sind. Damit ein Primerdesign mit einer größeren Nukleotidanzahl möglich wird, bedarf es einer biotechnologischen Prozessierung des Substrats. Das 3'-Ende jeder microRNA wird durch die *Escherichia coli* Poly(A)-Polymerase unabhängig der vorliegenden Sequenz mit Adenosinen verlängert. So wird zum Beispiel aus miR-21-5p mit der Sequenz 5'-UAG...AUGUUGA-3' eine beliebig längere Ribonukleinsäure mit 5'-UAG...AUGUUGAAAAAA...-3'. Der für den Reaktionsstart benötigte LNA-Primer enthält eine dem Poly-A-Schwanz komplementäre Oligo-dT-Sequenz. An dessen 3'-Ende sitzen degenerierte Basen, die den LNA-Primer mit dem ursprünglichen 3'-Ende der RNA verankern. Am 5'-Ende befindet sich eine universelle Basensequenz [154]. Diese universelle Kodierung erlaubt ebenfalls die Verwendung eines einzigen Typs von LNA-Reverse-Primer in der anschließenden PCR. Ein spezifischer LNA-Forward-Primer erlaubt die alleinige Amplifikation der zu untersuchenden miRNA.

Das Prinzip der qPCR basiert auf einer Echtzeitmessung eines fluoreszierenden Indikator-moleküls – in diesem Fall SYBR Green I –, dessen Signalintensität mit der gegenwärtigen doppelsträngigen DNA-Menge während jedem Amplifikationszyklus korreliert. Jede Reaktion wird durch denjenigen Amplifikationszyklus charakterisiert, in dem das Fluoreszenzsignal erstmalig die Schwelle der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Diesen Parameter nennt man Schwellenzyklus (engl. threshold cycle, C_t -Wert) [155]. Abbildung 3.14 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven unterschiedlicher Substrate über dem Temperaturverlauf. Wichtig ist das Verständnis, dass ein geringer C_t -Wert eine höhere Konzentration des Primersubstrats bedeutet und umgekehrt.

Dem Protokoll zufolge wurden 40 qPCR-Amplifikationen durchlaufen. Proben mit einem

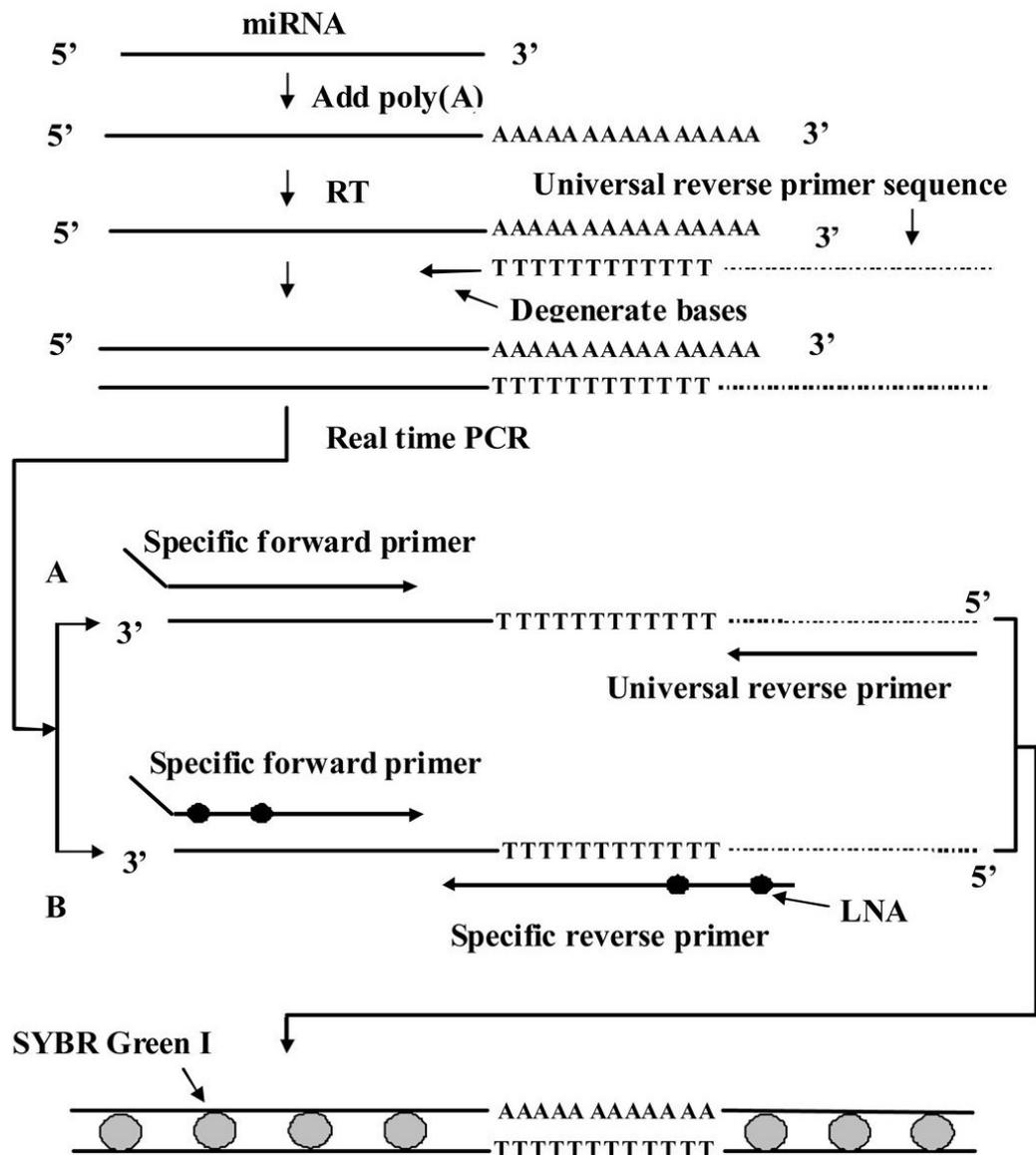


Abbildung 3.13 – Reverse Transkription und qPCR. Schema der RT-qPCR [152]. Den Einsatz von LNA-Primern zeigt Variante B.

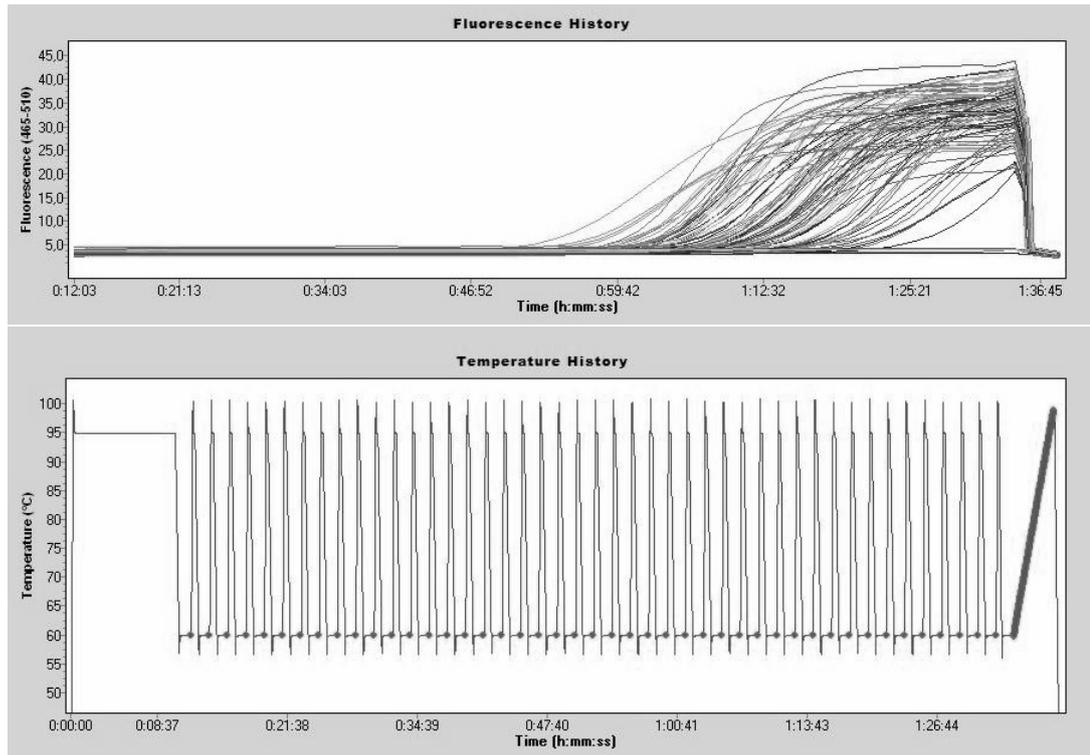


Abbildung 3.14 – Fluoreszenzsignal einer qPCR

C_t -Wert > 35 waren nicht verlässlich¹ und wurden als nicht detektierbar eingestuft. Nach abgeschlossener Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse des DNA-Produkts gemacht. Die Temperatur stieg dabei stetig an, bis die DNA zerfiel und konsekutiv das Fluoreszenzsignal abfiel. Bei korrekt abgelaufener Amplifikation eines Substrats gab es einen Temperaturpunkt, an dem die Fluoreszenz abrupt nachließ. Exemplarisch ist in Abbildung 3.15 die Schmelzkurvenanalyse mehrerer qPCRs mit insgesamt drei verschiedenen Primern dargestellt.

Es wurden zwei Arten von qPCR durchgeführt. *Individuelle Assays*, bei welchen in jede Vertiefung einer PCR-Platte ein beliebiger Primer eingesetzt werden konnte und *Fokus microRNA PCR Platten* mit vom Hersteller bereits vorgelegten Primern.

Individuelle Assays

Spezifische qPCR-Messungen mit ausgewählten LNA-Primern kontrollierten die Qualität der RNA vor dem kostenintensiven Screening und bestätigten darin gefundene gruppenspezifische

¹Siehe „Pitfalls and recommendations for microRNA expression analysis using qPCR“ von EXIQON unter <http://www.exiqon.com/ls/documents/scientific/mirna-qpcr-guidelines.pdf>, Seite 6

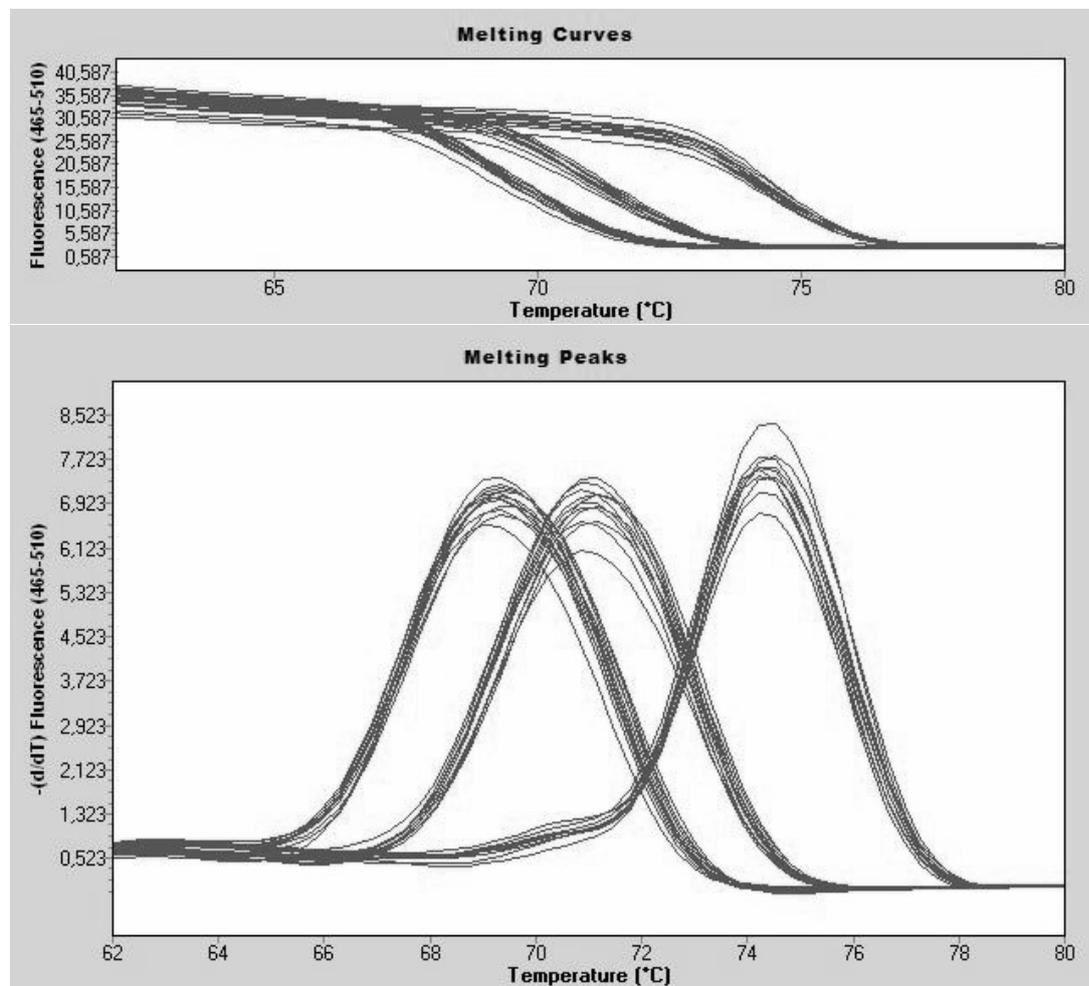


Abbildung 3.15 – Schmelzkurvenanalyse. Der untere Graph stellt die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals dar. Identische PCR-Substrate zeigen bei derselben Temperatur ein Steigungsmaximum.

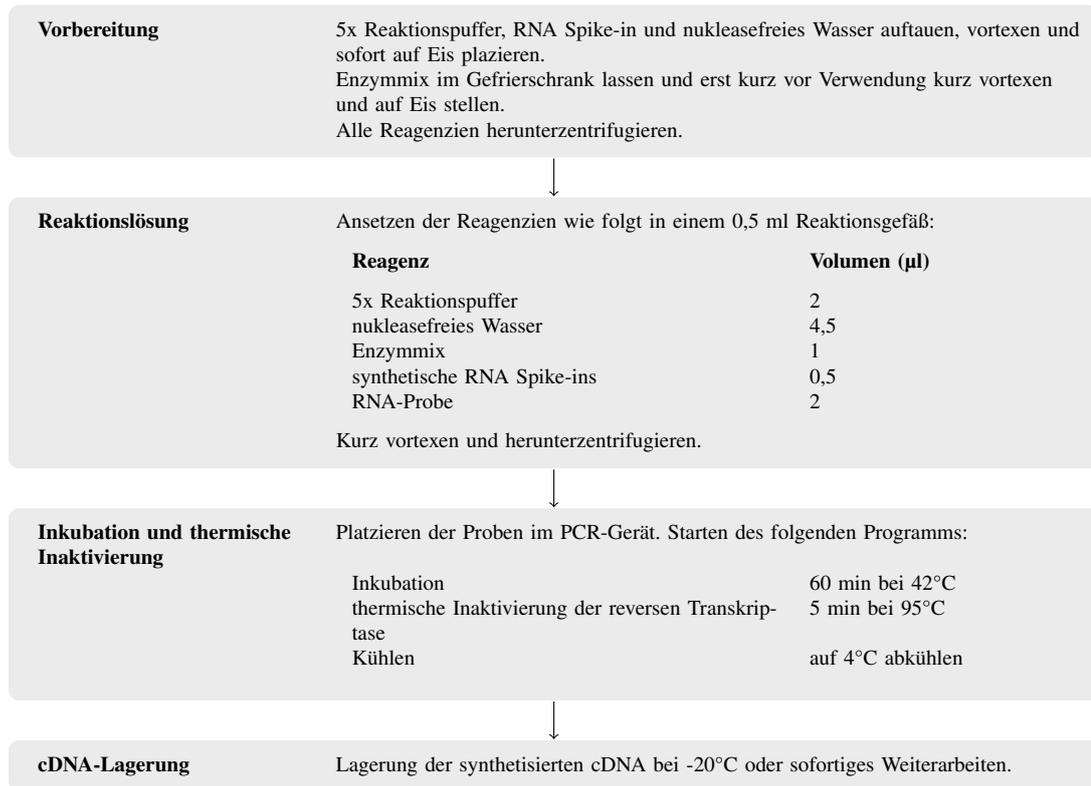


Abbildung 3.16 – Protokoll der reversen Transkription

sche microRNA-Differenzen. Es wurden Triplets gemessen, d.h. eine qPCR mit dem entsprechenden Primer und Probe fand dreimal parallel statt. Waren die drei Schwellenzyklen vergleichbar ($\pm 0,2$), konnte die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Messfehlers reduziert und mit dem Mittelwert gerechnet werden. Wich eine Messung eines Triplets stark ab, konnte sie als Ausreißer ausgeschlossen werden. Waren die Messwerte weit gestreut ($> 0,5$), musste die Messung wiederholt werden. Individuelle RT-qPCR-Reaktionen wurden nach dem Protokoll des Herstellers in leicht veränderter Form durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 3.16 und 3.17 dargestellt.

RNA-Qualität Eine hohe Qualität von RNA bzw. cDNA war für das Screening unerlässlich. Die Nukleinsäuren durften weder durch RNasen degradiert noch von qPCR inhibierenden Enzymen oder Molekülen kontaminiert sein. Deshalb wurden qPCRs vor dem Screening sowie Negativkontrollen durchgeführt.

Eine Negativkontrolle war die RT(-)-Kontrolle. Der reversen Transkription wurde statt des Enzyms reines Wasser hinzugegeben. Folglich konnte RNA nicht in cDNA umgeschrieben werden. In der anschließenden qPCR durfte kein Signal zu erwarten sein. Andernfalls lag

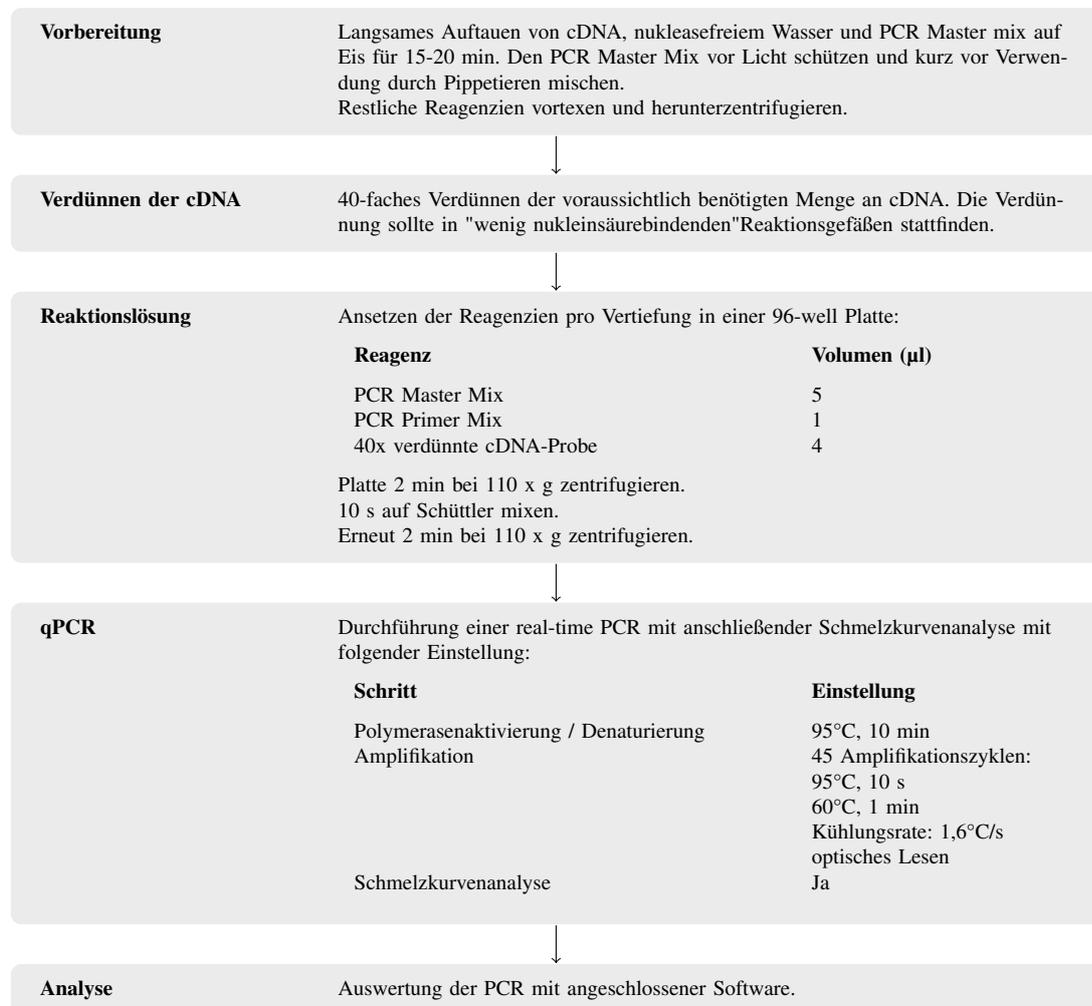


Abbildung 3.17 – Protokoll der qPCR

eine Kontamination mit DNA vor. Die andere Kontrolle war eine *no-template*-Kontrolle. Hier wurde der reversen Transkription keine RNA sondern reines Wasser als Vorlage zur Verfügung gestellt. Folglich durfte auch hier kein Signal in der qPCR zu messen sein, außer die RT-qPCR-Reagenzien wären mit RNA/DNA kontaminiert gewesen. Die RT-Kontrolle und die *no-template*-Kontrolle wurde für jede RT-qPCR stichprobenartig an einer Probe durchgeführt.

Für die qPCRs vor dem Screening wurden unterschiedliche microRNAs gemessen. Primer für miR-191-5p und miR-342-3p deckten stichprobenartig das Spektrum der gering vorkommenden microRNAs ab, während eine qPCR mit dem miR-451a-Primer einen geringeren C_t -Wert erwarten ließ. Zeigte sich für alle microRNAs ein erhöhter C_t -Wert, war die Gesamtkonzentration an microRNA in der jeweiligen Probe niedrig. Für das Screening wurden Proben mit hoher RNA-Konzentration bevorzugt, weil die Messgenauigkeit steigt und auch niedrig exprimierte microRNAs detektierbar sind.

Außerdem existierte ein Primer für eine artifiziell hinzugefügte RNA. Diese Spike-in-RNA, die direkt vor der reversen Transkription jeder Probe in gleicher Menge hinzugefügt wurde, sollte in allen Proben den gleichen C_t -Wert zeigen. Wuch ein C_t -Wert nach oben ab, sprach das für eine insuffiziente Transkription.

Validierung der Ergebnisse Die durch das Screening erhaltenen microRNAs (Siehe 3.3.5), die als Biomarker potenziell in Frage kamen, wurden in einer erweiterten Stichprobe validiert. Zusätzlich zu den Screening-Proben kamen aus HDM II und einer früheren OVA-Versuchsrunde (OVA I) jene hinzu, die eine Hämoglobinextinktion $\leq 2,5$ hatten. Jede Gruppe enthielt ca. 10 Exemplare.

Eine weitere Validierung erfolgte für die Biomarkerkombination (Siehe 3.3.7). Kooperationspartner war DR. LEIGH MARSH aus dem Ludwig Boltzmann Institut in Graz. An Proben von 5 Asthmaticern und 2 Kontrolltieren aus einem veränderten HDM-Modell (Dauer: 10 Wochen, 3 Sensibilisierungen pro Woche) wurde die Biomarkerkombination geprüft.

Fokus microRNA PCR Platten

Im Gegensatz zu individuellen Assays ist eine Auswahl an LNA-Primern getrocknet in den Vertiefungen von zwei PCR-Platten pro Probe vorgelegt. Darunter befinden sich Primer für die spike-in Kontrolle, Negativkontrollen mit Wasser und Referenzprimer, die auf beiden Platten zum Vergleich vorgelegt sind. Ohne Kontrollen und Referenzen wurde das Plasma auf 175 verschiedene microRNAs untersucht. Eine Übersicht über die vorgelegten LNA-Primer zeigt Tabelle .6 (Seite 106). Vor dem Öffnen der PCR-Platte wurde sie in einer Zentrifuge mit 96-well Einsatz zentrifugiert (2 min, 110 x g).

Die vorgelegten Primer erleichterten das Vorgehen, indem in jede Vertiefung ein identischer Reaktionsansatz pipettiert wurde. Dieser unterschied sich geringfügig von dem, der für die individuellen Assays verwendet wurde: 1000 µl PCR-Master-Mix und 990 µl RNase-freies Wasser vorsichtig mischen, 10 µl cDNA dazugeben und kurz vortexen, anschließend davon in jede Vertiefung 10 µl pipettieren.

Die jeweils besten sechs Proben aus der Versuchsrunde HDM II wurden für das Screening verwendet. Vorzugsweise sollten nur Proben mit vernachlässigbarer Hämolyse verwendet werden, kleine RNA musste in der Gel-Elektrophorese nachweisbar sein und die Qualität der microRNA in einem vorangehenden RT-qPCR-Test geprüft sein. Es wurde eine no-template-Kontrolle durchgeführt.

3.3.5 Auswertung

Bildung von Quotienten

Da die RNA-Konzentration jeder Probe verschieden war und prinzipiell nicht reliabel bestimmt werden kann (vgl. 4.2.2), wurde ein relatives Maß benutzt, um die Proben untereinander vergleichen zu können. Analog zu publizierten Vorschlägen für microRNA-Biomarker [156, 157] gelang dies durch Bildung von Quotienten. Der Quotient oder auch die Ratio gibt an, in welchem Verhältnis die microRNA im Zähler relativ zur microRNA im Nenner vorkommt. Vor der Bildung des Quotienten musste aus dem C_t -Wert die relative Quantität (RQ) berechnet werden:

$$RQ = 2^{-C_t}$$

Die Basis der Potenz beschreibt die Effizienz des Primers. Bei diesem Projekt wurden ausschließlich kommerziell erhältliche und nicht selbst designte Primer verwendet. Sie besaßen alle eine von der Firma gewährleistete Effizienz von annähernd zwei. Jeder Amplifikationszyklus verdoppelt demzufolge das Substrat. Der Quotient aus zwei beliebigen C_t -Werten A und B wurde wie folgt berechnet:

$$Quotient_{A/B} = \frac{RQ_A}{RQ_B} = \frac{2^{-C_{t,A}}}{2^{-C_{t,B}}} = \frac{2^{C_{t,B}}}{2^{C_{t,A}}} = 2^{C_{t,B} - C_{t,A}}$$

Die Quotienten wurden mit R, einer auf der Programmiersprache S basierender Software, berechnet. Ein auskommentiertes, exemplarisches Skript ist unter ?? zu finden. Setzt man die RQs zweier microRNAs in Beziehung zueinander, ergeben sich zwei Möglichkeiten: A zu B oder B zu A. Um einen Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen, hat es minimale Auswirkungen auf den p-Wert, ob man mit den Quotienten A/B oder dessen Kehrwerten die Teststatistik durchführt. Deshalb wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit und der besseren

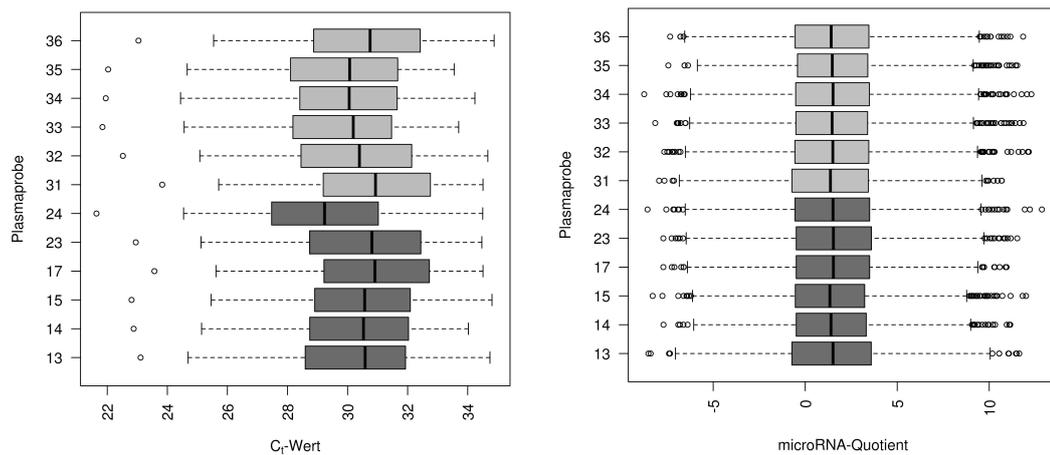


Abbildung 3.18 – Verteilung der C_t -Werte und microRNA-Quotienten aus dem Screening.

Vergleichbarkeit in Venn-Diagrammen jeweils nur eine mögliche Kombination berechnet. Der Normalisierungserfolg ist beispielhaft in Abbildung 3.18 an qPCR-Daten des HDM-Modells zu sehen.

Auswahl relevanter microRNAs aus dem Screening

Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse der Fokus miRNA PCR Panels wurde in Kooperation mit DR. NIKOLA MÜLLER, Institute of Computational Biology (Helmholtz-Zentrum München) mit R durchgeführt. Quotienten wurden zwischen allen microRNAs für jede Probe berechnet. Es wurde untersucht, welche Quotienten sich zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe am stärksten unterschieden. Auf eine Adjustierung wurde trotz multiplen Testens verzichtet, um keine relevanten microRNA-Quotienten zu übersehen.

MicroRNA-Screeningdaten des Ovalbumin-Modells OVA II wurden miteinbezogen. Messwerte eines Screenings lagen für dessen Versuchsgruppe (OVA-Asthma), Atopiegruppe (OVA-Atopie) und Kontrollgruppe (OVA-Kontrolle) vor. Analog zum HDM-Modell wurden die p-Werte zwischen den microRNA-Quotienten von OVA-Asthma zu OVA-Kontrolle bestimmt. Zusätzlich konnten im OVA-Modell p-Werte sowohl zwischen OVA-Atopie und OVA-Kontrolle als auch OVA-Atopie und OVA-Asthma ermittelt werden.

Zuerst wurden unabhängig vom Modell veränderte Quotienten selektiert. Der zweite Schritt verfeinerte die Auswahl, um eine Abgrenzung gegenüber einer Atopie zu ermöglichen. Hierfür wurden aus den Modell-unabhängigen Quotienten Kandidaten ausgewählt, die einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zwischen OVA-Asthma und OVA-Atopie oder einen nicht signifikanten ($p > 0,05$) zwischen OVA-Kontrolle und OVA-Atopie zeigten (Abbildung 3.19).



Abbildung 3.19 – Auswahl der microRNA-Quotienten. Zur weiteren Validierung wurden die microRNA-Quotienten in den beiden gefärbten Überlappungen ausgewählt.

Validierung der Screeningdaten

Der Dividend und Divisor der ausgewählten microRNA-Quotienten sind hypothetisch Asthma-spezifisch regulierte microRNAs, deren Konzentrationsverhalten im Verhältnis zu einer anderen – eventuell ebenfalls regulierten microRNA – zwar eine stärkere Veränderung zeigt als für sich allein genommen, trotzdem eigenständig zwischen den Gruppen verändert sein kann. Deshalb spielt die Entdeckung einzelner potenziell regulierten microRNAs eine entscheidendere Rolle als die Festlegung auf bestimmte microRNA-Quotienten.

Die Auswertung der Validierung erfolgte in R. Erneut wurden Quotienten zwischen allen microRNAs für jede Probe berechnet. Ratios, die in beiden Modellen signifikant verändert waren, wurden zur Beurteilung abgebildet.

Expressionsverhalten der microRNAs

MicroRNA-Quotienten lassen keine Aussage darüber zu, ob die darin enthaltenen microRNAs bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollen höher oder niedriger exprimiert sind. Mithilfe der *modified global mean normalization* [158] wurde das Expressionsverhalten einzelner microRNAs in R untersucht. Dabei wurde die RQ der zu untersuchenden microRNA durch das geometrische Mittel \bar{x}_{geom} geteilt. \bar{x}_{geom} wurde mit den RQs jener microRNAs berechnet, die in beiden Modellen mit einem C_t -Wert < 35 exprimiert waren ($n = 86$). Das Ergebnis war die normalisierte RQ (NRQ).

$$NRQ = \frac{RQ}{\bar{x}_{geom}} \quad ; \quad \bar{x}_{geom} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n RQ_i}$$

Das geometrische Mittel stellt somit den Normalisierungsfaktor dar. Die Genauigkeit der Methode korreliert mit der Anzahl der gemessenen microRNAs. Deshalb wurden die qPCR-Daten des Screenings zur Ermittlung des Expressionsverhaltens herangezogen. Geprüft wurden die microRNAs, die Teil der Quotienten nach deren Validierung waren.

Die NRQs einer microRNA wurden für jede Gruppe mit dem arithmetischen Mittel zusammengefasst. Das der Asthmagruppe wurde durch das der dazugehörigen Kontrollgruppe geteilt, um als resultierenden Quotienten die Änderung der Expression zu erhalten.

3.3.6 ROC-Analyse

Die Berechnung der microRNA-Quotienten liefert eine stetige, einheitslose Zahl. Eine jeweilige Zuordnung in pathologisch oder normwertig ist bislang für die vorliegende Fragestellung nicht beschrieben. Die Sensitivität und Spezifität des Quotienten hängt von einem definierten Trennwert ab, welcher falsch positive und falsch negative Testentscheidungen maximal dezimiert. Zur Festlegung eines solchen optimalen Trennwertes dient als statistisches Tool die ROC-Analyse (engl. receiver operating characteristic). Hierbei werden innerhalb des Streubereichs der Variable verschiedene Trennwerte angenommen und die daraus berechneten Werte für Spezifität und Sensitivität in der ROC-Kurve abgebildet. Der bestmögliche Trennwert ist jener mit der maximalen Summe aus Spezifität und Sensitivität. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, engl. area under the curve) repräsentiert als Testgütemerkmal die Trennschärfe des Tests, welche im Idealfall den Wert 1 annimmt [159]. Die ROC-Analyse wurde mit dem Statistikprogramm R und dem Paket pROC² durchgeführt [160].

Die Tiere der Asthmagruppe des HDM- und des OVA-Modells wurden der Fallgruppe (cases) zugeordnet. Die Kontrollgruppe (controls) bestand aus den Tieren der Kontrollgruppen beider Modelle plus der Atopiegruppe aus dem OVA-Modell. In dieser Konstellation wurde die ROC-Analyse für alle microRNA-Quotienten, die in der Validierung sowohl im HDM- als auch im OVA-Modell signifikant verändert waren, durchgeführt.

3.3.7 Kombination von Biomarkern

Die Kombination von Biomarkern kann zur Erhöhung von Sensitivität und Spezifität eines Tests führen. Mamtani et al. schlugen deren Verknüpfung durch lineare Regression vor [161]. Die potenziellen Biomarker wurden nach AUC-Wert absteigend sortiert (??). Der Quotient mit dem größten AUC-Wert wurde mit dem zweiten, dann mit dem zweiten und dem dritten usw. kombiniert. Alle Asthma-erkrankten Tiere wurden dem Endpunkt $y = 10$ zugeordnet, während

²Details zum Paket unter <http://cran.r-project.org/web/packages/pROC/pROC.pdf>

die Atopie- und Kontrolltiere dem Endpunkt $y = 0$ zugeteilt wurden. Die lineare Regressionsanalyse übernahm die Statistiksoftware R mit der Funktion $lm()$. Ausgabe waren die Faktoren der einzelnen Biomarker, sowie ein Achsenschnittpunkt. Gesucht wurde die Kombination, die den besten AUC-Wert in Verbindung mit hohen Werten für Spezifität und Sensitivität aufwies.

4 Ergebnisse

4.1 Beurteilung des Asthmaphänotyps der Asthmodelle HDM I - III

Die durchgeführten Tiermodelle zur modellhaften Imitation humanen Asthmas zeigten in den untersuchten Merkmalen asthmatypische Ausprägungen. Bei den fünf Wochen dauernden Modellen HDM I und HDM II waren diese Kennzeichen grundsätzlich stärker vorhanden, als bei dem 3-Wochen-Modell HDM III. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden im Folgenden aufgeführt.

4.1.1 Atemwegshyperreagibilität

Da alle HDM-Versuchsreihen unterschiedlichen Protokollen folgten, werden die Ergebnisse für jede Versuchsreihe gesondert dargestellt (Abbildung 4.1). HDM sensibilisierte Tiere entwickelten eine statistisch signifikant höhere Resistance nach Applikation von Methacholin und wiesen damit eine stärkere Reagibilität der Bronchien auf. Die ANOVA zeigte bei allen Versuchsrunden ein $p < 0,05$ für den Zusammenhang von Gruppenzugehörigkeit und Resistance. Bei den Versuchsgruppen war die Resistance für HDM I und HDM II größer als bei HDM III (Abbildung 4.2). Der Bonferronitest zeigte bei 12,5 mg/ml Methacholin einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den 5-Wochen- und den 3-Wochen-Modellen. Auch bei 6,25 mg/ml ließ sich dieser Trend bereits erkennen.

4.1.2 Bronchoalveoläre Lavage

Gesamtzahl der Zellen

Jede Versuchsgruppe zeigte eine signifikant höhere Anzahl an Zellen als die dazugehörige Kontrollgruppe (Abbildung 4.3). HDM I und HDM II hatten eine vergleichbare Anzahl an Zellen (Median HDM I: $2,2 \cdot 10^5$; HDM II: $1,9 \cdot 10^5$) während in den Lavagen der Asthmatiere aus HDM III signifikant weniger Zellen auszumachen waren (Median HDM III: $0,5 \cdot 10^5$).

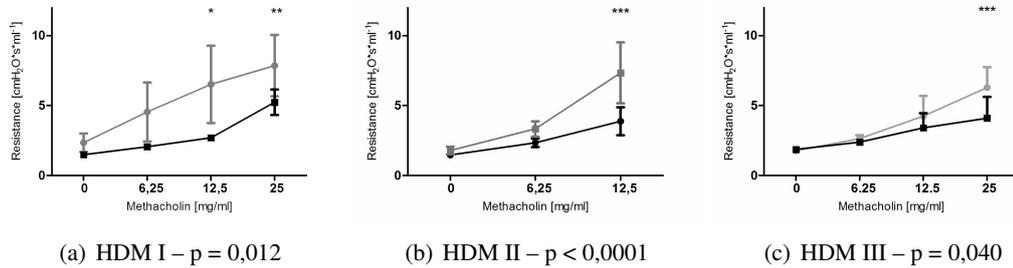


Abbildung 4.1 – Ergebnisse des Methacholintests. Es sind die Mittelwerte der Gruppen inklusive deren Standardabweichung aufgetragen. Die grauen Kurven stellen die mit HDM sensibilisierten Tiere dar. Die schwarzen Kurven zeigen die Kontrollgruppen. Der p-Wert aus der ANOVA zum Einfluss der Gruppenzugehörigkeit auf die Resistance ist der p-Wert, der jeweils unter den Graphen angegeben ist. Die p-Werte der Post-Hoc-Tests sind mit Sternchen dargestellt.

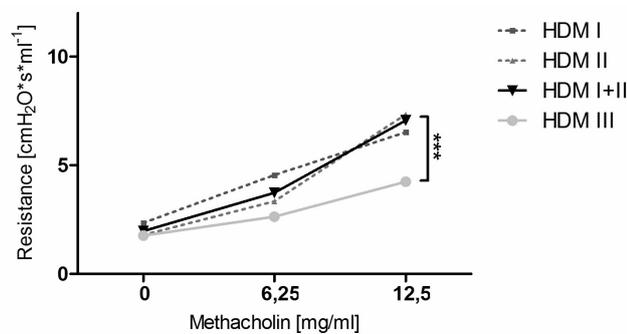


Abbildung 4.2 – Unterschiede in der Lungenfunktion. Die einzelnen Gruppen sind mit ihren Mittelwerten dargestellt. Der Bonferronitest zeigte bei 12,5 mg/ml Methacholin einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den 5-Wochen- und den 3-Wochenmodellen. Auch bei 6,25 mg/ml ließ sich dieser Trend schon erkennen.

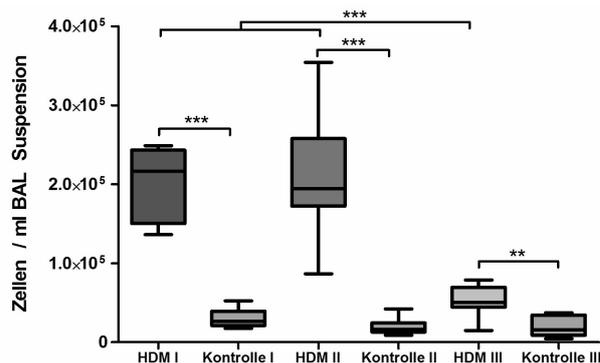


Abbildung 4.3 – Gesamtzellen der BAL. Darstellung im Box-Plot mit 5. - 95. Perzentile.

Zelldifferenzierung

Die eosinophilen Granulozyten waren in der Versuchsgruppe von HDM I mit $37,8 \pm 13,6\%$ (Median \pm prozentuale Standardabweichung) gegenüber der Kontrollgruppe ($0,3 \pm 0,3\%$) signifikant erhöht ($p < 0,0001$). Ebenso verhielt es sich mit HDM II ($49,6 \pm 10,3\%$, $p < 0,0001$) und HDM III ($25,2 \pm 3,1\%$, $p = 0,0034$).

Bei den neutrophilen Granulozyten hoben sich die Asthmagruppe von HDM I ($21,8 \pm 8,7\%$, $p = 0,003$) und HDM II ($19,7 \pm 6,6\%$, $p < 0,0001$) von deren Kontrollen ab. HDM III ($10,5 \pm 3,4\%$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($2,0 \pm 7,1\%$).

Lymphozyten machten in der Versuchsgruppe HDM I $7,2 \pm 3,2\%$ der gesamten Zellen aus und waren damit signifikant ($p = 0,0017$) gegenüber der Kontrollgruppe ($1,3 \pm 1,6\%$) erhöht. Die Asthmatiere HDM II ($7,1 \pm 2,6\%$) hatten auch einen signifikant höheren Anteil ($p < 0,001$) an Lymphozyten als die Kontrollgruppe ($0,5 \pm 0,5\%$). HDM III mit $0,7 \pm 1,4\%$ war gegenüber der Kontrolle mit $0 \pm 0,4\%$ am wenigsten erhöht ($p = 0,03$).

Während in der Versuchsgruppe ein großer Anteil an Leukozyten zu beobachten war, kamen in der Kontrollgruppe vorwiegend Makrophagen vor. Repräsentative Bilder zeigt Abbildung 4.5. Makrophagen waren in allen Versuchsgruppen signifikant ($p < 0,001$) verringert. HDM II zeigte mit $23,1 \pm 9,1\%$ im Vergleich zu dessen Kontrollgruppe mit $96,5 \pm 1,9\%$ den stärksten Unterschied. HDM I mit $34,0 \pm 18,6\%$ gegenüber $95,8 \pm 3,5\%$ in der Kontrolle war vergleichbar mit HDM II, während HDM III mit $61,6 \pm 5,7\%$ gegenüber einer Kontrolle von $89,0 \pm 6,9\%$ einen geringeren Unterschied zeigte.

Die Ergebnisse von HDM I und HDM II ähnelten sich. Diese beiden Versuchsgruppen hatten eine Sensibilisierungsdauer von 5 Wochen (vgl. Abbildung 3.1) gemein. Aus diesem Grund wurden für die Auswertung zusätzlich die beiden Gruppen HDM I und HDM II zusammengenommen und deren Unterschied zu HDM III betrachtet. HDM III präsentierte sich

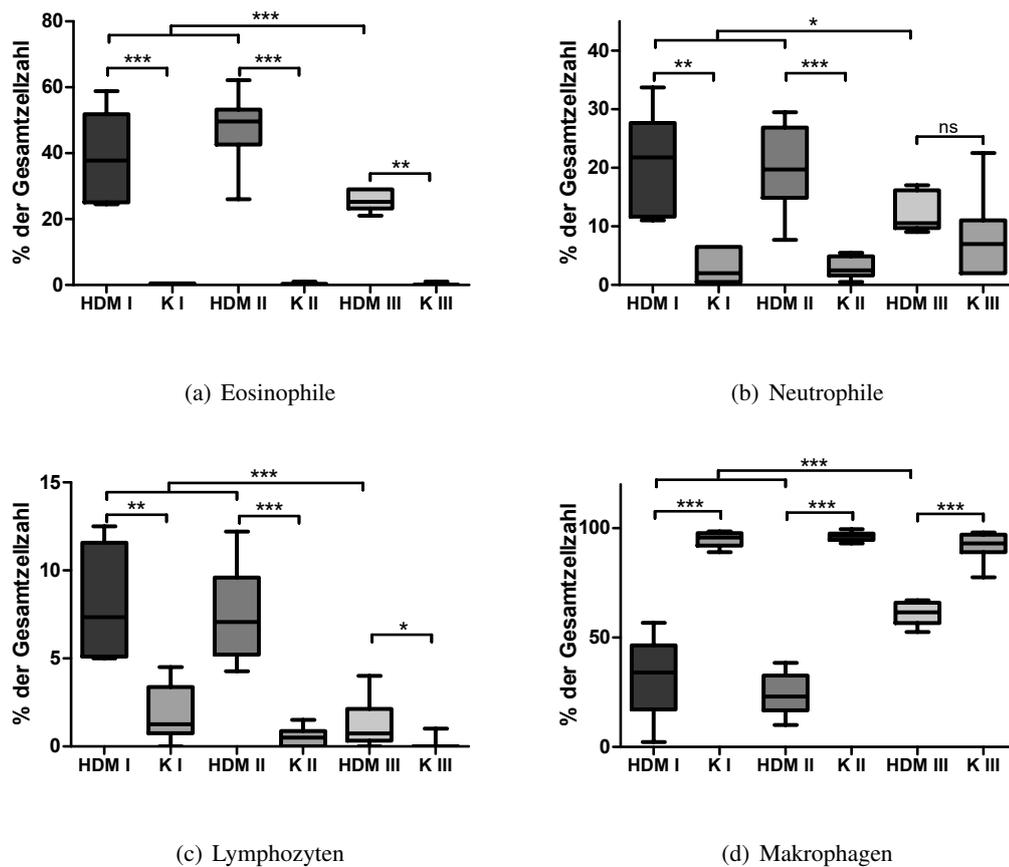


Abbildung 4.4 – Zellunterschiede der BAL. Darstellung im Box-Plot 5. - 95. Perzentile. K steht für Kontrollgruppe.

als Abstufung zwischen Kontrolle und 5-Wochen-Modellen mit statistischer Signifikanz zu beiden Gruppen. Die Ergebnisse für die jeweils unterschiedlichen Zelltypen sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

4.1.3 Differentialblutbild

Mit etwa 80 - 90% waren der Großteil der Leukozyten Lymphozyten (Abbildung 4.7). Sie kamen in der Versuchsgruppe von HDM II 3,6% weniger vor als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0013$; Median: 86,25%). Zwischen den beiden Versuchsgruppen HDM II und HDM III bestand ein nicht signifikanter Unterschied ($p = 0,06$) von 6,2%. Die Versuchsgruppe HDM III zeigte keinen Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Asthmagruppe HDM II hatte mit einer Differenz von 4,1% signifikant mehr neutrophi-

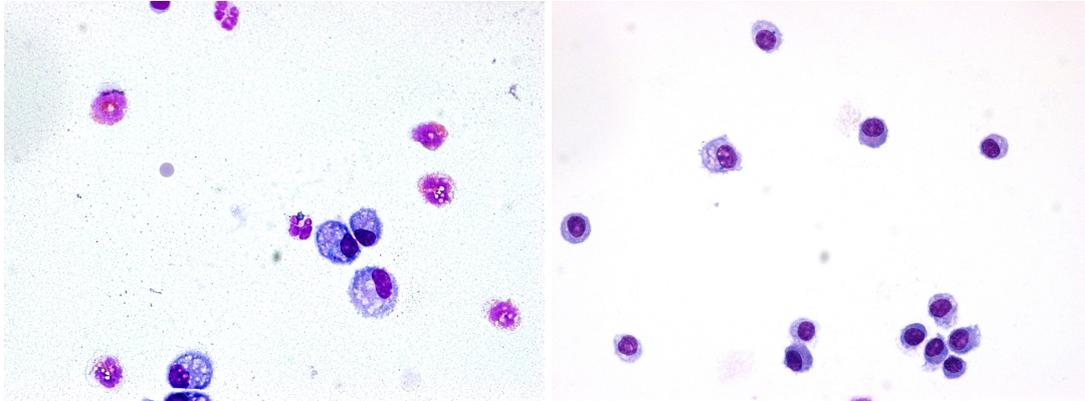
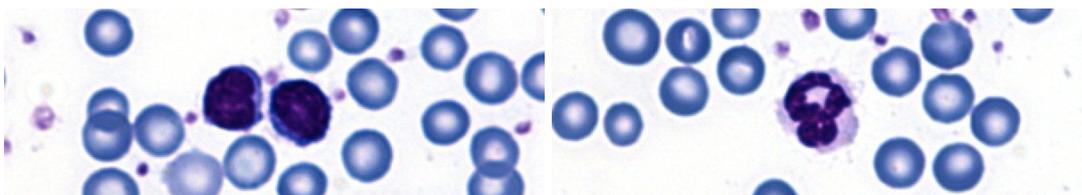


Abbildung 4.5 – Mikroskopische Bilder der BAL. Im linken Bild ist die BAL eines HDM-Tieres zu sehen. Auffällig sind die vielen Entzündungszellen wie Eosinophile und Neutrophile. Im rechten Foto bestimmen dagegen Makrophagen das Bild. Es stammt von einem Kontrolltier.



(a) Lymphozyten

(b) Neutrophiler Granulozyt

Abbildung 4.6 – Mikroskopische Bilder des Differentialblutbildes mit den beiden häufigsten Zelltypen.

le Granulozyten als deren Kontrollgruppe ($p = 0,0037$; Median: 12,2%). Auch zur Versuchsgruppe HDM III gab es einen signifikanten Unterschied ($p = 0,026$; Median: 10,65%). Die Versuchsgruppe HDM III zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle ($p = 0,67$).

Neben Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Abbildung 4.6) waren vereinzelt in beiden Gruppen auch Monozyten und eosinophile Granulozyten auszumachen. Für deren Auftreten konnte festgestellt werden, dass im Blutausstrich der Versuchsgruppe HDM III am meisten eosinophile Granulozyten zu finden waren. Da es sich dabei insgesamt lediglich um ein oder zwei Zellen handelte, kann an dieser Stelle höchstens von einer Tendenz gesprochen werden.

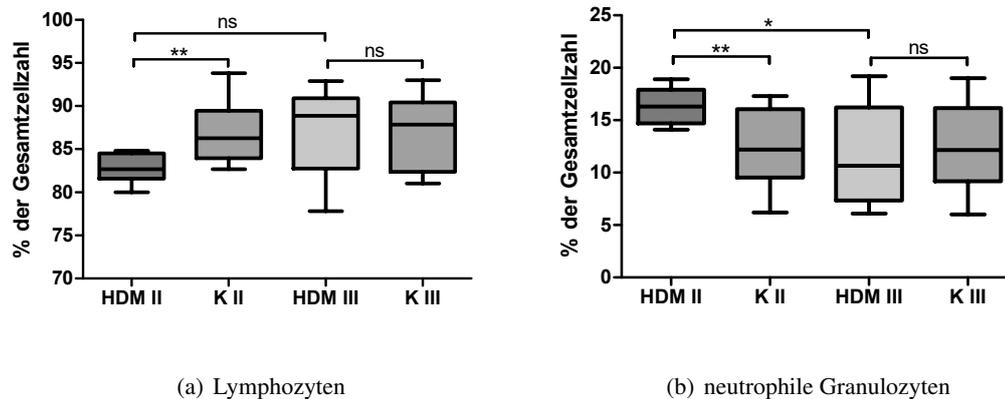


Abbildung 4.7 – Ergebnisse des Differentialblutbildes. Darstellung im Box-Plot 5. - 95. Perzentile. K steht für Kontrollgruppe.

4.1.4 Anteil der Becherzellen

Alle murinen, mit PAS gefärbten Lungenschnitte der Asthmatiere zeigten einen hohen Anteil an mizinproduzierenden Becherzellen. Alle HDM-Versuchsgruppen waren signifikant ($p < 0,001$) zu den Kontrollgruppen erhöht. Innerhalb der Versuchsgruppen wies HDM I mit $60 \pm 14,7\%$ den höchsten Anteil an Becherzellen auf und hatte signifikant mehr ($p = 0,019$) als HDM II mit $37,0 \pm 13,2\%$ und HDM III ($p = 0,0047$) mit $22,0 \pm 13,2\%$. Zwischen HDM II und HDM III konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8(a) aufgetragen. Repräsentative Schnittbilder sind in Abbildung 4.9 zu sehen.

Es gab einen Ausreißer in der Kontrollgruppe von HDM II mit einem Becherzellanteil von 19% bei Tier Nr. 28. Eine Erklärung dafür liefert der Nachweis eines Fremdkörperaspirats in dem untersuchten Lungenlappen (siehe Abbildung 4.9). Die Plasmaprobe Nr. 28 wurde daher

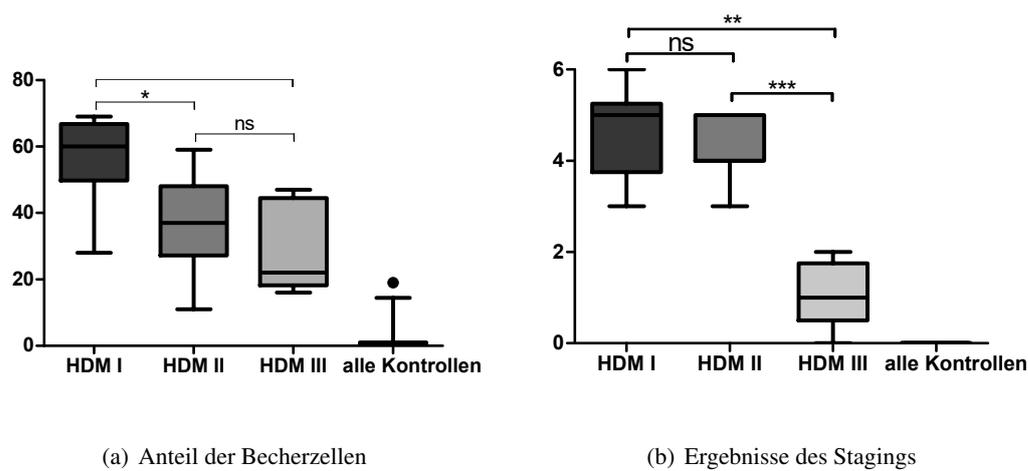


Abbildung 4.8 – Histologische Auswertung der Asthmarkerkmale. Darstellung im Box-Plot mit 5. - 95. Perzentile.

vom folgenden microRNA Screening ausgeschlossen.

4.1.5 Pulmonale Inflammation

Im Staging, dessen Resultate in Abbildung 4.8(b) abgebildet sind, zeigte die Versuchsgruppe von HDM I mit einem Median von 5 von maximal 6 Punkten die stärkste Inflammation. Gefolgt von HDM II mit 4 von 6 Punkten zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. HDM III hatte im Vergleich zu den ersten zwei HDM-Modellen signifikant weniger Punkte (Median: 1). In den Kontrollgruppen war keine Inflammation nachweisbar. Beispiele für typische Merkmale sind in Abbildung 4.10 zu sehen.

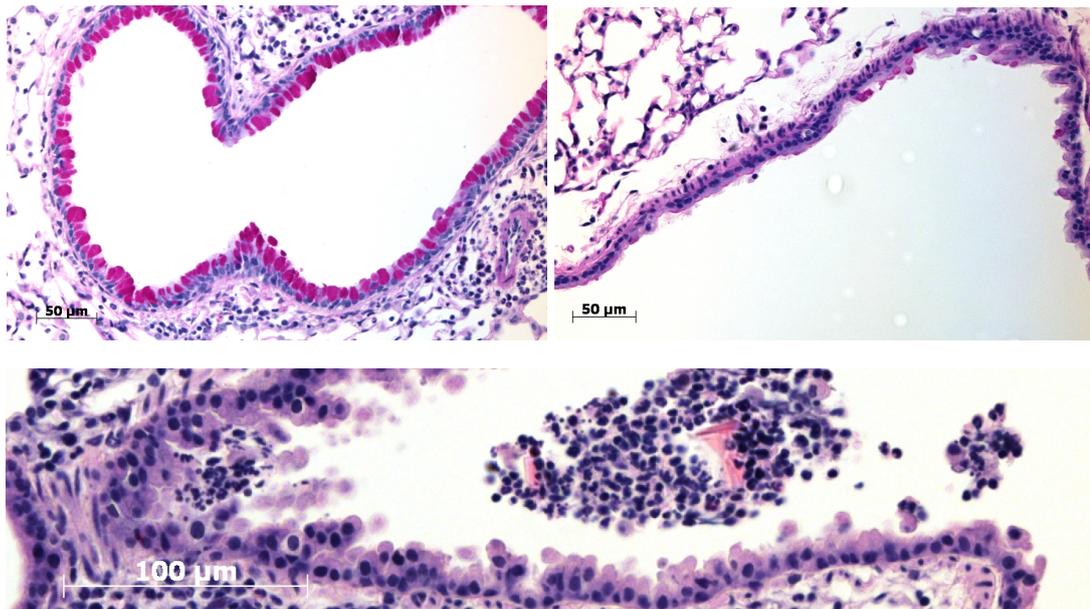


Abbildung 4.9 – Mikroskopische Bilder der Becherzellen. Oben links ist ein exemplarisches Schnittbild eines HDM-Tieres zu sehen. Vorallem die größeren Atemwege enthielten reichlich Becherzellen. Im Vergleich dazu ist oben rechts ein repräsentatives Schnittbild eines Kontrolltieres abgebildet. Unten ist ein Anschnitt des Fremdkörpers in Kontrolltier Nr. 28 dargestellt.

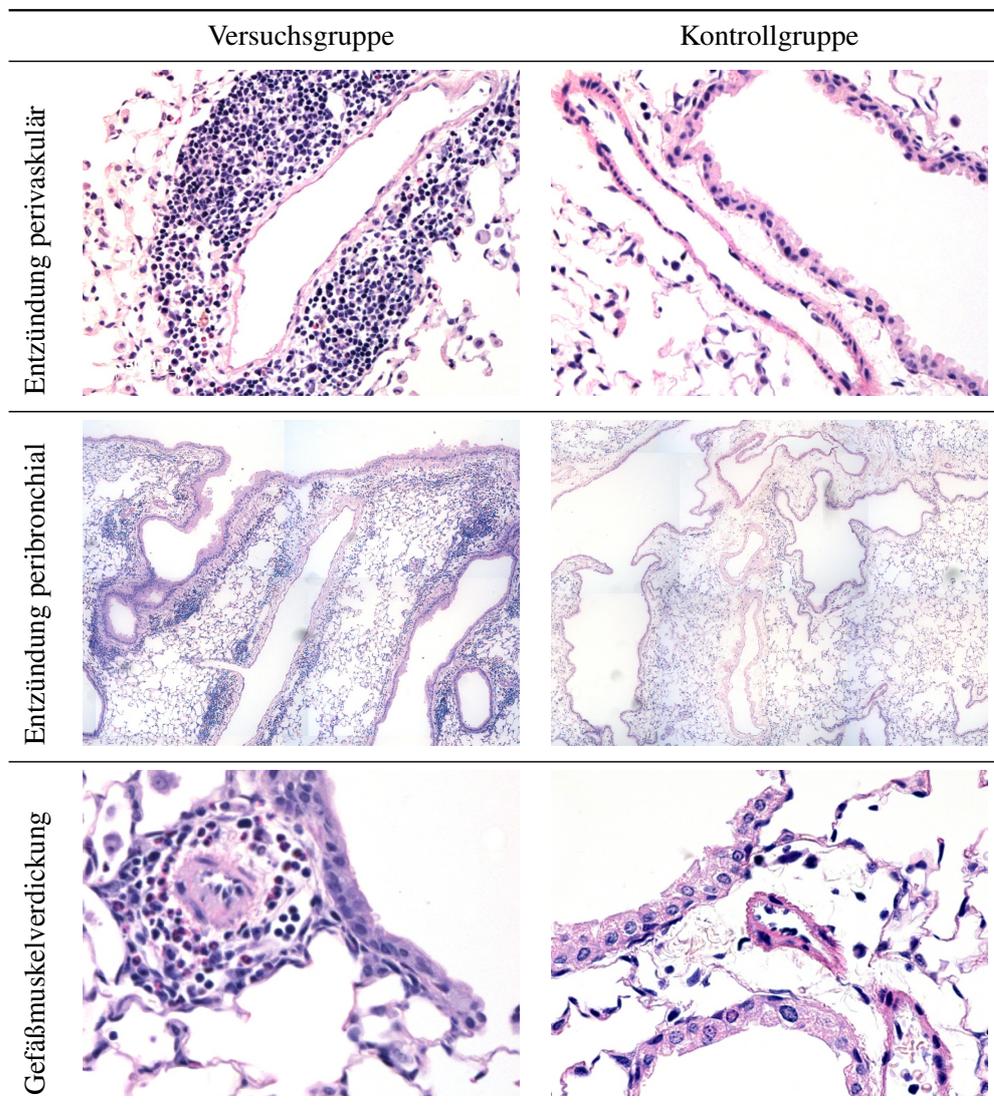


Abbildung 4.10 – Mikroskopische Bilder des Stagings. Die Bilder sind so angeordnet, dass sie zur Versuchs- oder Kontrollgruppe sowie zu einem Merkmal des Stagings zugeordnet werden können.

4.2 Biomarker Identifizierung

4.2.1 Abschätzung der Hämolyse

Die Seren der Hämolyserieihe waren für Extinktionswerte $E_{415} < 1,25$ nicht oder vernachlässigbar hämolysiert (Abbildung 4.11), da die Hämolyse keinen Einfluss auf die Expression von miR-451a zeigte (Abbildung 4.12). Die Gewinnung von nicht hämolysierten Serum- oder Plasmaproben bei retrobulbärer Blutentnahme gelang ausgesprochen selten. Da pro Tier lediglich eine Blutentnahme möglich war, mussten auch Proben verwendet werden, die aufgrund der Extinktionsmessung als hämolysiert galten. Bei den realen Plasmaproben zeigten sich stabile C_T -Werte für miR-451a bis zu einer Extinktion von $E_{415} = 2,5$, sodass das Proben bis zu diesem Wert als tolerabel hämolysiert eingeschätzt wurden.

Die Extinktionswerte der Plasmaproben konnten somit in drei Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 4.1). Die erste Gruppe mit vernachlässigbarer Hämolyse ($< 1,25$) waren vor allem Plasmen der Versuchsrunde HDM II. Die nächste Gruppe mit tolerabler Hämolyse (Extinktion $1,25 - 2,5$) waren Plasmaproben aus HDM II und III. HDM I und die Hälfte der Proben aus HDM III wurde wegen zu hoher Extinktionswerten ($> 2,5$) ausgeschlossen.

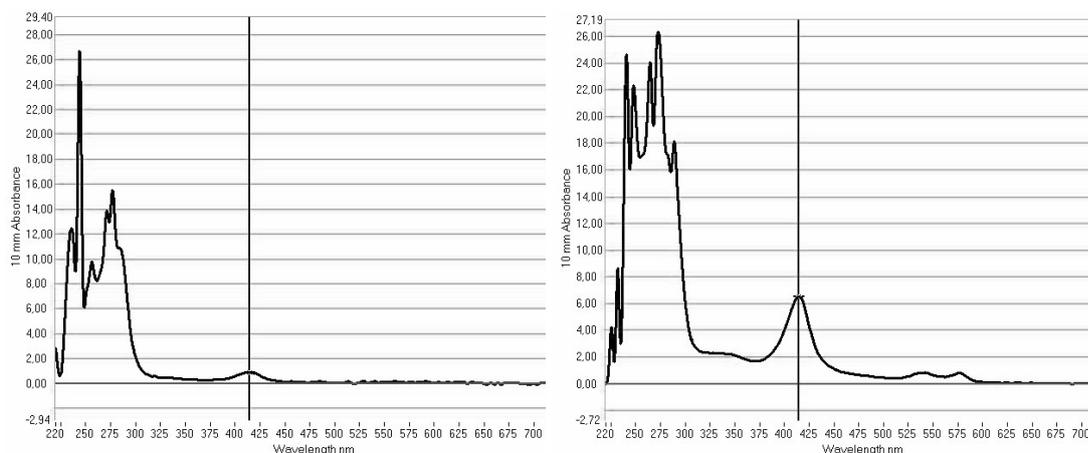
Tabelle 4.1 – Hämolysewerte der Versuchsrunden. Die erste Zahl A des Zahlenpaars A/B gibt die Anzahl der Tiere in der Versuchsgruppe an. Die zweite Zahl B die Anzahl der Kontrollgruppe.

	< 1,25	1,25 - 2,5	> 2,5
HDM I	0/0	0/0	6/6
HDM II	0/3	10/8	1/2
HDM III	1/0	3/3	4/5

HDM I enthielt keine einzige verwertbare Plasmaprobe. Plasmen aus HDM III eigneten sich ebenso wenig für das Screening, da hierfür jeweils 6 Proben pro Versuchs- und Kontrollgruppe benötigt wurden. Aus der Versuchsrunde HDM II wiesen ausreichend viele Proben diese Voraussetzungen auf. Diese Werte sind in Tabelle 4.2 unter Hb-Abs. nachzulesen.

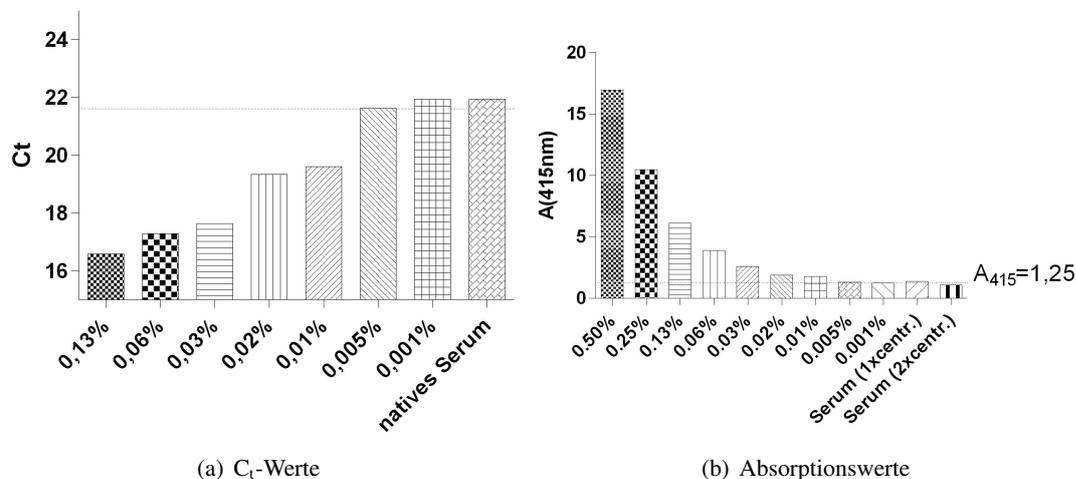
4.2.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die Gel-Elektrophorese zeigte, dass alle Proben von HDM I und HDM II kurze RNA enthielten. Eine Kontamination wurde bei einem Tier der Kontrollgruppe aus HDM II (Nr. 25) detektiert. Dessen Probe wurde jedoch aufgrund starker Hämolyse bereits im vorangehenden Schritt ausgeschlossen. Die Ausbeute der RNA lag zwischen 55 und 170 pg/ μ l (Tabelle 4.2). Um die Reliabilität der Konzentrationsbestimmung zu überprüfen, wurden 5 Proben zweifach



(a) Spektrophotometrie einer vernachlässigbar hämolysierten Probe. Extinktion = 1. (b) Spektrophotometrie einer stark hämolysierten Probe. Extinktion = 6,3.

Abbildung 4.11 – Abschätzung der Hämolysen. Beispiele einer sehr gering und einer stark hämolysierten Plasmaprobe. Deutlich ist der Absorptionspeak bei 415 nm zu erkennen. (b) zeigte auch die typischen zwei flacheren Wellen bei 540 nm und 580 nm.



(a) Ct-Werte

(b) Absorptionswerte

Abbildung 4.12 – Hämolysensreihe. Von artifizell unterschiedlich stark hämolysierten Seren wurde die Expression von miR-451a sowie die Extinktion gemessen. Bis zu einer Hämolysen von 0,005% waren sowohl das Expressionsniveau als auch die Absorption vergleichbar. Der Extinktionswert für eine vernachlässigbare Hämolysen wurde auf 1,25 festgesetzt.

Tabelle 4.2 – Entscheidungstabelle für das Screening. Erstes Kriterium war der Hämolyseparameter Hämoglobin-Absorption (Hb-Abs.) < 2,5. Da die Konzentrationsmessungen wenig reliabel waren, wurden die Messwerte aus der qPCR stärker gewichtet. Die fett gedruckten Nr. wurden für das Screening ausgewählt.

Nr.	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Hb-Abs.	1,6	1,8	1,7	1,6	1,9	2,5	2,9	2,8	2,2	2,3	1,9	1,9
pg/µl	139	122	104	75	76	77	57	77	94	162	141	104
C _t 191-5p	31,0	31,3	32,0	30,9	31,3	31,3	31,2	29,1	31,1	29,2	30,7	30,7
C _t 342-3p	29,4	30,4	29,5	29,6	29,8	29,8	30,0	29,5	30,1	29,2	29,2	29,5
C _t 451a	23,3	23,9	23,9	21,9	23,9	23,4	22,6	22,7	22,7	22,6	23,1	22,5
C _t spike-in	19,4	19,6	19,5	19,4	19,6	19,2	19,5	19,7	19,2	18,9	19,0	19,7
Nr.	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Hb-Abs.	3,7	3,0	2,3	1,5	2,5	2,5	1,8	0,9	0,9	0,9	1,7	1,7
pg/µl	46	135	96	78	82	170	106	128	137	129	128	55
C _t 191-5p	-	29,4	29,9	29,8	29,9	29,6	31,1	28,6	30,1	30,5	29,7	30,6
C _t 342-3p	-	28,2	29,4	29,4	29,4	29,3	29,9	29,4	29,4	30,0	29,9	30,1
C _t 451a	-	21,4	23,2	23,6	22,7	22,5	23,9	23,0	22,2	22,7	23,0	23,7
C _t spike-in	-	19,7	19,5	19,9	19,5	19,6	19,7	20,1	19,8	19,8	19,9	19,6

gemessen. Die Standardabweichungen lagen dabei zwischen minimal 2% und maximal 41% (Mittelwert 24%). Die Konzentrationsmessung der microRNA war somit zu wenig reliabel um die Konzentrationen durch Konzentrieren oder Verdünnen aneinander anzupassen.

Alle noch nicht ausgeschlossenen Proben¹ aus Versuch HDM II lieferten in der qPCR einen vergleichbaren C_t-Wert (siehe Tabelle 4.2). Ausschlusskandidat war Probenr. 16. Der C_t-Wert von miR-451a war deutlich vermindert, obwohl die restlichen C_t-Werte mit denen der anderen Proben vergleichbar waren und die Extinktionsmessung auf eine tolerable Hämolyse hindeutete. Die durchgeführte no-template- und die RT(-)-Kontrolle waren beide negativ.

4.2.3 MicroRNA Screening

Von den jeweils 6 geeignetsten Plasmaproben der Versuchs- bzw. der Kontrollgruppe wurden mit einer Fokus microRNA PCR Platte die Expression von jeweils 175 verschiedenen microRNAs gemessen. Diese wurden anschließend unter Bildung von Quotienten gegenüber allen anderen microRNA-Expressionen derselben Probe ins Verhältnis gesetzt.

Im HDM-Modell waren 170 microRNA-Quotienten signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen. Da die Unterschiede gering waren, wurde auf eine Adjustierung der

¹Bisher ausgeschlossen wurden Nr. 25 und Nr. 28.

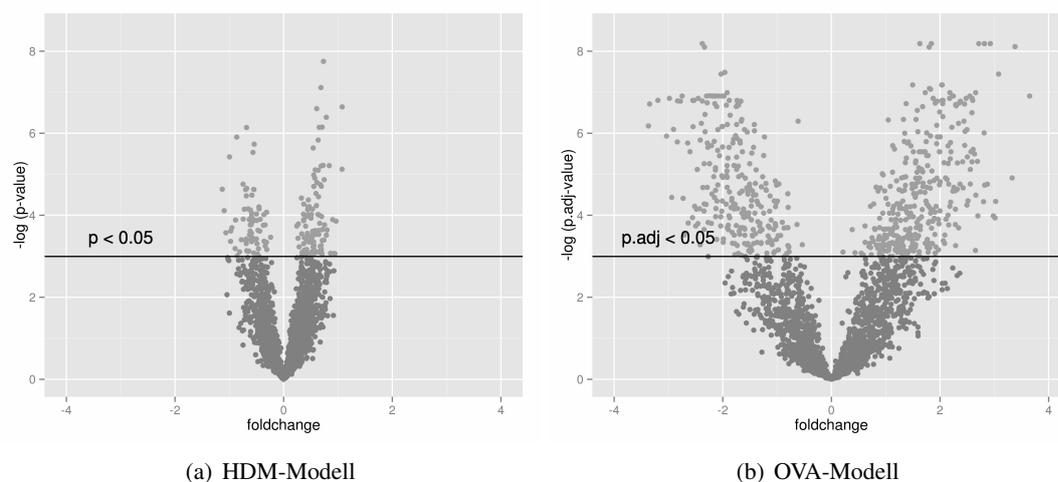


Abbildung 4.13 – P-Werte der microRNA-Quotienten des Screenings. Die Darstellung als Volcano-Plot präsentiert den negativen dekadischen Logarithmus des (adjustierten) p-Wertes auf der x-Achse und die Expressionsänderung als Mittelwertdifferenz beider Gruppen (foldchange) auf der y-Achse.

p-Werte verzichtet. In den bereits vorliegenden Screening-Daten des OVA-Modells fanden sich nach p-Wert-Korrektur nach Benjamini & Hochberg [162] in der Versuchsgruppe 599 signifikant verschieden ausgeprägte microRNA-Quotienten gegenüber der Kontrollgruppe. Abbildung 4.13 zeigt die p-Werte der einzelnen Quotienten über deren Expressionsänderung für jeweils beide Modelle.

75 microRNA-Quotienten waren sowohl im HDM- als auch im OVA-Modell signifikant ($p < 0,05$) verändert. Davon zeigten 18 eine mögliche Abgrenzung zu einer Atopie. Eine Auflistung der microRNA-Quotienten ist in Tabelle 4.3 zu sehen.

Der Quotient von *miR-26b-5p* : *miR-30c-5p* wurde für die weitere Analyse ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses ist in diesem Fall sehr hoch, da keine der beiden microRNAs in einer anderen Kombination auftaucht. Läge eine Regulation einer dieser beiden microRNAs vor, so wäre diese auch in Kombination mit einer anderen regulierten oder stabilen microRNA zu finden. Die übriggebliebenen hypothetisch Asthma-spezifisch veränderten microRNAs sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.3 – Signifikante microRNA-Quotienten aus dem Screening

Quotient	p-Wert HDM	adjustierter p-Wert OVA
Im HDM/OVA-Modell signifikant und nicht signifikant zwischen Atopie und Kontrolle		
miR-130a-3p : miR-27a-3p	0,045	0,014
miR-18a-5p : miR-27a-3p	0,004	0,023
miR-425-5p : miR-27b-3p	0,008	0,030
miR-18a-5p : miR-27b-3p	0,006	0,023
miR-18a-5p : miR-22-3p	0,021	0,009
miR-27b-3p : miR-320a	0,044	0,025
miR-25-3p : miR-27b-3p	0,036	0,048
miR-425-5p : miR-27a-3p	0,002	0,038
miR-18a-5p : miR-29c-3p	0,027	0,004
miR-27a-3p : miR-23a-3p	0,023	0,033
miR-27a-3p : miR-320a	0,033	0,025
miR-25-3p : miR-27a-3p	0,020	0,045
miR-23a-3p : miR-21-5p	0,024	0,039
miR-26b-5p : miR-30c-5p	0,011	0,024
miR-21-5p : miR-15a-5p	0,018	0,009
Im HDM/OVA-Modell signifikant und signifikant zwischen Asthma und Atopie		
miR-148b-3p : miR-29a-3p	0,006	0,0002
miR-342-3p : miR-223-3p	0,015	0,001
Beide Eigenschaften sind zutreffend		
miR-140-3p : miR-27a-3p	0,047	0,039

Tabelle 4.4 – Ausgewählte einzelne microRNAs aus dem Screening

miR-15a-5p	miR-27a-3p	miR-148b-3p
miR-18a-5p	miR-27b-3p	miR-223-3p
miR-21-5p	miR-29a-3p	miR-320a
miR-22-3p	miR-29c-3p	miR-342-3p
miR-23a-3p	miR-130a-3p	miR-425-5p
miR-25-3p	miR-140-3p	

4.2.4 Validierung der Screeningdaten

Die 17 ausgewählten miRNAs (Tabelle 4.4) wurden in Einzelassays jeweils dreimal in einer erweiterten Kontroll- und Versuchsgruppe validiert. Es fanden sich im HDM-Modell 34 signifikante Quotienten zwischen der Asthmagruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10). Im OVA-Modell waren 49 Ratios zwischen OVA-Asthma (n = 10) und OVA-Kontrolle (n = 10) signifikant. Zwischen OVA-Asthma und OVA-Atopie (n = 9) zeigten 20 Ratios einen signifikanten Unterschied. 19 microRNA-Quotienten waren sowohl im HDM- als auch im OVA-Modell signifikant verändert (Venn-Diagramm in Abbildung 4.14). Mit miR-18a-5p, miR-22-3p und miR-148b-3p konnten keine signifikante Ratio gebildet werden. Alle 19 Ratios sind in den Plots in den Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.16 abgebildet. Jeweils unter dem jeweiligen Plot sind die p-Werte angegeben. Das statistische Ergebnis „p.hdm“ ist der p-Wert aus einem t-Test der HDM-Asthmagruppe gegenüber der HDM-Kontrollgruppe. Analog verhält es sich mit „p.ovaasthma“. „p.ovaatopie“ charakterisiert den Unterschied der Asthmagruppe gegenüber der Atopiegruppe im OVA-Modell. Der microRNA-Quotient mit dem geringsten p-Wert im HDM-Modell fand sich bei *miR-342-3p : miR-140-3p* (p.hdm < 0,001). Im OVA-Modell war es *miR-29a-3p : miR-15a-5p* (p.ovaasthma < 0,001).

Die Zahlenwerte der microRNA-Quotienten der Kontrollgruppen beider Modelle HDM und OVA lagen auf vergleichbarer Höhe, während die Werte der Asthmagruppen teilweise unterschiedlich hoch ausgeprägt waren. Dabei waren die Ratios der Asthmagruppe des OVA-Modells verstärkt gegenüber der Kontrollgruppe verändert als die des HDM-Modells.

MiR-342-3p : miR-25-3p und *miR-425-5p : miR-29a-3p* waren nicht nur zwischen der Asthma- und der Kontrollgruppe signifikant verändert, sondern auch zwischen der Asthma- und der Atopiegruppe. Die Zahlenwerte der microRNA-Quotienten lagen dabei nicht auf Höhe der Kontrollgruppe, sondern waren in die gleiche Richtung wie die Asthmagruppe verändert, aber stärker. Diese Konstellation fand sich bei allen microRNA-Quotienten, die miR-29a-3p und miR-25-3p in der Ratio enthielten, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Nur bei *miR-342-3p : miR-25-3p* und *miR-425-5p : miR-29a-3p* war die Ratio so stark verändert, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Asthma und Atopie nachweisbar war.

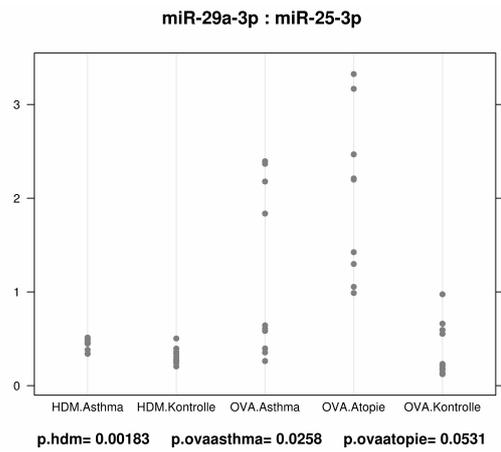
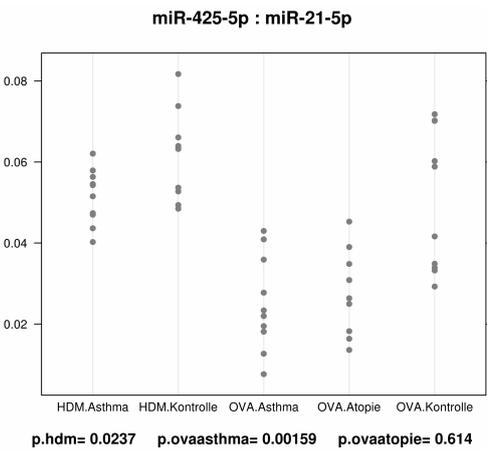
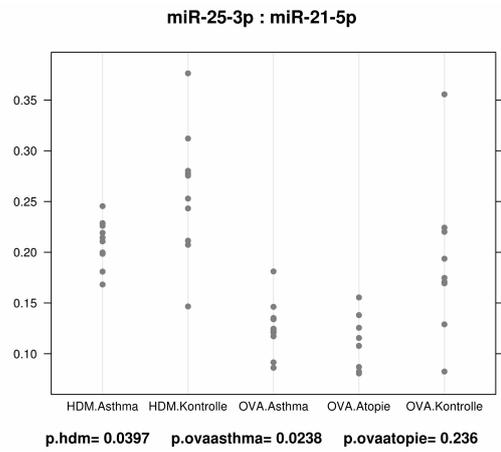
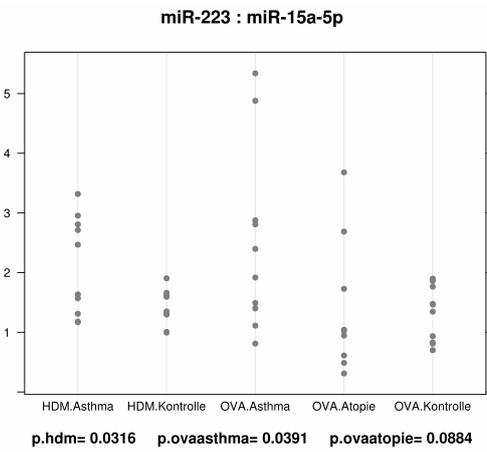
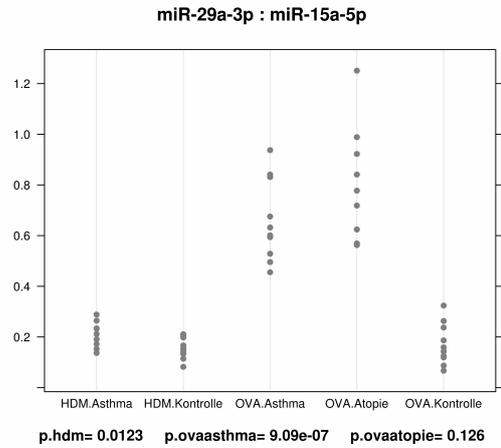
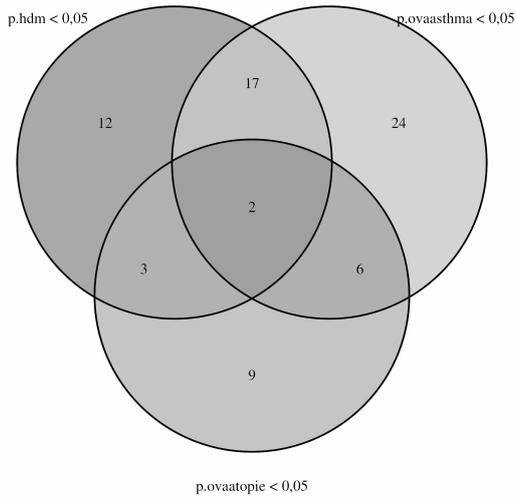


Abbildung 4.14 – Venn-Plot signifikanter Quotienten und Ergebnisse der Validierung, Teil 1

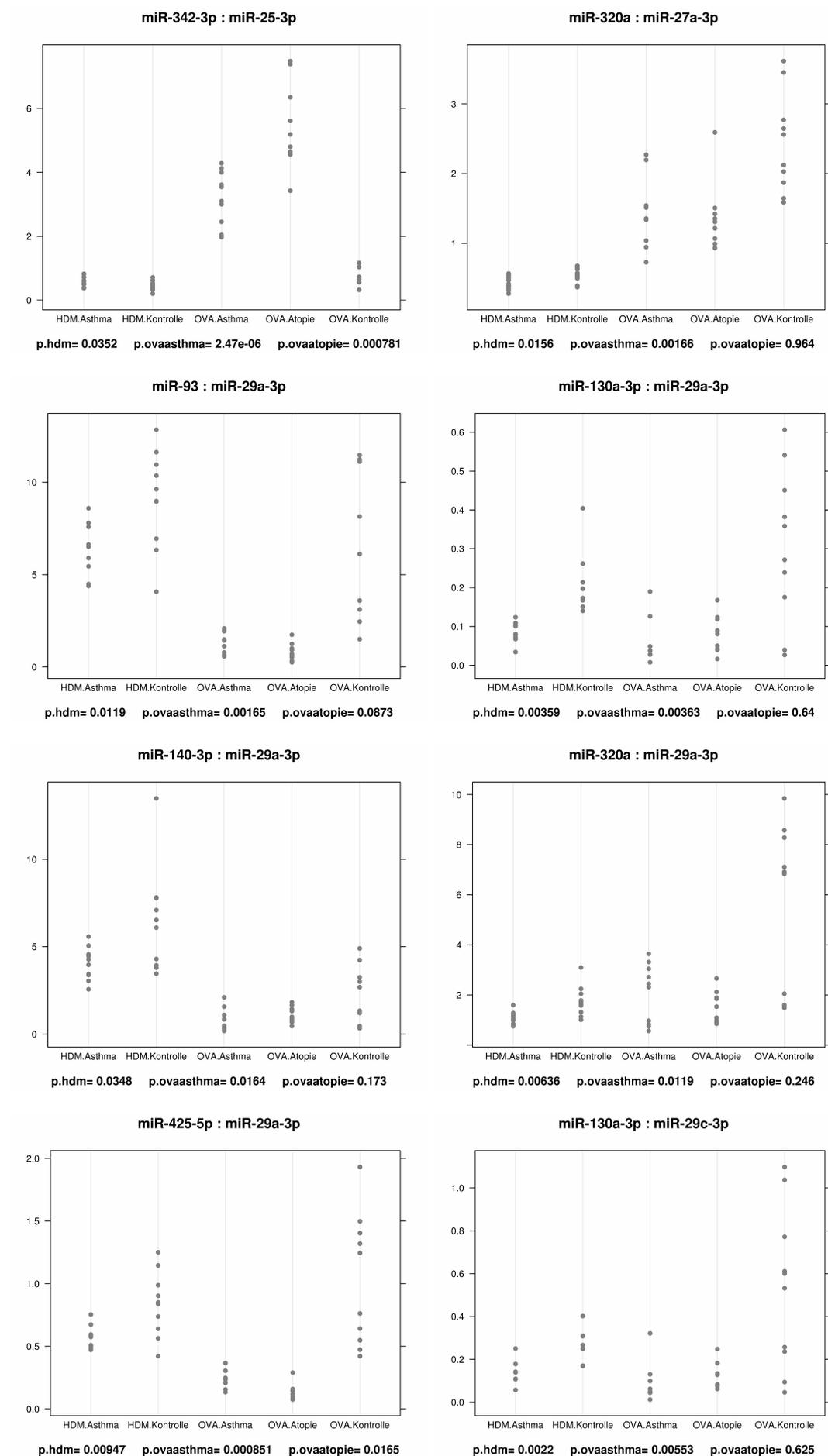


Abbildung 4.15 – Ergebnisse der Validierung, Teil 2

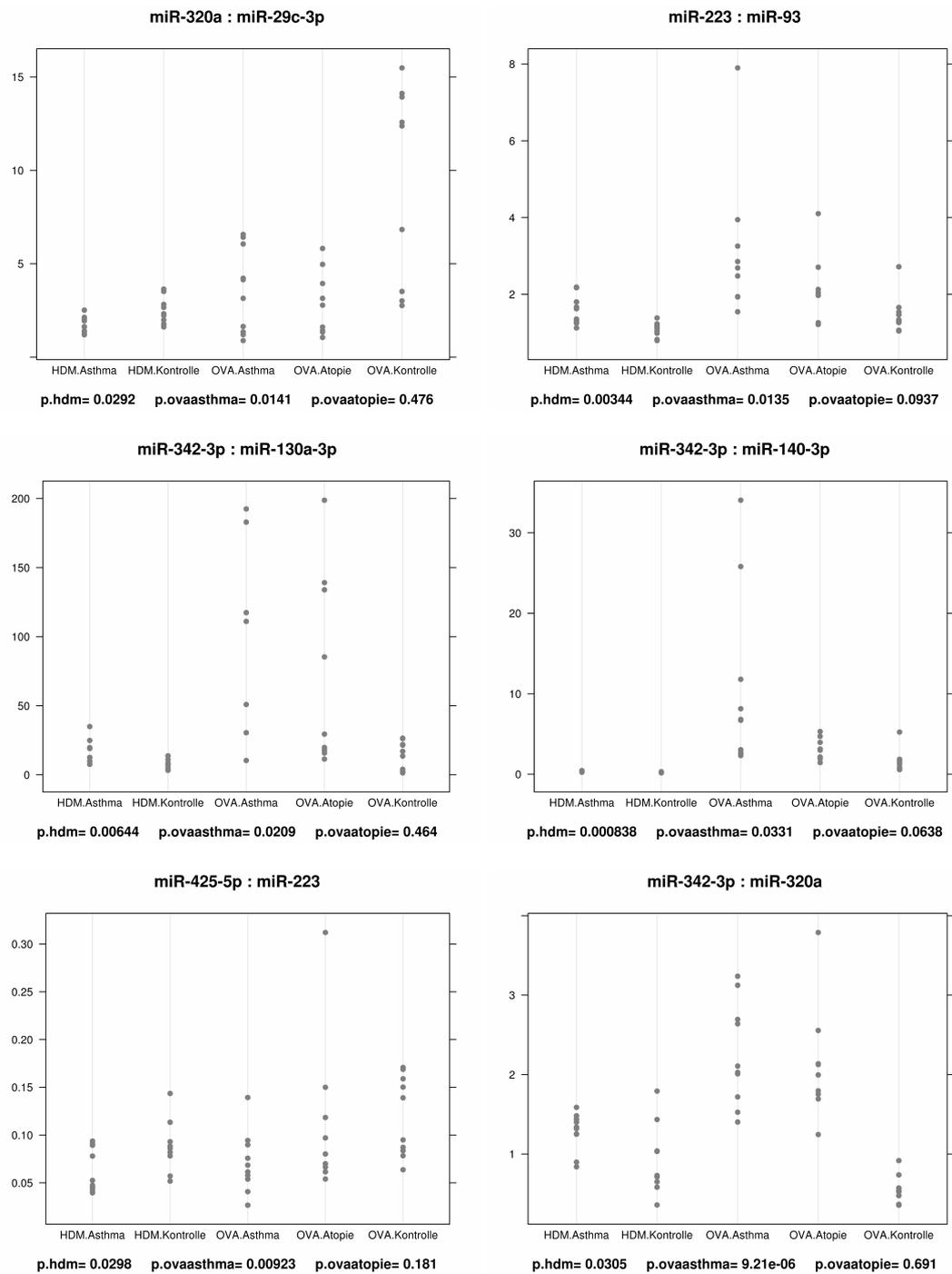


Abbildung 4.16 – Ergebnisse der Validierung, Teil 3

4.2.5 ROC-Analyse

Für die weitere ROC-Analyse wurden microRNA-Quotienten, welche miR-25-3p oder miR-29a-3p ausgeschlossen, da sie durch die Atopie stark beeinflusst waren. Für die übrigen zehn Ratios lagen die AUC-Werte zwischen 0,620 und 0,772. Der microRNA-Quotient mit der größten AUC war *miR-425-5p* : *miR-223-3p* mit einer Fläche von 0,772. Den besten Trennwert ergab die ROC-Analyse bei 0,1 mit einer Spezifität von 75,9% und Sensitivität von 70,0%.

Eine vergleichbare AUC von 0,766 und einem Trennwert bei 1,5 mit einer Spezifität von 72,4% und einer Sensitivität von 75,0% zeigte die ROC-Analyse bei der Ratio *miR-223-3p* : *miR-93-5p*. Repräsentativ sind diese zwei microRNA-Quotienten mit der größten AUC in Abbildung 4.17 zu sehen. Die weiteren AUC-Werte der übrigen microRNA-Quotienten sind absteigend sortiert in Tabelle 4.5 aufgelistet.

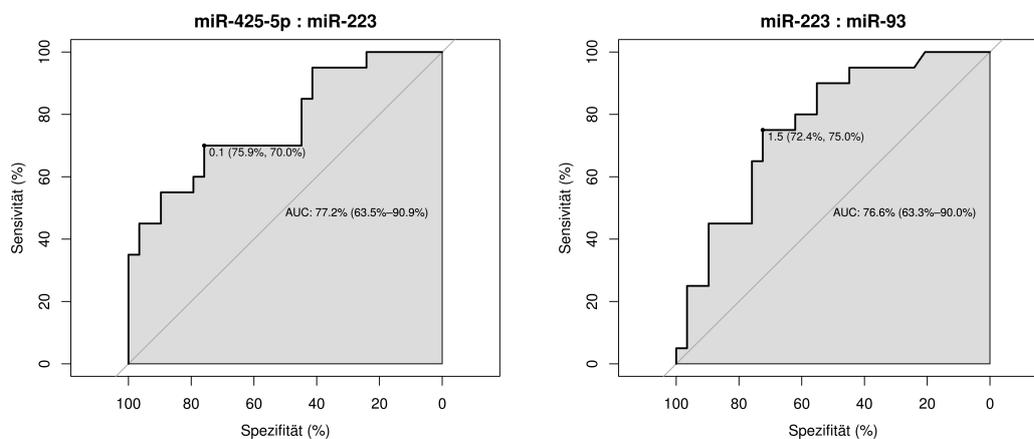


Abbildung 4.17 – ROC-Kurve der beiden microRNA-Quotienten mit der größten AUC. Die AUC ist mit dem 95%-Konfidenzintervall angegeben, welches in Klammern steht. Der beste Trennwert ist in folgendermaßen markiert: Trennwert (Spezifität, Sensitivität)

Tabelle 4.5 – AUC-Werte der microRNA-Quotienten

Rang	microRNA-Quotient	AUC
1	miR-425-5p : miR-223-3p	0,772
2	miR-223-3p : miR-93-5p	0,766
3	miR-223-3p : miR-15a-5p	0,748
4	miR-130a-3p : miR-29c-3p	0,743
5	miR-342-3p : miR-320a	0,736
6	miR-320a : miR-27a-3p	0,695
7	miR-320a : miR-29c-3p	0,674
8	miR-342-3p : miR-130a-3p	0,663
9	miR-425-5p : miR-21-5p	0,633
10	miR-342-3p : miR-140-3p	0,620

4.2.6 Kombination von Biomarkern

Die optimale Kombination der microRNA-Quotienten zeigte sich bei einer Anzahl von sechs. Dabei lag die AUC auf dem Höchstwert und die Summe aus Sensitivität (87,5%) und Spezifität (88,5%) war am größten. Abbildung 4.18 zeigt auf der linken Seite den Verlauf von AUC, Sensitivität und Spezifität über den möglichen Kombinationen. Ein weiterer Zugewinn war ab sechs Verknüpfungen nicht mehr zu verzeichnen. Die lineare Regressionsanalyse erbrachte folgendes Ergebnis:

$$0,1601 \cdot \frac{\text{miR-425-5p}}{\text{miR-223-3p}} + 0,915 \cdot \frac{\text{miR-223-3p}}{\text{miR-93-5p}} + 1,1762 \cdot \frac{\text{miR-223-3p}}{\text{miR-15a-5p}} \\ - 4,0171 \cdot \frac{\text{miR-130a-3p}}{\text{miR-29c-3p}} - 0,3051 \cdot \frac{\text{miR-342-3p}}{\text{miR-320a}} - 1,8447 \cdot \frac{\text{miR-320a}}{\text{miR-27a-3p}} + 3,7625$$

Insgesamt gingen neun Variablen in die Gleichung ein, die eine Abhängige (Testwert) bilden. Die ROC-Analyse der microRNA-Kombination ist in Abbildung 4.18 auf der rechten Seite aufgetragen. Der beste Trennwert lag bei 4,34. Für alle darunterliegenden Testwerte fällt der Test negativ aus und es wird kein Asthma angenommen. Alle darüberliegenden Testwerte sprechen für ein Vorliegen der Erkrankung.

In Abbildung 4.19 sind alle Testwerte der erweiterten Validierungsgruppe abgebildet. Fehlende Werte erklären sich durch einen nicht vorhandenen Messwert einer der an der Kombination beteiligten microRNAs. Zwei Testwerte der OVA-Asthmagruppe liegen unter dem Trennwert (4,34), während die anderen Werte gestreut darüber liegen. Von den 16 Tests sind 14 richtig positiv ausgefallen.

In der Atopiegruppe lagen die Testwerte zu 77,7% unter dem Trennwert. 2 von 9 erbrachten

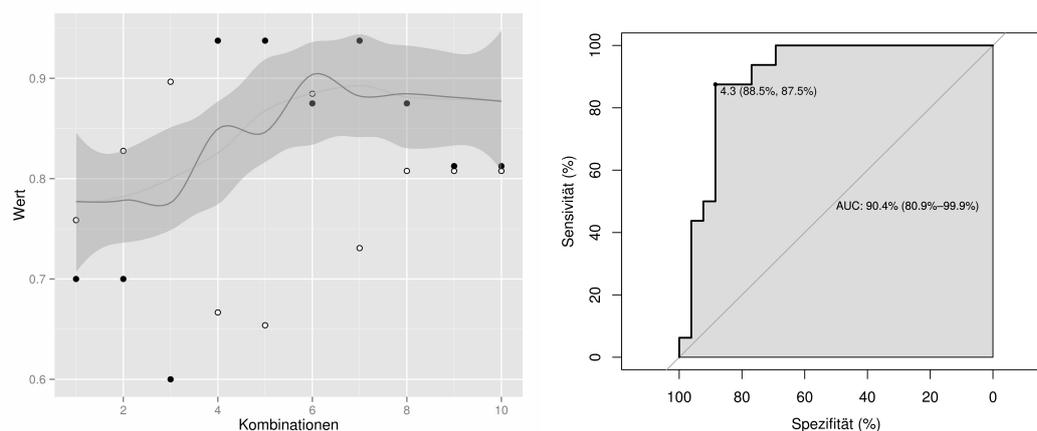


Abbildung 4.18 – Festlegung der Kombinationen mittels ROC. Links: Die Werte für die AUC (Linie mit grauem 95%-Konfidenzintervall), Spezifität (weiße Punkte) und Sensitivität (schwarze Punkte) sind für jede Anzahl an Kombinationen jeweils aufgetragen. Rechts: Abbildung der gewählten Kombination aus 6 microRNA-Quotienten in der ROC-Kurve.

ein falsch positives Ergebnis. Die Kontrollgruppe lieferte bis auf einen Testwert Ergebnisse unter dem Trennwert. 16 von 17 wurden richtig negativ getestet.

4.2.7 Validierung der Biomarkerkombination

Von den insgesamt neun zur Verfügung stehenden Plasmaproben eines in einem externen Labor durchgeführten HDM-Modells waren zwei zu stark hämolysiert. Die übrigen sieben, fünf in der Asthmagruppe und zwei in der Kontrollgruppe, bestätigten die Biomarkersignatur (Abbildung 4.20). Von den 5 Proben der Asthmatiere wurden 4 richtig positiv getestet. Beide Kontrollproben fielen unter den Trennwert (Sensitivität: 80%, Spezifität: 100%).

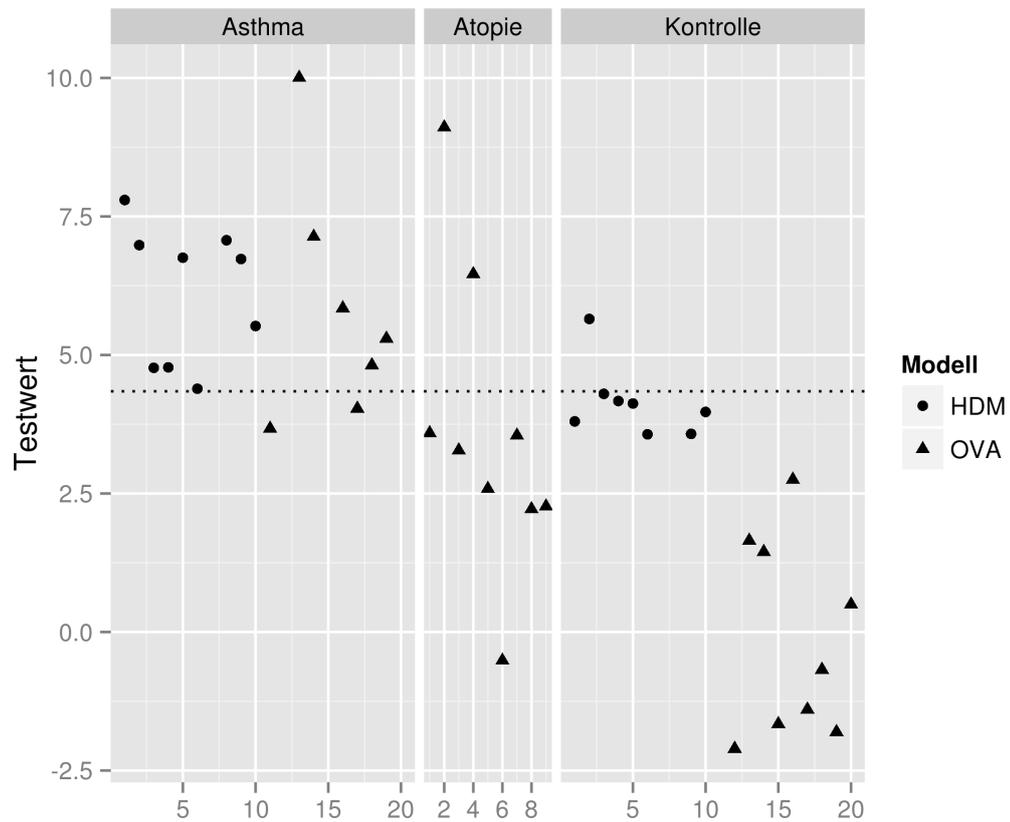


Abbildung 4.19 – Testwerte der erweiterten Validierungsgruppe bei der Anwendung der Biomarkerkombination für sowohl das HDM- als auch das OVA-Modell. Der Trennwert bei 4,34 (gepunktete Linie) markiert die Unterscheidung des Tests in krank (Asthma) oder gesund (kein Asthma).

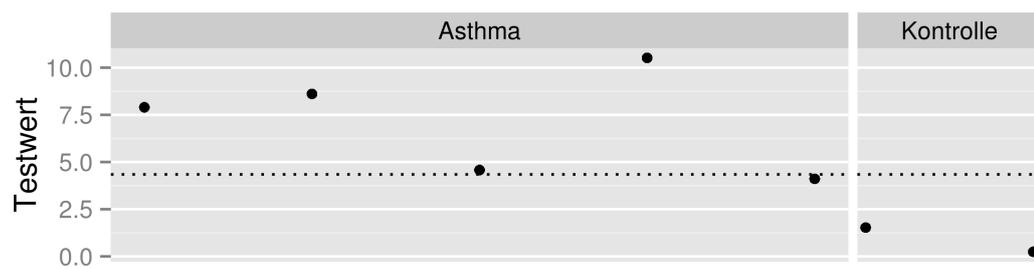


Abbildung 4.20 – Testwerte externer Seren. 6 von 7 Blutproben ließen sich mit dem Trennwert bei 4,34 (gepunktete Linie) unter Anwendung der etablierten Biomarkerkombination richtig testen.

4.2.8 Expressionsverhalten der microRNAs

MiR-29a-3p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-342-3p, miR-21-5p und miR-223-3p zeigten in den qPCR-Daten aus dem Screening eine stärkere Expression in der Asthmagruppe als in der jeweiligen Kontrollgruppe. MiR-140-3p und miR-320a waren im OVA-Modell hochreguliert, während sie im HDM erniedrigt waren. MiR-130a-3p, miR-425-5p, miR-93-5p, miR-15a-5p und miR-25-3p waren in beiden Modellen niedriger exprimiert.

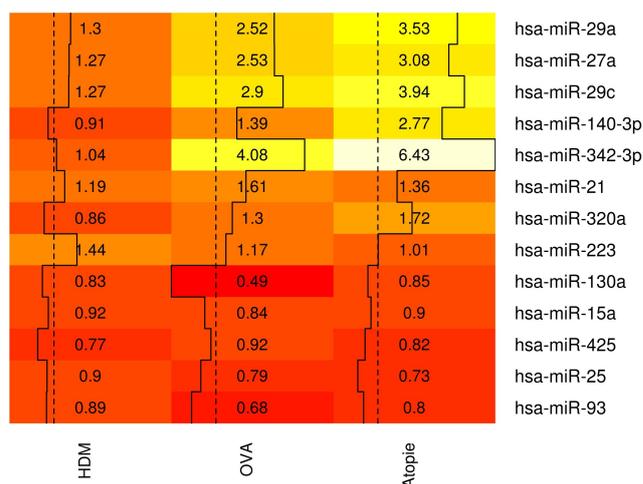


Abbildung 4.21 – Expressionsverhalten der microRNAs als Heatmap. Die angegebenen Werte sind die Mittelwertunterschiede der Expression zwischen der Asthma- und der Kontrollgruppe für das HDM- und OVA-Modell. In der Spalte Atopie sind die Mittelwertdifferenzen zwischen der OVA-Atopie-Gruppe und der Kontrollgruppe abgebildet. Werte > 1 bedeuten eine erhöhte Expression, < 1 eine erniedrigte. Die vertikalen Linien visualisieren die angegebenen Expressionswerte.

5 Diskussion

5.1 Murine Asthmamodelle

Es wurden drei verschiedene HDM-Modelle durchgeführt (siehe Tabelle 3.1, Seite 30). Das 3-Wochen-Modell HDM III wies signifikant weniger Gesamtzellen in der BAL und einen geringeren Anteil an Leukozyten auf als die 5-Wochen-Modelle HDM I und II. Diese waren in den Resultaten der BAL vergleichbar. Stärkere Veränderungen sind durch eine weitere Verlängerung des Modells nicht anzunehmen, weil ein 10-Wochen-Modell vergleichbare Ergebnisse der prozentualen Häufigkeit zeigte. Die Gesamtzellzahl war dort allerdings nur halb so hoch ($1 \cdot 10^5$ Zellen), was möglicherweise durch eine andere Technik der BAL-Gewinnung erklärt werden kann ($2 \cdot 250 \mu\text{l}$) [163].

Auch im histologischen Staging waren HDM I und II vergleichbar, während HDM III signifikant weniger pulmonale Inflammation zeigte. Es liegt nahe, dass diese Ergebnisse Ausdruck einer langsamen Zunahme der Atemwegsentzündung bei längerer inhalativer Antigenexposition sind. Ein signifikanter lungenmorphologischer Unterschied zwischen HDM I und HDM II war jedoch im Vorkommen von Becherzellen zu finden. HDM I zeigte einen signifikant höheren Becherzellanteil als HDM II. Jüngere Mäuse entwickeln demnach möglicherweise bei gleicher inflammatorischer Komponente vermehrt Becherzellen. Eine Aussage darüber, ob andere Autoren ähnliche Beobachtungen zum Becherzellanteil machten, ist schwer möglich, weil kein einheitliches Messverfahren besteht. Neben der in der vorliegenden Arbeit angewandten Normalisierung PAS-positiver Zellen auf die Basalmembran, gibt es semi-quantitative Angaben mit subjektiver kategorialer Abschätzung des Becherzellanteil pro Bronchialanschnitt [164] und die Angabe in Becherzellen pro mm^2 [165].

5.2 Identifikationsstrategie potentieller Biomarker-microRNAs

Um die Proben untereinander vergleichbar zu machen, müssen die Ergebnisse der qPCR normalisiert werden. Ein gängiges Verfahren ist die Normalisierung auf ein Referenzgen, das in allen Gruppen konstant proportional zur Gesamtkonzentration der RNA exprimiert ist. Wäh-

rend bei Untersuchungen der RNA-Expression von murinem zellulärem Gewebe bevorzugt intrazelluläre RNAs, wie die small nuclear RNA U6, ein Bestandteil des Spliceosom, als Referenz genommen werden, sind für den Extrazellularraum keine allgemeingültigen Referenz-RNAs bekannt. Für wenige ausgewählte Erkrankungen wie beispielsweise das Magenkarzinom [166] oder Hepatitis B [167] gibt es Vorschläge geeigneter extrazellulärer microRNAs als Referenz. Dass diese krankheitsspezifisch sind, wird anhand des Referenzvorschlages für das Magenkarzinom deutlich. Dort wurde miR-93 als stabil exprimierte microRNA gefunden, während sie in den beiden hiesigen Asthmamodellen reguliert war (Abbildung 4.21).

Die Suche und Bestätigung eines geeigneten Referenzgens anhand der qPCR-Daten des Screenings blieb erfolglos. Das Anwenden einer *modified global mean normalization* (siehe Abschnitt 3.3.5) bis hin in die Validierungsphase war nicht durchführbar, da einige Ressourcen, wie Blutplasma und Reagenzien, nur in begrenztem Maße zur Verfügung standen. Auch das Herstellen eines artifiziellen Kontrollplasmas durch Mischen der Versuchs- und Kontrollplasmen oder das Hinzufügen einer synthetischen Kontroll-RNA bei der RNA-Extraktion war nicht zielführend, da kein identischer RNA-Gehalt pro Probe vorausgesetzt werden konnte.

Die geeignetste Lösung dieses Problems war, wie schon von anderen Autoren angewandt [156, 157], die Bildung von microRNA-Quotienten. x_1 und x_2 seien zwei beliebige microRNAs der Probe x . y_1 und y_2 von Probe y . Läge ein Referenzgen c_x bzw. c_y vor, würden die Messwerte der jeweiligen Probe darauf normalisiert werden. Die Expressionsänderung fc quantifiziert die Relation der beiden Größen:

$$\frac{x_1}{c_x} \cdot fc_1 = \frac{y_1}{c_y}$$

Durch die Bildung von microRNA-Quotienten fällt die Größe des Referenzgens c heraus:

$$\frac{\frac{x_1}{c_x} \cdot fc_1}{\frac{x_2}{c_x} \cdot fc_2} = \frac{\frac{y_1}{c_y}}{\frac{y_2}{c_y}}$$

$$\frac{x_1}{x_2} \cdot \frac{fc_1}{fc_2} = \frac{x_1}{x_2} \cdot fc_{\text{gesamt}} = \frac{y_1}{y_2}$$

Zusätzlich beeinflusst wird der dadurch neu entstehende fc_{gesamt} , der die Expressionsänderung beider microRNAs enthält. Liegt beispielsweise zwischen x_1 und y_1 ein Expressionsunterschied von $fc_1 = 5$ vor und für x_2 und y_2 ein $fc_2 = 0,5$, so ergibt sich ein $fc_{\text{gesamt}} = 10$. Damit läge der zweite Fall aus Tabelle 5.1 vor.

Der für die statistische Auswertung angewandte Welch-Test enthält als entscheidende Einflussgrößen die Mittelwertdifferenz ($\bar{X} - \bar{Y}$) und die gewichtete empirische Standardabweichung

Tabelle 5.1 – Einfluss der Quotienten auf die Expressionsänderung

Expressionsänderung		Änderung $f_{c_{\text{gesamt}}}$
$x_1 \rightarrow y_1$	$x_2 \rightarrow y_2$	
\nearrow	\nearrow	–
\nearrow	\searrow	\nearrow
\searrow	\nearrow	\searrow
\searrow	\searrow	–

chung s . Der Prüfwert T berechnet sich folgendermaßen:

$$T = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{s}$$

Extremisiert sich durch die Bildung eines Quotienten die Expressionsänderung $f_{c_{\text{gesamt}}}$, wirkt sich dies auf die Mittelwertdifferenz aus. Die Standardabweichung hingegen verändert sich nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung im Vergleich zur Referenzgenmethode nicht stärker, weil in beiden Fällen eine Division zweier fehlerbehafteter Größen durchgeführt wird. Somit ist die Auswirkung auf die Mittelwertdifferenz der bedeutendste Unterschied dieser beiden Methoden.

Die gegenseitige Verstärkung der Mittelwertdifferenz führt dazu, dass kleine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden können. Dieser Zugewinn an Sensitivität geht zu Lasten der Spezifität, weil auf diese Weise gleichermaßen nicht relevante Unterschiede verstärkt und möglicherweise signifikant werden. Da es sich hierbei um ein Pilotprojekt im Mausmodell handelt und sich potenzielle Biomarkerkandidaten im humanen Organismus erst bewähren müssen, verringert sich durch diese Methode die Gefahr einen Fehler der zweiten Art (falsch-negative Entscheidung) zu begehen. Für die Biomarkersuche war dieses Verfahren mit höherer Sensitivität erforderlich, da sich dadurch eine geeignete Anzahl von 19 aus 15.400 möglichen microRNA-Quotienten als potenzielle Biomarker für den humanen Organismus entwickeln ließen.

5.3 Extrazellulär zirkulierende microRNAs

5.3.1 Herkunft der microRNAs

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals¹ die microRNA-Expression im Plasma/Serum für Asthma in zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht. Die Erkenntnis über das Vorkommen und die Funktion extrazellulärer, in Körperflüssigkeiten nachweisbarer microRNAs deckte ein neues Interessensgebiet auf [131, 138, 139, 140].

Zu berücksichtigen ist, dass extrazelluläre, im peripheren Blut vorkommende microRNA am stärksten durch ebenfalls dort lokalisierte Zellen beeinflusst wird. Deren Unterschiedlichkeit zeigte das Differenzialblutbild. Wie bereits für ein OVA-Modell einer anderen Studie beschrieben, waren neutrophile Granulozyten im Blut Asthma-erkrankter Tiere signifikant erhöht [168].

Neben ungezielter Freisetzung durch Apoptose oder Nekrose gelangen microRNAs von vitalen Zellen in Form von Mikrovesikeln, Exosomen oder Protein-gekoppelt in den Extrazellulärraum. Dort dienen sie der interzellulären Kommunikation, indem sie von anderen Zellen aufgenommen werden und dort die Translation beeinflussen.

Ein großer Kritikpunkt der vorliegenden Arbeit ist, dass nicht zweifelsfrei zwischen ungezielter und gezielter Freisetzung der microRNAs unterschieden werden kann. Anhand der angewandten Ausschlusskriterien zum Vermeiden einer hämolysenbedingten Kontamination ließ sich lediglich eine Verzerrung durch erythrozytogene microRNA reduzieren. Der Einfluss von MicroRNA aus anderen eventuell bei der Blutentnahme zerstörten Zellen konnte nicht eingeschätzt werden. Um spezifischer jene microRNA zu erhalten, die bei Krankheit verändert sind, könnte man vor der RNA-Extraktion Exosomen isolieren. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit vorrangig um ein Pilotprojekt handelt, wurde auf diese aufwändigere Methode verzichtet.

5.3.2 Interzelluläre Betrachtungsweise

Bisher fokussierten sich Fragestellungen zur microRNA-Expression bei Asthma auf intrazelluläre Expressionsmuster. Untersucht wurden Lungengewebe [169], kultivierte bronchiale Epithelzellen [120], Vollblut [170] oder zirkulierende Lymphozyten [149]. Änderungen der microRNA-Expression können eindeutig einer Zellpopulation zugeordnet werden. Daher lässt sich gezielter über mögliche Auswirkungen und therapeutische Optionen spekulieren. Auch

¹Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine Studien bekannt, die microRNAs im Plasma oder Serum bei Asthma untersuchten. Die Pubmed-Suche verschiedener Kombinationen der Schlagwörter *asthma, blood, serum, plasma, microrna, biomarker* blieb erfolglos. Stand: Juli 2014.

sind intrazelluläre microRNAs um ein vielfaches höher exprimiert als extrazelluläre, was deren Aufbereitung und Analyse vereinfacht.

Durch die Untersuchung extrazellulärer microRNAs im Plasma oder Serum wird von der zellulären auf eine interzelluläre Betrachtungsweise gewechselt. Resultate können deshalb konträr zu zellulären Studien ausfallen. So fand sich beispielsweise eine Expressionsreduktion von miR-29a in stimulierten Brochialepithelzellen [120], während im murinen Plasma und Serum von Asthmaticern eine erhöhte Expression von miR-29a nachweisbar war. Auch microRNA-Profile von Lungengewebe zeigten teilweise konträre Ergebnisse. MiR-21, miR-27a und miR-29c waren in die entgegengesetzte Richtung reguliert als in der vorliegenden Arbeit. MiR-15a, miR-25 und miR-320a wiesen dafür eine Regulation in die gleiche Richtung auf [169].

5.4 Mögliche Effekte der microRNAs

5.4.1 T_H2-Polarisation

Im durchgeführten OVA- und HDM-Modell konnte eine erhöhte Expression von miR-21 im Plasma bzw. Serum der Asthma-erkrankten Tiere nachgewiesen werden. Dies deckte sich mit der Hochregulation dieser microRNA im Lungenhomogenat der HDM-Tiere². MiR-21 spielt eine zentrale Rolle im Einstellen der T_H1- oder T_H2-Immunantwort auf ein Antigen. Verantwortlich dafür ist eine Verringerung der Expression von IL-12 durch die Bindung von miR-21 an IL-12p35, welches durch den IL-12 / Interferon γ -Pathway die Expression von Interferon γ negativ beeinflusst und sich daher T-Zellen vornehmlich zu T_H2-Zellen differenzieren [117].

Die Costimulation dendritischer Zellen mit Muramyl Dipeptid (MDP) und dem synthetischen Lipoprotein Pam3CSK4 führt zu einer erhöhten Expression von *miR-29a-3p* und *miR-29c-3p* [171]. MDP aktiviert das nucleotide binding oligomerization domain containing protein 2 (NOD2), Pam3CSK4 den Toll-like-Rezeptor (TLR)2. Beides sind Sensoren des angeborenen Immunsystems und erkennen pathogene molekulare Strukturen. Es wurde gezeigt, dass TLR2 im OVA- und HDM-Modell eine wichtige Funktion hat. Im OVA-Modell weisen TLR2(-/-) Mäuse im Vergleich zu TLR2(+/+) Tieren signifikant weniger Atemwegshyperreagibilität, Atemwegsentszündung und pulmonale T_H2-Zytokinspiegel auf [172]. Auch das im HDM-Modell verwendete HDM-Extrakt enthält Agonisten für TLR2 [173]. Eine Aktivierung des NOD2 liegt nahe, denn eine intranasale Applikation von NOD2-Liganden führt zu einer allergischen Entzündung mit T_H2-Zytokinen [174]. Außerdem konnte eine Assoziation von NOD2 Genpolymorphismen zum Auftreten von Atopie festgestellt werden [175, 176].

²Ein bisher nicht veröffentlichtes Screening des Lungenhomogenats wurde von Sabine Bartel, einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

Die komplette Familie der miR-29s, miR-29a / b / c, führt zur Herabregulation von IL-12p40 und IL-23p19, jedoch nicht von IL-12p35 [171]. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das durch zwei unterschiedliche Gene, IL-12p35 und IL-12p40, kodiert wird. Über den IL-12 / Interferon γ Pathway führt es zu einer vermehrten Expression von Interferon γ , einem T_H1-Zytokin [177]. Die Blockade von IL-12p40 durch miR-29 könnte synergistisch zu der bereits gezeigten Funktion von miR-21 wirken.

Auch IL-23 ist ein Heterodimer. Es teilt sich eine Untereinheit mit IL-12, IL-12p40. Dieses und IL-23p19 bilden gemeinsam IL-23. Beide Einheiten werden durch miR-29a / b / c indirekt reprimiert [171]. Allerdings werden in humanem allergischem Asthma erhöhte Level von IL-23 im Serum festgestellt. IL-23 korreliert mit dem Asthmaschweregrad und der Atemwegsobstruktion [178]. Auch im murinen OVA-Modell wurden erhöhte Werte von IL-23 nachgewiesen. IL-23 ist ein bedeutender Faktor in der Regulation Antigen-induzierter Atemwegsentzündungen, der Rekrutierung von Eosinophilen und Neutrophilen und der T_H2-Zytokinproduktion [179]. Das Ausschalten von IL-23 auf mRNA-Ebene durch inhibitorische RNA inhibiert effektiv die asthmatische Entzündung im OVA-Modell [180].

MiR-27a fand sich in der Asthmagruppe hochreguliert. Grund dafür könnte der Transforming Growth Factor β 1 sein. Dieser ist ein Schlüsselmediator der Fibrose [181] und ist in der BAL im OVA-Modell erhöht nachweisbar [182]. Er bedingt in dendritischen Zellen eine Hochregulation von miR-27a, welches dort wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine beeinflusst. Dadurch behindert miR-27a die Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen [183] und begünstigt eine T_H2-Polarisation. Dem gegenüber steht das Expressionsverhalten von miR-27a in Makrophagen. Dort ist sie nach Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) herunterreguliert [184].

Die Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1 (MAPK1) ist ein wichtiges Protein in der intrazellulären Signalgebung. Sie phosphoryliert unter anderem verschiedene genregulatorische Proteine, wodurch diese aktiviert oder inhibiert werden. Einen signifikant höheren Anteil an aktivierter, in diesem Fall phosphorylierter MAPK1, wurde im Atemwegsepithel und in den Bronchialmuskelzellen in Biopsien von Asthmapatienten nachgewiesen. Eine selektive Inhibition von MAPK1 in diesen Zellen führte zu einer niedrigeren Sekretion von Eotaxin-3, einem Chemokin für eosinophile Granulozyten [185]. MAPK1 kann über einen positiven und einen doppelt negativen Feedbackmechanismus seine Aktivierung selbst aufrechterhalten [186]. Deshalb zeigten einzelne Stimulationen von Bronchialepithelzellen mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren (IL-4, IL-6, IL-13, Eotaxin und epidermale Wachstumsfaktor) eine rapide Aktivierung von MAPK1, die innerhalb von 24h wieder auf dem Ausgangswert lag. Eine mehrfache Stimulation an 3 aufeinanderfolgenden Tagen führte jedoch zu einer anhaltenden Aktivierung von MAPK1 [187].

Auch in T-Zellen kommt der MAPK1 eine wichtige Bedeutung zu. Die Expression sowohl der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-5 als auch des Allergen-spezifischen IgEs war in MAPK1(-/-)-Mäusen erniedrigt [188]. Eine erfolgreiche T_H2-Differenzierung hängt von der T-Zell-Rezeptor vermittelten Aktivierung des Signalwegs Ras/MAPK ab. Dieser verändert direkt die Funktion des IL-4-Rezeptors, sodass er STAT6 aktivieren kann [189].

Bei Patienten mit Mysathenia gravis, einer Autoimmunerkrankung, konnte gezeigt werden, dass *miR-320a* proinflammatorische Zytokine moduliert, indem es MAPK1 direkt posttranskriptionell inhibiert [190]. Diese verringerte direkte Inhibition der Expression von MAPK1 könnte somit auch zur Pathogenese von Asthma beitragen. Im HDM-Modell zeigte sich ebenfalls eine erniedrigte Expression von miR-320a im Plasma. Demgegenüber war ihre Expression in der OVA Asthmagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, im Vergleich zur Atopiegruppe jedoch erniedrigt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass erst durch inhalative Sensibilisierung miR-320a herunterreguliert wird, wobei dann MAPK1 vermehrt exprimiert werden kann.

5.4.2 Monozytendifferenzierung

Im Zuge der chronischen pulmonalen Entzündung findet ein Gewebeumbau statt, das airway remodelling. Dabei verändern sich glatte Muskelzellen der Atemwege reversibel von einem kontraktilen in einen unreif proliferativen und sekretorischen Phänotyp [191]. Dieser ist in der Lage, Immunmodulatoren wie T_H2-Zytokine zu sezernieren [192]. In einer experimentellen Studie wurden Bronchialmuskelzellen proinflammatorisch stimuliert. Die Expression von *miR-25-3p* und *miR-140-3p* erniedrigte sich dadurch signifikant. Die weitere Untersuchung potenzieller Interaktionen von miR-25 zeigte, dass sie den Krüppel-like factor 4 (KLF4) inhibiert [193]. KLF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der essentiell an der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beteiligt ist [194]. Auch im Plasma der Asthmatiere zeigte sich eine erniedrigte Expression von miR-140-3p und miR-25-3p. Eine interzelluläre Kommunikation der Bronchialmuskulatur mit Monozyten über microRNA-Exosomen ist möglich.

5.4.3 Atemwegshyperreagibilität

CD38 wird auf der Oberfläche von Bronchialmuskelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für deren Kontraktilität. Es katalysiert die Synthese und den Abbau zyklischer ADP-Ribose (cADPR). cADPR löst die Freisetzung von Ca²⁺ in Bronchialmuskelzellen über den Ryanodin Rezeptor aus und trägt damit zur Atemwegshyperreagibilität bei [195]. Die 3'-UTR von CD38 enthält eine Zielstruktur für miR-140-3p. Es konnte gezeigt werden, dass miR-140-3p die Expression von CD38 inhibiert [196]. MiR-140-3p war im HDM-Modell erniedrigt,

während es im OVA-Modell verglichen zur Kontrollgruppe erhöht war. Jedoch zeigte sie im Vergleich zur Atopiegruppe wiederum eine schwächere Expression (siehe Abbildung 4.21). Die Expressionsreduktion von miR-140-3p scheint demnach durch inhalative Allergene und der darauf folgenden Entzündungsreaktion getriggert zu sein.

5.4.4 Antiinflammatorische Effekte

Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK) wie IRAK4 sind wichtige Mediatoren der Signaltransduktion der TLRs und der IL-1-Rezeptorfamilie³. Über diese Kaskade wird der nukleare Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B) aktiviert, welcher die Expression proinflammatorischer Gene reguliert. Dazu gehören beispielsweise GM-CSF [197], NO-Synthase [198], Tumor Nekrose Faktor (TNF) α [199] und IL-6 [200]. *MiR-93* inhibiert die Expression von IRAK4 durch direkte Bindung an dessen 3'-UTR, wodurch nachweislich die Aktivierung NF- κ Bs und damit die Bildung proinflammatorischer Moleküle verringert wird. Mit LPS stimulierte Makrophagen hatten eine signifikant erniedrigte Expression von miR-93 als nicht stimulierte und wirkten damit als negativer Regulator einer Entzündung [201]. Auch die im OVA- und HDM-Modell gemessene Expression der zirkulierenden miR-93 zeigte sich in der Asthmagruppe erniedrigt.

Die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) dephosphoryliert das durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) gebildete Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) und deaktiviert damit ein wichtiges Molekül intrazellulärer Signaltransduktion [202]. In einem OVA-Asthmamodell konnte beobachtet werden, dass die PTEN Expression und Aktivität bei Asthma reduziert sind. Außerdem zeigte sich ein Rückgang erhöhter Zytokinspiegel in der BAL der Asthmatiere, nachdem intratracheal PI3K-Inhibitoren oder Adenoviren mit PTEN cDNA appliziert wurden [203]. PTEN wird durch miR-425-5p reprimiert [204]. Jedoch war die miR-425-5p sowohl im HDM- als auch im OVA-Modell erniedrigt. Eine entscheidende Beteiligung an der Repression von PTEN liegt demnach zumindest anhand der microRNA-Plasma-Spiegel nicht nahe. Eine Expressionsminderung von miR-425-5p und die eventuell folgende Erhöhung der PTEN-Expression lässt diese als antiinflammatorisch einstufen.

5.4.5 Proinflammatorische Effekte

Sowohl im Serum [205] als auch in der BAL [206] waren bei einer aktiven asthmatischen Erkrankung erhöhte Spiegel von TNF α nachweisbar. Dieses proinflammatorische Zytokin dient unter anderem als chemischer Lockstoff für neutrophile und eosinophile Granulozyten [207] und aktiviert T-Zellen [208]. Seine aktive Beteiligung an der Pathogenese von Asthma

³vgl. www.omim.org, Eintrag 606883

verdeutlichte dessen gezieltes Ausschalten. Ein gegen TNF α gerichteter monoklonaler Antikörper, Adalimumab, verringerte im Mausmodell signifikant histologische pulmonale Entzündungszeichen [209].

Die Expression von TNF α wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert, der wiederum durch TNF α aktiviert wird. Gleichzeitig induziert NF- κ B die Bildung von *miR-130a*, welche über eine Bindungsstelle in der 3'-UTR TNF α negativ reguliert. Damit unterliegt TNF α – zumindest in immortalisierten Tumorzellen – einer Feedbackhemmung, vermittelt durch miR-130a [210]. Die Expression von miR-130a war in den Asthmagruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt. Es lässt sich nur spekulieren, dass die microRNA-vermittelte Feedbackhemmung durch bisher unbekannte Mechanismen aufgehoben wurde, sodass TNF α stark erhöht exprimiert wird.

5.4.6 Reifung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

MiR-223-3p ist in den drei microRNA-Quotienten mit dem höchsten AUC-Wert enthalten und zeigt eine erhöhte Expression im Plasma Asthma-erkrankter Tiere. In anderen Studien konnte miR-223-3p mit entzündlichen Prozessen in der Lunge assoziiert werden. Eine durch LPS induzierte pulmonale Inflammation bedingte in den Stunden danach eine erhöhte Expression von miR-21, -25, -27b, -100, 140, -142-3p, -181c, 187, -194, -214, -223-3p und -224 im murinen Lungenparenchym. Besonders im Alveolar- und Bronchialepithel war eine verstärkte Expression von miR-223-3p nachweisbar [211]. Ebenso konnte nach Reizung humaner Atemwege mit Ozon miR-223-3p im Sputum erhöht detektiert werden [212].

MiR-223-3p ist in der Lunge an einer negativen Feedbackkontrolle der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beteiligt. Sie inhibiert direkt die Chemokine CXCL2, CCL3 und IL-6, die ihrerseits die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Lungenparenchym bedingen [213]. Eine erhöhte Expression von CCL3 konnte in muriner BAL nach einer HDM Challenge nachgewiesen werden [34].

Neben der Regulation der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten ist miR-223-3p für die granulozytäre Reifung im Knochenmark von Bedeutung [214] und ist deshalb überwiegend in Zellen der myeloischen Zellreihe zu finden [213].

Im Differentialblutbild Asthma-erkrankter Tiere war ein erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten zu beobachten, was auf eine gesteigerte Granulopoese schließen lässt. Auch die Zelldifferenzierung der BAL zeigte ein vermehrtes Auftreten sowohl eosinophiler als auch neutrophiler Granulozyten. Die gefundene erhöhte Expression von miR-223-3p lässt sich somit durch die pulmonale Entzündung und die dadurch gesteigerte Granulopoese erklären.

5.4.7 Antifibrotische Effekte

Das bone morphogenetic protein 7 (BMP7) wird als Gegenspieler des Transforming Growth Faktor β angesehen und wirkt antifibrotisch. BMP-7 mRNA wurde im Lungengewebe eines akuten OVA-Modells (2 inhalative Challenges nach intraperitonealer Sensibilisierung) erhöht nachgewiesen, während es beim chronischen OVA-Modell (6 inhalative Challenges nach intraperitonealer Sensibilisierung) normal war [182]. *MiR-342-3p* supprimiert die Genexpression von BMP7 durch Bindung an dessen 3'-UTR-Region [215]. Im durchgeführten chronischen HDM-Modell war die Expression von miR-342-3p im Vergleich zur Kontrollgruppe minimal erhöht (1,04), wohingegen es im akuten OVA-Modell stark erhöht (4,08) war. Die Expression zirkulierender miR-342-3p könnte daher mit der Expression von BMP7 korrelieren. Möglich wäre eine gegenseitige Beeinflussung ihrer Expression. Ein erhöhtes BMP7 führt zu einer Zunahme von miR-342-3p, die wiederum BMP7 hemmt.

5.4.8 VEGF

Im Lungenhomogenat asthmatischer Mäuse liegen erhöhte VEGF-Spiegel vor [129]. *MiR-15a* inhibiert direkt die Translation von VEGF [216]. Pädiatrische Patienten mit allergischem Asthma zeigten in peripheren CD4⁺ T-Zellen eine erniedrigte Expression von miR-15a, was mit einer erhöhten Expression von VEGF verbunden war [217]. In diesen Kontext passt die ebenfalls erniedrigte Expression von miR-15a im Plasma/Serum der Asthmatiere.

5.5 Übertragung auf humane Proben

Die Etablierung einer microRNA-basierten Biomarkerkombination für murine Asthmodelle verbleibt ohne klinische Relevanz solange keine Übertragung auf humane Proben versucht wird.

Die direkte Untersuchung humaner Blutproben hätte allerdings eine erheblich größere Anzahl an Stichproben gebraucht, da menschliche Individuen einer weit größeren genetischen und umgebungsbedingten Variabilität unterliegen als Inzuchtmäuse. Hinzu kommt die Interferenz mit anderen akuten oder chronischen Pathologien, die ebenfalls Einfluss auf extrazellulär zirkulierende microRNAs haben. Deshalb wurden Mausmodelle zur Identifikation regulierter microRNA-Expressionen bei Asthma verwendet. Weil das angestrebte Ziel eine Biomarkerkombination für humanes Asthma sein soll, wurden die murinen Proben mit PCR Focus Panels mit Primern für humane microRNA-Sequenzen analysiert, was durch eine starke evolutionäre Konservierung der microRNAs möglich ist [218]. Hier ließen sich bereits im Screening bei einer Gruppengröße von 6 signifikante Unterschiede ermitteln.

Die Übertragung auf humane Proben ist nicht Teil dieser Dissertationsschrift. Ein abschließender Vorschlag für eine mögliche Biomarkersignatur für humanes Asthma ist nicht möglich. Jedoch deckt die Arbeit potenzielle Kandidaten auf, die sich im Mausmodell bestätigten und im nächsten Schritt im humanen Organismus untersucht werden sollten.

Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren haben sich extrazellulär zirkulierende microRNAs (miR) zunehmend als additives Diagnoseinstrument etabliert. Aufgrund ihrer hohen Stabilität und ihrer einfachen Nachweisbarkeit in Körperflüssigkeiten eignen sich microRNAs ideal als wenig-invasive Biomarker. Insbesondere in der Asthmadiagnostik spielt die Mitarbeit des Patienten bei der Lungenfunktionsanalyse eine entscheidende Rolle. Deshalb wäre bei der Diagnosestellung kooperationsunfähiger Patienten ein objektiver Test richtungsweisend.

Ein murines Asthmodell, verursacht durch intranasale Applikation von Hausstaubmilbenextrakt (HDM), wurde etabliert. Die phänotypische Charakterisierung erfolgte durch Beurteilung der Lungenfunktion, der eosinophilen Entzündung in bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Lungenhistologie. Zum Ausschluss der Kontaminierung mit zellulärer microRNA wurde retrobulbär gewonnenes Blutplasma photospektrometrisch auf Hämolyse untersucht. Aus nicht-hämolytierten Proben wurde die RNA isoliert und deren Qualität überprüft. Von den hochwertigsten Proben der Versuchs- und Kontrollgruppe (n = 6 / Gruppe) wurde durch Berechnung von miR-Expressions-Quotienten die relative Expression von 175 verschiedenen miRs untersucht.

Die Screening-Ergebnisse wurden mit relativen microRNA-Expressionen aus Serumproben eines charakterisierten Ovalbumin-Modells (OVA) verglichen. Das OVA-Modell enthielt zusätzlich eine Atopiegruppe mit intraperitoneal sensibilisierten Tieren, die als weitere Kontrolle fungierte. Gleichsinnige Veränderungen der miR-Expression in beiden Modellen wurden in einer erweiterten Gruppe (n = 10 / Gruppe) validiert. Validierte miRs wurden mittels einer multiplen linearen Regression zu einer Biomarkerkombination zusammengefasst, die an Plasmaproben eines laborfremden HDM-Modells überprüft wurde.

In der Lungenfunktion zeigten die Asthma-erkrankten Tiere eine signifikant erhöhte Atemwegshyperreagibilität nach Methacholingabe ($p < 0,0001$). Eosinophile, Neutrophile und Lymphozyten der BAL waren signifikant vermehrt zu finden (jeweils $p < 0,0001$). Histologisch ließen sich ein erhöhter Becherzellanteil ($37,0 \pm 13,2\%$) und Merkmale pulmonaler Inflammation nachweisen.

75 miR-Quotienten waren im Screening in beiden Modellen signifikant ($p < 0,05$) gegenüber Kontrolltieren verändert. 18 davon grenzten zusätzlich von einer Atopie ab und wur-

den aus 17 verschiedenen miRs gebildet. Nach Validierung der 17 miRs verblieben 10 miR-Quotienten für die Bildung einer möglichen Biomarkerkombination. Die Verknüpfung von 6 Quotienten mit der größten Area under the Curve (AUC) erbrachte eine Sensitivität von 87,5% bei einer Spezifität von 88,5% (AUC = 90,4% (80,9% - 99,9%)). 6 von 7 laborfremden Plasmaproben wurden mit der Biomarkerkombination richtig getestet.

Unabhängig von der Ätiologie zeigten sich in allergischen murinen Asthmodellen Veränderungen identischer extrazellulärer miR, die sich zu einer Biomarkerkombination verknüpfen ließen. Die darin enthaltenen miRs können mit Asthma oder Entzündung in Verbindung gebracht werden und stellen potenzielle Kandidaten für die Validierung als Biomarker bei humanem Asthma dar.

Anhang

Tabelle .2 – C_t-Werte der HDM-Tiere, gerundet auf eine Nachkommastelle.

miR-Name	HDM-Asthma						HDM-Kontrolle					
	13	14	15	17	23	24	31	32	33	34	35	36
hsa-miR-20a	28,0	28,4	28,5	28,6	28,5	27,4	28,8	28,1	27,5	27,3	27,8	28,5
hsa-miR-19b	27,3	27,3	27,5	27,0	27,1	26,0	27,3	27,3	26,6	26,6	26,8	27,5
hsa-miR-126	27,9	28,4	28,5	29,2	28,6	27,0	29,5	28,5	27,8	27,6	27,6	28,7
hsa-miR-24	26,6	27,3	27,5	27,3	27,3	26,0	27,2	26,9	26,8	26,6	26,7	27,5
hsa-miR-223	26,7	27,1	27,3	26,6	26,8	26,3	27,7	27,5	26,7	26,8	27,1	27,5
hsa-miR-15a	27,9	28,1	28,0	28,1	28,0	26,9	28,2	27,4	27,3	27,1	27,7	28,3
hsa-miR-21	27,1	27,4	27,6	27,5	27,2	26,1	27,7	27,3	27,1	27,1	27,0	27,8
hsa-miR-150	26,8	27,6	27,6	27,8	27,1	26,6	27,6	27,9	26,6	27,0	27,3	27,6
hsa-miR-23a	27,2	27,8	27,7	27,7	27,6	26,5	28,0	27,3	26,9	27,1	27,0	27,8
hsa-miR-320a	29,5	30,6	30,6	30,0	30,0	29,2	30,5	30,0	28,8	29,3	29,5	29,8
hsa-miR-451	23,1	22,9	22,8	23,6	23,0	21,6	23,8	22,5	21,8	22,0	22,0	23,0
hsa-miR-142-3p	30,6	30,6	30,5	30,0	29,0	29,7	30,5	29,5	29,8	30,2	30,5	32,3
hsa-miR-486-5p	26,7	28,0	28,2	28,1	27,5	26,7	27,0	28,0	26,8	26,4	27,6	27,5
hsa-let-7g	29,2	29,5	29,2	30,7	29,9	28,3	30,7	29,5	28,9	28,6	29,2	29,5
hsa-miR-27a	28,5	28,7	29,0	29,1	28,8	27,3	29,5	29,0	28,6	28,6	28,2	29,3
hsa-miR-15b	28,7	28,8	29,5	28,8	28,6	27,9	29,1	28,7	28,1	27,8	28,1	28,8
hsa-miR-101	30,2	30,2	30,3	30,5	30,7	28,9	30,9	30,5	30,0	29,5	29,9	30,5
hsa-miR-26a	32,0	31,5	31,9	32,9	31,5	30,7	33,4	31,9	31,5	31,4	31,2	32,9
hsa-miR-221	33,1	32,0	31,6	32,7	32,8	29,9	33,7	32,7	31,3	31,2	31,2	32,0
hsa-miR-16	24,7	25,1	25,5	25,6	25,1	24,5	25,7	25,1	24,6	24,4	24,7	25,5
hsa-miR-185	32,5	32,7	32,8	32,0	33,1	32,2	32,8	32,1	32,5	31,7	32,3	33,1
hsa-miR-107	33,1	32,9	32,5	32,7	33,0	31,9	33,7	32,7	32,1	32,0	31,6	33,1
hsa-miR-222	30,8	30,5	30,3	30,0	30,5	29,1	30,6	30,2	29,6	29,7	30,2	30,6
hsa-miR-342-3p	29,2	29,7	29,9	29,7	29,1	29,0	29,8	29,2	29,1	29,1	29,2	29,8
hsa-miR-23b	30,0	30,0	30,1	30,1	30,0	28,8	30,7	29,7	29,5	29,6	29,1	30,3
hsa-miR-423-3p	31,7	32,1	31,6	32,2	32,7	31,1	33,0	31,9	31,5	31,7	31,7	31,8
hsa-miR-30b	28,5	28,7	28,9	29,9	28,7	27,5	29,2	28,0	28,1	27,9	28,1	28,7
hsa-miR-103	31,9	31,5	30,8	31,5	31,6	30,8	32,8	31,1	30,6	30,6	30,9	32,2
hsa-miR-144	26,1	26,1	26,3	26,1	26,2	25,3	26,5	26,3	25,6	25,5	25,9	26,6
hsa-miR-30c	28,8	29,0	28,8	30,0	29,5	28,0	30,2	28,4	28,1	28,6	28,3	28,9
hsa-miR-145	28,2	28,2	28,3	29,1	28,5	26,7	28,7	27,2	28,2	28,6	27,6	29,0
hsa-miR-26b	32,1	32,1	32,1	33,9	32,5	31,6	34,5	32,8	31,9	32,2	32,1	32,8
hsa-miR-192	28,7	29,3	29,0	29,2	29,0	28,0	29,1	28,3	28,6	28,8	28,6	28,9
hsa-miR-27b	29,4	29,6	30,2	30,1	29,8	28,0	30,8	29,9	29,6	29,3	29,2	30,2
hsa-miR-186	32,0	32,2	31,7	33,2	32,6	30,8	33,1	31,8	30,8	31,0	31,3	32,1
hsa-let-7i	32,2	31,9	31,9	32,6	32,3	31,2	32,2	31,7	31,2	31,1	32,4	32,4
hsa-miR-425	31,0	31,4	31,2	31,7	31,1	30,0	31,1	30,7	30,1	30,1	30,3	31,5

miR-Name	HDM-Asthma						HDM-Kontrolle					
	13	14	15	17	23	24	31	32	33	34	35	36
hsa-miR-139-5p	31,3	32,5	32,7	32,6	32,5	31,2	32,9	32,5	31,4	32,2	32,1	33,0
hsa-miR-17	31,8	31,9	32,6	33,2	32,1	31,4	32,5	31,7	31,8	31,3	31,9	31,9
hsa-miR-143	29,7	29,2	29,1	30,8	29,6	27,6	30,2	29,1	30,0	29,8	28,8	30,4
hsa-miR-199a-3p	31,7	31,8	32,3	33,0	32,2	30,6	33,1	32,5	30,7	31,5	31,5	32,5
hsa-miR-29c	30,8	30,2	30,6	30,9	30,6	28,9	31,4	30,2	30,5	30,3	30,1	31,3
hsa-miR-146a	33,7	33,8	33,5	33,9	33,5	32,6	34,5	34,7	33,1	33,3	33,0	34,2
hsa-miR-29a	30,0	29,5	30,0	29,6	29,7	28,3	30,7	29,4	29,7	29,4	29,2	30,6
hsa-miR-99a	30,3	30,7	30,8	31,7	31,3	29,0	32,1	30,6	30,6	30,1	29,8	31,7
hsa-miR-152	31,3	31,9	32,2	32,3	32,7	30,8	32,8	31,8	31,2	31,7	31,7	32,5
hsa-miR-148a	30,9	30,3	30,6	31,5	31,0	29,0	31,9	31,5	30,7	30,3	30,0	30,5
hsa-miR-423-5p	32,1	32,8	32,6	32,9	32,5	31,8	33,2	32,2	32,2	31,6	31,9	32,6
hsa-miR-19a	31,7	32,1	32,7	32,7	32,2	30,7	32,0	31,3	31,7	32,1	31,6	32,5
hsa-miR-30d	32,8	33,2	33,1	34,5	33,2	31,6	33,8	32,2	32,8	32,9	32,5	32,5
hsa-miR-22	33,3	32,0	31,8	32,2	32,5	31,0	34,1	32,2	32,5	32,5	32,0	33,7
hsa-miR-125b	28,9	28,8	29,0	30,9	30,0	27,5	30,8	29,6	28,6	28,3	28,1	29,7
hsa-miR-378	31,1	31,2	31,5	31,6	31,6	29,9	31,9	30,3	31,1	30,8	31,2	31,9
hsa-miR-125a-5p	30,8	31,5	31,3	32,3	32,0	30,1	32,5	31,2	30,8	30,7	30,7	31,6
hsa-miR-148b	31,6	31,7	31,5	31,2	31,4	30,7	31,7	30,6	30,9	30,5	30,8	31,3
hsa-miR-484	29,6	30,2	29,9	30,1	29,7	29,1	30,3	29,4	29,2	29,1	29,7	29,9
hsa-miR-25	29,0	29,6	29,7	29,6	29,6	28,5	29,7	29,3	28,6	28,5	29,0	29,6
hsa-miR-99b	32,0	33,1	32,3	32,5	32,4	31,1	32,4	32,2	32,0	31,8	31,8	32,3
hsa-miR-93	27,2	27,8	27,7	27,9	27,8	27,0	28,0	27,6	26,8	26,7	27,2	27,6
hsa-miR-18a	33,7	34,0	34,0	34,1	33,7	32,6	34,3	33,5	33,3	32,8	33,1	33,6
hsa-let-7d*	30,9	31,3	31,1	30,9	31,0	30,1	32,2	30,8	30,6	30,8	30,6	31,3
hsa-let-7b	30,2	30,2	30,2	31,8	31,3	29,3	32,4	31,0	29,7	29,7	30,2	30,5
hsa-miR-191	29,7	30,5	30,3	30,7	30,3	29,8	30,2	29,8	30,2	29,2	29,7	30,9
hsa-miR-375	31,7	32,3	32,9	32,7	32,2	31,2	31,8	32,5	31,8	32,1	32,5	32,2
hsa-miR-140-3p	28,0	28,3	28,2	28,2	27,9	27,3	28,6	27,4	27,2	27,5	27,6	28,4
hsa-miR-130a	34,2	34,0	33,2	33,3	33,8	32,4	33,4	32,8	32,9	32,9	32,6	34,0
hsa-miR-195	30,6	31,2	32,1	32,9	31,5	30,7	32,6	32,5	30,3	31,3	31,0	32,2
hsa-miR-365	31,2	32,0	31,3	33,2	32,3	30,6	32,5	31,7	30,9	31,1	31,7	32,5
hsa-miR-532-3p	33,0	33,3	33,7	34,5	32,8	33,0	34,8	32,5	33,0	33,9	33,0	33,5
hsa-miR-142-5p	32,2	31,7	31,8	31,6	31,7	31,6	32,6	31,2	31,2	31,7	31,6	32,7
hsa-miR-210	32,8	32,6	32,8	32,2	33,2	31,6	32,7	32,0	31,7	32,3	32,2	32,8
hsa-miR-30e	32,7	32,7	32,8	32,5	33,9	32,3	33,5	32,0	32,6	32,7	32,7	33,3
hsa-miR-140-5p	32,2	33,6	32,9	33,4	32,5	31,9	32,8	31,6	31,6	31,6	32,0	32,6
hsa-miR-328	30,1	29,8	29,9	29,8	30,0	29,1	30,0	28,6	28,9	28,8	29,2	30,0
hsa-miR-451	23,3	22,8	22,8	23,5	23,5	22,0	23,9	21,9	22,0	22,1	22,0	23,0
hsa-miR-205	28,8	28,5	28,2	28,8	29,8	26,9	30,2	29,1	28,8	28,3	27,6	28,7
hsa-miR-16	25,0	24,9	25,3	25,4	25,7	24,7	25,7	24,2	24,5	24,6	24,7	25,2
hsa-miR-30a	33,0	32,2	32,6	32,9	33,8	31,8	33,8	31,6	32,2	33,0	31,9	33,6
hsa-miR-29b	32,4	32,1	32,0	32,2	32,3	30,8	32,8	31,1	31,8	31,9	31,4	33,2
hsa-miR-15b*	33,3	33,5	33,8	33,3	34,7	33,1	34,4	32,5	32,8	33,1	33,7	34,0
hsa-miR-122	31,6	31,7	30,6	31,5	32,2	30,5	32,2	30,7	30,5	32,2	31,2	31,1
hsa-miR-301a	32,8	32,3	32,8	33,0	33,7	32,2	32,8	31,5	31,7	32,2	31,7	33,5
hsa-miR-128	33,8	33,8	32,9	32,7	33,8	33,6	33,6	32,1	33,3	32,2	31,8	33,9
hsa-miR-32	34,6	33,6	32,6	32,9	33,6	31,9	33,5	34,7	32,8	32,9	32,7	33,8
hsa-miR-425	30,9	31,7	31,6	33,2	31,5	30,9	31,6	30,1	30,1	30,6	30,6	31,2
hsa-miR-194	34,1	33,8	33,8	34,3	34,5	33,4	34,2	33,2	33,2	33,2	33,6	33,6

miR-Name	HDM-Asthma						HDM-Kontrolle					
	13	14	15	17	23	24	31	32	33	34	35	36
hsa-miR-106b	32,3	31,6	31,9	32,3	32,7	31,6	32,8	31,2	31,0	31,2	31,5	32,2
hsa-miR-133a	30,9	29,2	32,1	33,2	31,2	27,9	32,5	26,8	31,6	30,8	30,0	31,6
hsa-miR-423-5p	33,6	32,5	33,0	32,9	33,2	33,3	33,5	31,9	32,3	32,6	32,8	32,6
hsa-miR-1	31,2	29,6	32,6	34,8	32,2	29,0	34,0	28,9	32,3	31,3	30,7	32,3
hsa-miR-93	27,6	27,8	27,8	27,7	27,9	27,0	27,9	26,6	26,8	26,7	27,2	27,6
hsa-miR-574-3p	30,3	30,5	30,5	30,7	30,7	30,3	29,9	29,4	30,3	30,0	29,9	31,2
hsa-miR-191	30,1	30,3	30,8	30,8	30,7	30,5	30,1	29,1	30,1	29,5	29,6	30,9
hsa-miR-133b	31,9	29,5	31,9	33,4	31,6	28,5	32,8	27,1	31,9	31,6	30,5	32,5
hsa-miR-200c	32,5	32,7	32,5	34,9	34,0	30,9	33,8	33,2	33,5	33,0	32,0	33,0

Tabelle .3 – C_t-Werte der OVA Asthma- und Kontrollgruppe, gerundet auf eine Nachkommastelle.

miR-Name	OVA-Asthma						OVA-Kontrolle					
	58	59	61	63	64	65	75	76	78	79	80	81
hsa-miR-20a	26,0	27,7	26,1	27,6	27,5	28,0	26,7	25,9	26,2	26,2	27,4	26,0
hsa-miR-19b	27,0	29,5	26,9	27,1	30,0	26,6	26,9	26,9	26,3	25,6	29,2	27,0
hsa-miR-126	28,1	29,5	27,5	29,5	28,3	28,9	30,4	28,8	29,6	29,8	30,2	29,1
hsa-miR-24	24,0	25,5	24,5	25,1	25,4	24,6	26,5	25,1	25,1	24,7	26,6	24,8
hsa-miR-223	25,9	27,3	25,2	26,5	26,1	26,4	27,3	25,6	26,3	26,4	27,3	26,7
hsa-miR-15a	25,3	26,9	25,5	26,4	26,7	26,5	26,4	25,2	26,1	25,6	26,7	25,8
hsa-miR-21	23,7	24,7	23,6	24,2		24,8	25,8	23,9	25,2	24,9	25,2	25,4
hsa-miR-150	24,8	26,3	25,5	26,7	25,9	27,1	26,9	24,4	25,7	26,4	26,0	25,9
hsa-miR-23a	24,4	25,7	24,7	25,1	25,3	25,0	25,7	24,6	25,0	24,8	25,5	25,2
hsa-miR-320a	25,7	27,6	26,1	26,8	27,1	26,7	27,3	26,9	27,1	26,5	28,0	26,6
hsa-miR-451	22,9	25,5	21,9	24,8	24,1	25,1	23,6	22,3	23,3	23,4	24,7	23,1
hsa-miR-142-3p	28,0	29,9	28,8	28,7	30,5	28,6	28,4	27,9	28,7	28,5	30,1	28,2
hsa-miR-486-5p	23,2	25,3	24,5	25,1	25,0	25,5	24,5	24,0	24,5	24,6	24,7	24,4
hsa-let-7g	29,7	31,7	28,9	31,0	31,3	30,9	30,4	29,3	29,6	29,9	31,2	29,5
hsa-miR-27a	26,6	28,7	26,5	27,5	28,2	26,8	29,6	28,0	28,5	28,1	29,9	27,7
hsa-miR-15b	27,7	29,2	28,3	28,3	29,3	29,0	28,8	27,3	28,4	28,6	28,9	28,0
hsa-miR-101	28,9	31,0	28,4	29,6	30,6	29,1	29,7	28,8	29,2	29,0	31,6	29,0
hsa-miR-26a	30,3	32,1	30,6	31,3	31,2	32,0	31,6	30,4	31,8	31,2	31,8	31,1
hsa-miR-221	29,9	31,7	29,4	31,6	30,9	30,8	33,6	30,8	31,2	30,8	32,7	31,4
hsa-miR-16	25,3	27,3	24,9	27,2	26,2	27,0	26,5	24,9	25,9	26,1	26,6	25,7
hsa-miR-185	28,9	31,3	29,1	30,2	31,2	30,2	29,6	28,5	29,2	28,1	31,5	29,2
hsa-miR-107	31,6	35,0	32,0	33,0	33,9	32,7	32,1	31,4	31,7	31,1		31,7
hsa-miR-222	28,3	31,0	29,5	29,9	30,3	28,5	30,2	29,5	28,3	27,9	31,0	29,0
hsa-miR-342-3p	25,5	26,6	25,6	25,7	26,0	26,0	28,2	27,1	28,0	27,9	28,7	28,0
hsa-miR-23b	27,6	28,8	27,7	28,3	28,7	28,2	29,1	27,7	28,0	28,0	28,6	28,1
hsa-miR-423-3p	29,2	30,8	29,2	29,7	30,5	29,5	30,2	28,9	29,0	28,5	31,6	29,4
hsa-miR-30b	27,9	30,1	27,6	28,9	29,9	29,1	28,6	27,6	27,9	27,9	30,1	28,5
hsa-let-7f	31,6	33,0	32,7	32,9	33,6	32,9	32,3	31,7	32,3	32,2	33,2	31,9
hsa-miR-103	30,9	33,3	31,8	32,6	33,7	31,9	31,3	30,5	30,3	30,8	31,7	30,1
hsa-miR-144	26,1	29,8	26,7	27,7	29,4	27,0	26,3	26,5	27,1	26,7	29,6	26,3
hsa-miR-30c	27,6	29,1	27,6	29,2	28,7	29,3	28,7	27,7	28,5	28,3	29,5	28,1
hsa-miR-145	27,9	29,1	26,7	29,8	29,3	27,5	27,7	27,9	27,1	27,2	29,4	26,5
hsa-miR-26b	32,8	34,5	32,5		33,3	34,4	33,1	32,2	32,8	32,7	33,7	32,6
hsa-miR-192	27,2	26,7	25,0	26,9	26,0	27,0	27,6	27,2	27,1	27,2	27,4	27,2

miR-Name	OVA-Asthma						OVA-Kontrolle					
	58	59	61	63	64	65	75	76	78	79	80	81
hsa-miR-27b	27,6	29,0	27,0	28,2	28,4	27,5	29,7	28,4	28,9	28,6	30,6	28,6
hsa-miR-186	32,2		31,6		33,2	34,6	32,8	31,8	33,3	32,7	34,3	33,2
hsa-let-7i	29,2	30,8	29,4	30,7	30,7	30,7	30,1	29,1	29,7	29,6	30,4	29,4
hsa-miR-425	28,1	29,6	28,1	29,1	28,9	29,4	30,0	27,8	28,7	28,3	29,4	29,0
hsa-miR-139-5p	30,1	31,6	29,9	31,6	30,5	31,1	31,4	30,3	31,0	31,5	31,0	30,2
hsa-miR-17	30,4	33,4	30,7	32,3	32,8	31,7	31,0	31,3	30,7	31,1	33,3	30,9
hsa-miR-143	30,9	32,4	29,5	33,2	32,8	30,2	31,4	30,8	29,7	30,3	32,5	28,6
hsa-miR-199a-3p	31,9	32,9	31,4	33,1	32,4	31,4	32,5	31,2	30,9	31,8	33,4	31,1
hsa-miR-29c	27,8	29,5	27,1	28,6	28,4	28,3	30,7	28,6	29,9	29,1	31,3	29,7
hsa-miR-146a	29,6	30,8	29,8	30,0	29,9	30,2	32,2	30,7	31,5	31,9	32,7	31,8
hsa-miR-29a	26,5	28,4	26,2	27,5	27,4	27,3	29,3	27,5	28,5	27,9	30,1	28,5
hsa-miR-99a	29,6	31,3	29,5	31,3	31,5	30,0	30,6	29,9	29,2	29,6	32,2	29,0
hsa-miR-152	30,2	30,8	29,3	30,8	31,0	30,9	31,3	29,7	30,4	30,2	31,6	29,9
hsa-miR-148a	29,0	30,1	27,4	30,3	29,5	30,1	30,6	29,3	29,5	29,7	31,3	29,8
hsa-miR-423-5p	29,4	31,4	30,0	30,4	31,8	30,2	30,2	29,7	29,8	29,6	31,6	30,0
hsa-miR-19a			32,5	32,4	34,0	31,3	31,2	32,1	31,3	30,7	34,6	32,2
hsa-miR-30d	30,2	32,2	30,1	32,5	30,9	32,8	32,4	32,4	32,6	31,8	33,4	31,5
hsa-miR-22	30,0	32,6	29,6	31,4	31,7	30,5	33,7	31,5	31,8	31,0	34,2	31,2
hsa-miR-125b	29,0	30,5	28,1	30,0	29,7	29,7	30,5	29,0	29,1	29,8	31,2	28,8
hsa-miR-378	28,6	31,0	28,5	29,1	30,7	28,5	28,9	28,8	28,8	28,4	31,4	28,8
hsa-miR-125a-5p	30,4	32,1	30,1	31,3	31,1	31,1	31,8	30,4	30,7	31,0	31,9	30,6
hsa-miR-148b	29,6	31,4	29,4	30,6	30,9	30,8	31,1	29,1	29,8	29,7	31,8	29,7
hsa-miR-484	26,9	29,4	27,6	28,1	29,1	27,5	27,9	28,0	27,4	27,1	29,9	27,9
hsa-miR-25	26,4	28,2	26,9	27,4	27,1	28,3	28,0	26,8	27,1	27,2	27,3	26,7
hsa-miR-99b	30,5	32,6	30,7	31,8	32,7	31,2	32,0	31,0	30,4	30,8	33,9	30,9
hsa-miR-93	25,7	27,9	26,1	27,3	27,6	27,2	26,4	26,2	26,0	26,4	27,6	25,8
hsa-miR-652	31,3	33,4	31,3	32,7	33,1	33,1	32,9	30,8	31,8	31,4	34,0	31,6
hsa-miR-151-5p	32,6		34,7	33,2	33,0	34,2	33,2	31,8	32,2	33,0	33,4	32,9
hsa-miR-18a	32,0		31,4	34,4	33,2	33,5	32,5	31,3	32,4	31,6	33,0	31,9
hsa-let-7d	33,1		34,9	33,8		33,7	33,0	32,8	33,3	33,5	34,4	32,3
hsa-let-7d*	28,2	29,4	27,9	28,9	28,6	29,1	29,5	28,4	28,7	28,8	29,6	28,9
hsa-let-7b	29,4	30,6	28,9	31,1	29,6	31,0	30,1	29,8	29,5	29,8	29,9	29,3
hsa-miR-335	33,2	33,5	33,1	33,9		33,9	34,0	32,6	33,2	32,7		33,0
hsa-miR-191	27,6	29,7	28,0	29,2	29,4	29,4	28,1	26,8	27,1	27,1	28,5	27,7
hsa-miR-375		30,4	30,6	30,4	30,5	30,4	30,7	29,5	29,1	29,7	29,1	29,8
hsa-miR-10b	32,5	33,0	32,3	33,6	32,6	34,3	33,2	32,6	32,4	33,8		32,7
hsa-miR-140-3p	26,7	30,0	27,3	28,1	29,2	27,5	29,0	28,6	27,9	27,3	30,0	27,9
hsa-miR-130a	31,4	32,7	30,8	31,9	33,1	29,8	30,3	30,6	29,7	28,4	32,4	30,8
hsa-miR-338-3p	34,8		33,0	34,3	34,2	34,8		33,6	33,8	34,5	34,4	34,5
hsa-miR-195	31,9	34,0	32,6	32,9	33,0	32,8	33,6	31,9	32,2	32,7	33,0	33,3
hsa-miR-365	31,8	32,6	30,0	33,8	32,5	33,0	33,3	31,2	31,7	31,9	33,6	32,0
hsa-miR-532-3p	34,8	31,9	30,9	31,6	32,3	31,5	32,1	31,4	31,7	32,4	34,2	31,5
hsa-miR-142-5p			32,3	33,4	34,5	32,1	32,9	31,9	32,3	31,7		33,1
hsa-miR-210			32,6	31,5	33,1	31,0	31,6	31,6	30,2	29,9	33,0	30,5
hsa-let-7a	34,9		33,7	34,5	34,2	34,4	32,7	32,4	33,3	33,3	34,6	32,8
hsa-miR-140-5p		34,5	31,1	32,9	34,4	32,8	32,1	31,1	31,7	32,0	33,8	31,4
hsa-miR-328	29,9	29,1	27,3	27,8	29,2	27,0	26,6	25,7	25,7	25,3	28,0	26,2
hsa-miR-339-5p			34,5			33,6	33,9	32,6	32,6	32,6		34,4
hsa-miR-451	26,5	29,1	22,0	24,7	23,9	25,3	23,5	22,3	23,1	23,2	24,5	23,1

miR-Name	OVA-Asthma						OVA-Kontrolle					
	58	59	61	63	64	65	75	76	78	79	80	81
hsa-miR-205	32,8	31,9	28,4	30,3	29,6	28,8	28,2	28,8	28,6	27,9	29,8	28,6
hsa-miR-16	28,1	27,8	24,7	27,7	26,0	27,1	26,3	24,9	26,2	26,1	26,4	25,8
hsa-miR-93*		32,7	31,7	31,6	32,8	32,6	32,0	31,8	32,0	31,7	34,6	31,5
hsa-miR-30a		34,2	30,8	33,1	32,5	33,3	34,8	33,2	33,6	32,8	34,6	32,5
hsa-miR-29b	34,3		28,8	30,9	31,2	29,9	30,8	29,2	30,1	29,5	32,3	29,9
hsa-miR-532-5p			31,2	32,3	32,2	32,5	32,7	32,7	32,4	34,2		32,2
hsa-miR-15b*		34,3	31,8	33,0	32,8	33,1	32,4	30,7	31,7	32,4	33,6	31,8
hsa-miR-103			31,4	31,4	33,0	31,3	31,2	30,7	30,6	30,6	32,9	30,1
hsa-let-7c	34,5		31,1	33,8	32,5	33,5	32,8	32,2	33,0	33,4	33,4	32,2
hsa-miR-122	30,3	30,4	24,7	28,7	26,4	28,6	30,1	30,9	29,2	30,4	30,2	29,1
hsa-miR-10a			32,0	33,4	33,5	33,5	33,3	31,8	33,0	34,6	33,4	32,8
hsa-miR-301a			30,7	31,4	32,7	31,7	31,8	30,6	30,6	30,5	33,7	31,1
hsa-miR-425*			34,5	34,4		32,5	32,9	32,8	32,3	31,4	34,5	
hsa-let-7b*		34,1	32,0	33,8	33,5	33,1	33,0	34,0	33,3	33,5	33,6	34,0
hsa-miR-128			31,0	31,5	34,3	30,5	29,9	28,8	29,3	28,2	32,5	30,2
hsa-miR-32			32,2	31,6	32,8	31,3	31,6	31,3	32,1	30,9	32,8	32,3
hsa-miR-425	30,7	32,3	28,1	29,3	29,2	29,4	29,9	28,0	29,0	28,4	29,7	
hsa-miR-194		32,7	30,1	32,3	30,9	32,2	33,0	32,2	32,0	32,8	33,6	32,0
hsa-miR-106b			29,9	31,3	33,6	30,7	29,8	29,3	29,9	29,8	33,0	30,3
hsa-miR-154			33,3			34,8	33,0	34,0	33,3	34,6		33,7
hsa-miR-133a			29,9	31,0	33,4	30,6	29,9	31,9	29,7	30,6	33,4	30,8
hsa-miR-495			33,0	34,1	35,0	33,6	34,1	34,3	34,4	33,6	34,0	34,8
hsa-miR-423-5p	32,3	34,4	30,0	30,5	31,8	29,8	30,2	29,9	30,5	29,5	32,2	30,3
hsa-miR-132	31,5	31,8	31,1	31,6	31,5	32,5	32,5	32,5	31,4	32,6	32,9	
hsa-miR-93	29,2	29,0	26,1	27,2	27,7	27,5	26,9	26,4	26,1	26,6	27,5	25,8
hsa-miR-421	34,6		33,0		33,9		34,5	32,4	33,7	34,3		34,2
hsa-miR-22*	33,9		31,1	32,6	31,9	32,2	34,2	33,7	33,5	34,5		33,8
hsa-miR-92b		34,5	32,6	33,5		33,9	35,0		34,4	34,4		34,0
hsa-miR-29a*	33,2	34,5	31,5	32,2	31,4	32,4	33,2	31,9	34,1	33,2	32,5	32,0
hsa-miR-574-3p	31,3	29,3	28,9	28,7	29,8	29,0	29,5	29,5	29,0	29,6	29,9	29,4
hsa-miR-191		28,9	27,9	29,3	29,2	28,9	28,2	26,7	27,1	26,8	28,4	27,8
hsa-miR-133b			30,7	32,2		30,8	30,5	33,6	30,8	30,8	34,4	32,6

Tabelle .4 – C_t-Werte der OVA Atopiegruppe, gerundet auf eine Nachkommastelle.

	Atopie-Gruppe					
	67	68	69	70	72	73
hsa-miR-20a	27,9	27,4	28,7	27,1	28,7	27,7
hsa-miR-19b	26,9	27,5	26,8	26,1	32,8	26,7
hsa-miR-126	29,7	29,3	29,3	28,9	29,5	29,4
hsa-miR-24	24,3	24,4	24,5	24,5	26,4	24,9
hsa-miR-223	27,2	26,0	27,7	26,1	27,0	27,4
hsa-miR-15a	26,7	26,4	26,3	26,1	27,5	26,3
hsa-miR-21	24,9	24,1	24,9	24,5	24,7	25,4
hsa-miR-150	26,2	26,2	27,3	26,8	26,4	27,6
hsa-miR-23a	25,5	24,5	25,2	25,2	25,9	25,5
hsa-miR-320a	27,0	26,3	26,2	26,6	28,3	26,5
hsa-miR-451	25,0	24,1	25,6	24,9	25,4	25,0

	Atopic-Gruppe					
	67	68	69	70	72	73
hsa-miR-142-3p	29,3	28,5	29,0	28,9	31,5	28,9
hsa-miR-486-5p	25,7	25,0	25,2	25,2	25,7	25,3
hsa-let-7g	31,7	30,2	30,8	30,8	32,7	32,1
hsa-miR-27a	27,7	27,1	26,9	27,1	30,0	27,4
hsa-miR-15b	29,7	29,1	29,3	29,0	29,6	29,1
hsa-miR-101	29,2	29,8	29,6	28,9	32,3	29,1
hsa-miR-26a	32,4	32,0	32,3	31,9	33,0	31,9
hsa-miR-221	30,1	30,9	30,8	30,4	31,6	30,9
hsa-miR-16	27,7	26,4	27,8	27,4	27,5	27,6
hsa-miR-185	30,3		31,2	30,0	33,4	30,1
hsa-miR-107	32,5	33,2	32,6	32,0		32,0
hsa-miR-222	28,2	29,6	28,4	28,6		28,9
hsa-miR-342-3p	25,2	25,3	25,6	25,5	26,6	26,0
hsa-miR-23b	28,7	27,7	28,4	28,4	29,3	28,7
hsa-miR-423-3p	29,9	29,2	29,9	29,2	32,0	29,8
hsa-miR-30b	28,9	28,9	29,1	29,0	31,8	29,5
hsa-let-7f	33,3	32,5	32,7	33,1	34,4	33,6
hsa-miR-103	32,5	31,2	31,7	31,2	33,4	31,6
hsa-miR-144	28,2	28,4	27,7	27,2	32,8	26,6
hsa-miR-30c	29,2	28,9	29,4	29,4	29,8	29,3
hsa-miR-145	29,3	29,3	29,2	29,1	31,5	29,6
hsa-miR-26b	34,0	33,1	34,6		34,8	34,4
hsa-miR-192	25,8	26,8	27,4	27,1	26,8	26,6
hsa-miR-27b	28,4	27,8	27,8	27,9	30,4	28,1
hsa-miR-186	34,5	33,0	33,8	33,1	34,5	33,9
hsa-let-7i	30,7	30,5	30,8	29,9	32,3	30,8
hsa-miR-425	29,2	28,8	30,1	29,1	29,4	29,6
hsa-miR-139-5p	31,1	31,5	31,9	30,7	31,2	33,0
hsa-miR-17	32,5	31,9	33,8	31,6	33,8	32,5
hsa-miR-143	32,4	32,9	32,1	31,3		31,9
hsa-miR-199a-3p	33,4	32,7	33,0	32,0	33,9	33,1
hsa-miR-29c	28,2	28,2	27,5	28,6	30,1	28,2
hsa-miR-146a	30,5	29,9	30,7	29,5	30,7	30,5
hsa-miR-29a	27,1	26,9	26,6	27,2	28,8	27,2
hsa-miR-99a	31,7	30,8	31,1	30,5	32,3	31,2
hsa-miR-152	31,1	30,5	30,6	30,7	31,9	31,5
hsa-miR-148a	30,0	29,7	29,9	29,9	30,9	30,1
hsa-miR-423-5p	30,6	30,2	29,8	29,8	32,6	29,7
hsa-miR-19a	32,7	32,1	31,8	31,9		31,4
hsa-miR-30d	31,7	31,2	32,7	32,1	32,7	32,5
hsa-miR-22	29,7	31,6	29,3	30,2	33,7	29,9
hsa-miR-125b	31,0	29,8	30,0	30,2	30,5	30,9
hsa-miR-378	28,6	29,1	28,3	28,2	33,6	28,4
hsa-miR-125a-5p	32,5	31,8	32,6	31,3	32,5	32,3
hsa-miR-148b	31,3	31,6	31,5	30,5	32,3	30,9
hsa-miR-484	27,7	27,5	27,2	27,4	30,6	27,3
hsa-miR-25	28,2	27,1	28,3	27,5	28,0	28,1
hsa-miR-99b	32,1	31,6	31,1	31,7	33,7	32,5
hsa-miR-93	26,9	26,8	27,6	26,6	28,9	26,8

	Atopie-Gruppe					
	67	68	69	70	72	73
hsa-miR-652	33,6	32,0	32,8	33,2		32,8
hsa-miR-151-5p	34,8	34,3	34,8	33,9		34,5
hsa-miR-18a	34,5	33,2		32,3	34,4	
hsa-let-7d	34,7	34,4	33,6	34,6		34,4
hsa-let-7d*	29,2	28,9	29,0	29,0	29,1	29,5
hsa-let-7b	30,9	30,7	30,8	30,8	31,0	31,1
hsa-miR-335		33,6	34,0	34,3		34,2
hsa-miR-191	28,9	28,7	29,4	29,1	30,6	29,8
hsa-miR-375	30,7	30,3	30,8	29,9	30,8	31,7
hsa-miR-10b	33,5	32,7	33,0	34,1	34,4	34,8
hsa-miR-140-3p	27,3	27,7	26,6	27,3	30,8	27,2
hsa-miR-130a	30,9	31,7	29,8	31,0		30,0
hsa-miR-338-3p		34,9		34,8		
hsa-miR-195	34,9	34,3		33,1	34,5	34,1
hsa-miR-365	31,7	32,2	34,4	34,7	33,0	32,7
hsa-miR-532-3p	31,4		30,8	30,7	31,9	31,5
hsa-miR-142-5p	32,5		32,1	31,7		31,9
hsa-miR-210	31,3		30,5	31,0		31,3
hsa-let-7a	34,2		33,7	33,9		34,8
hsa-miR-140-5p	33,6		33,2	33,6	34,4	33,3
hsa-miR-328	27,7		27,8	27,7	30,9	28,1
hsa-miR-339-5p	34,8		34,8	34,4		
hsa-miR-451	24,8		25,7	24,9	25,3	25,3
hsa-miR-205	29,6		29,2	30,0	31,1	29,2
hsa-miR-16	27,2		27,9	27,4	27,3	27,9
hsa-miR-93*	32,1		32,2	31,6	33,6	32,2
hsa-miR-30a	32,7		32,9	32,2	33,3	33,2
hsa-miR-29b	29,6		30,2	29,5	32,7	30,3
hsa-miR-532-5p	31,6		31,5	31,1	33,5	32,2
hsa-miR-15b*	33,0		32,3	32,7	33,2	33,4
hsa-miR-103	31,8		31,1	31,8		32,1
hsa-let-7c	33,7		34,1	33,4	33,9	
hsa-miR-122	27,7		30,3	29,3	27,4	28,6
hsa-miR-10a	33,1		33,9	32,8	32,5	35,0
hsa-miR-301a	31,5		31,6	30,8		32,5
hsa-miR-425*			31,9	32,4		34,2
hsa-let-7b*	32,2		33,1	32,9	33,8	33,9
hsa-miR-128	30,7		31,3	30,7	34,1	32,1
hsa-miR-32	31,9		32,4	32,3	33,9	30,6
hsa-miR-425	29,5		30,2	29,0	29,4	30,0
hsa-miR-194			33,0	32,0	32,0	32,8
hsa-miR-106b	30,8		31,2	30,9		31,1
hsa-miR-154	34,1		33,7	34,2		34,2
hsa-miR-133a			28,8	28,4		31,0
hsa-miR-495	33,5		33,2	33,3		33,5
hsa-miR-423-5p	29,8		30,4	29,8	31,7	30,0
hsa-miR-132	31,1		32,0	31,3	31,3	33,2
hsa-miR-93	27,1		27,8	26,6	40,0	26,8
hsa-miR-421	33,9		34,6	34,5	34,5	34,8

	Atopic-Gruppe					
	67	68	69	70	72	73
hsa-miR-22*	31,5		30,9	31,3	33,2	32,0
hsa-miR-92b			33,1	34,9		
hsa-miR-29a*	33,2		34,6	32,1	33,1	33,9
hsa-miR-574-3p	28,9		28,9	27,9	30,0	29,0
hsa-miR-191	29,0		29,4	29,0	30,0	29,8
hsa-miR-133b			29,4	29,3		31,3

Tabelle 5 – C₁-Mittelwerte der Bestätigungstests

	mir-15a-5p	mir-18a-5p	mir-21-5p	mir-22-3p	mir-23a-3p	mir-25-3p	mir-27a-3p	mir-27b-3p	mir-29a-3p	mir-29c-3p	mir-93	mir-130a-3p	mir-140-3p	mir-148b-3p	mir-223	mir-320a	mir-342-3p	mir-425-5p
HDM-Asthma	13	28,8	34,6	27,4	33,2	30,8	29,4	31,0	30,9	31,9	28,2	34,7	28,9	32,6	27,1	30,5	30,0	31,6
	14	28,8	34,3	27,5	33,6	31,6	29,7	31,4	30,9	32,0	27,9	34,8	29,1	32,6	27,2	30,9	30,5	31,9
	15	28,6	34,0	27,4	33,2	31,2	29,6	29,3	30,9	31,5	28,5	33,9	29,3	33,2	28,2	31,0	30,7	31,7
	16	27,5	32,9	26,2	32,5	30,6	28,5	28,3	30,3	29,9	30,4	27,5	27,3	31,6	27,3	29,7	29,9	30,7
	17	28,5	34,6	27,5	34,6	30,6	29,7	29,4	31,9	30,8	31,8	28,2	33,8	28,6	27,1	30,7	30,1	31,5
	18	28,0	34,7	27,3	33,6	30,7	29,3	29,3	31,7	30,9	31,3	28,2	34,1	28,4	27,8	30,2	29,8	31,5
	21	28,0	33,9	27,1	32,6	31,6	29,8	29,8	31,6	30,7	31,6	27,8	NA	28,6	27,3	30,7	30,1	31,7
	22	28,1	34,1	26,9	32,3	31,1	29,1	29,5	31,3	30,1	30,8	27,5	34,9	31,6	26,7	30,5	29,8	31,1
23	28,9	35,3	27,8	34,3	31,1	29,9	29,7	31,5	31,5	31,9	28,4	35,1	29,1	32,8	31,2	30,8	31,9	
24	28,0	33,6	26,3	32,5	29,7	28,8	28,1	29,7	29,8	30,3	27,6	33,1	28,1	31,9	27,3	30,0	30,1	30,7
HDM-Kontrolle	27	27,8	34,6	27,1	31,9	30,8	29,1	31,4	30,1	30,8	28,1	32,8	28,1	31,6	27,8	30,1	30,0	31,3
	28	28,6	34,6	26,8	33,5	30,2	29,6	30,5	30,9	31,2	28,1	33,7	29,0	32,5	27,6	30,2	30,7	31,1
	29	27,5	33,5	26,8	33,0	30,4	28,7	29,0	31,2	30,2	26,9	32,6	28,1	31,9	26,8	29,8	30,3	31,1
	30	26,9	33,0	25,8	32,3	29,3	27,7	27,9	29,7	29,2	30,0	26,5	27,4	30,8	26,2	28,5	30,0	29,8
	31	28,1	34,2	27,5	35,0	30,9	29,7	29,9	32,2	31,7	32,3	34,3	29,0	33,3	27,7	30,9	30,8	31,8
	32	27,8	33,5	26,8	34,1	29,9	28,9	29,0	30,6	30,6	30,6	27,5	33,2	31,2	27,8	29,9	29,4	30,6
	33	27,9	34,2	27,2	33,2	30,5	28,6	29,1	31,1	30,6	31,6	27,4	NA	28,0	27,1	29,8	30,2	30,8
	34	28,1	34,2	27,2	33,6	31,0	29,0	29,1	30,8	30,7	31,8	27,5	NA	31,8	27,7	30,5	29,7	31,2
35	28,1	33,9	26,9	33,6	30,0	29,2	29,0	30,7	31,0	31,0	27,9	32,4	31,8	27,7	29,9	30,7	30,9	
36	28,9	34,5	27,8	34,6	31,0	29,5	29,5	31,0	31,8	32,0	28,2	33,7	28,8	28,3	30,1	30,8	31,8	
OVA-Asthma	35	28,0	26,6	26,6	30,8	29,7	28,5	29,3	28,6	29,3	29,4	31,0	28,8	28,6	27,8	28,6	27,6	31,2
	36	27,5	25,4	25,4	30,3	29,0	28,6	28,5	27,7	28,4	28,3	34,7	29,9	28,1	26,9	28,1	27,1	30,6
	37	26,8	25,2	26,3	29,7	29,7	28,1	27,6	26,8	26,8	27,5	27,6	28,4	26,3	26,3	27,7	27,7	29,7
	48	27,9	26,3	26,3	30,7	29,7	29,7	29,7	28,8	29,6	29,2	NA	31,3	28,2	28,2	29,1	27,7	31,1
	58	28,3	35,0	25,7	35,0	29,0	28,2	28,3	30,2	28,9	30,3	33,7	28,3	33,1	27,3	27,7	26,9	31,2
	59	30,1	NA	26,5	NA	30,6	29,6	30,9	31,8	31,1	32,3	30,6	32,7	34,5	28,6	29,7	28,1	32,8
	61	28,6	34,5	25,2	NA	29,0	28,1	28,1	29,5	28,8	29,7	28,3	34,0	29,9	26,3	27,6	27,1	30,9
	63	29,0	NA	25,8	NA	29,3	28,8	28,5	30,1	30,1	30,5	29,2	34,5	30,0	27,5	28,4	28,4	31,6
64	30,2	NA	25,9	NA	30,2	29,0	30,2	30,8	30,9	31,7	30,7	NA	32,4	27,7	29,0	27,3	33,0	
65	28,8	NA	26,2	34,1	29,7	29,0	27,5	29,3	29,6	29,6	28,5	32,6	28,5	27,6	28,0	26,9	31,6	
OVA-Atopie	38	28,4	27,0	27,0	31,5	30,0	30,0	30,0	28,4	29,0	30,3	32,0	29,5	28,6	30,0	28,6	27,9	31,7
	40	27,5	26,3	26,3	30,5	29,5	28,4	28,4	28,4	29,0	28,5	31,4	28,7	27,5	27,5	28,5	27,1	31,1
	41	27,7	26,7	26,7	30,5	29,9	28,4	28,1	28,7	28,1	29,7	30,7	28,1	28,7	28,0	28,0	27,2	31,8
	52	27,6	26,6	26,6	30,6	29,3	28,3	28,3	28,0	28,1	28,7	31,0	28,1	28,3	28,3	28,0	27,0	31,1
	67	28,9	NA	26,0	33,7	30,0	29,2	28,7	29,1	29,7	29,1	33,4	28,7	34,1	28,1	28,2	26,3	31,9
	68	29,0	NA	25,6	NA	29,1	29,2	28,1	30,0	28,7	30,6	29,2	34,6	29,2	27,2	28,1	27,0	31,4
	69	28,7	NA	26,4	33,4	30,1	30,0	28,5	28,8	29,9	29,7	34,0	28,1	34,2	28,7	28,1	27,0	32,6
	70	28,5	NA	25,8	33,8	29,3	28,0	28,0	30,5	28,8	29,9	33,5	28,8	33,8	27,1	27,9	26,8	31,1
73	28,3	NA	26,5	32,8	29,9	29,3	28,3	29,6	29,0	29,5	28,7	32,5	28,1	28,4	27,9	27,6	31,7	
OVA-Kontrolle	42	25,9	24,9	24,9	29,2	27,5	29,5	29,5	28,3	29,1	26,5	33,6	29,9	26,4	26,4	27,7	29,1	29,0
	43	27,6	26,7	26,7	30,1	28,9	28,4	28,4	29,7	30,4	28,0	30,8	29,2	27,7	27,7	28,6	29,5	30,5
	54	27,0	26,0	26,0	29,5	28,6	29,0	28,6	28,6	29,6	28,0	29,5	28,3	27,3	28,0	29,0	29,0	29,9
	57	26,8	26,0	26,0	30,0	28,2	29,6	28,8	28,8	30,0	27,5	33,4	29,9	27,1	28,2	29,0	29,8	29,8
	74	28,1	33,9	25,9	NA	29,5	28,8	29,6	30,9	31,1	32,0	27,6	29,6	32,7	27,2	28,2	NA	30,7
	75	28,6	NA	25,9	NA	29,9	29,2	30,6	31,6	32,8	28,6	33,1	30,4	33,1	28,0	28,8	29,7	31,7
	76	27,2	33,5	25,0	NA	28,7	28,6	29,8	30,2	31,1	30,8	30,8	33,1	31,8	26,6	28,3	28,4	30,1
	78	28,6	34,5	26,6	NA	29,6	29,1	29,2	31,1	31,6	28,1	33,1	29,3	32,9	27,7	28,6	29,0	31,1
79	27,9	34,0	26,0	34,5	29,0	28,6	29,0	30,5	30,7	31,5	31,4	28,6	32,1	27,4	27,9	29,4	30,1	
81	28,6	NA	26,8	NA	29,4	28,3	28,9	30,5	31,3	31,8	27,8	33,8	28,6	27,7	28,2	29,1	28,2	

Tabelle 6 – Layout Serum/Plasma Fokus miRNA PCR Platten (oben: Platte I, unten: Platte II).

A	hsa-miR-20a	hsa-miR-19b	hsa-miR-126	hsa-miR-24	hsa-miR-223	hsa-miR-15a	hsa-miR-21	hsa-miR-150	hsa-miR-23a	hsa-miR-IPC	hsa-miR-320a	hsa-miR-451
B	hsa-miR-106a	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-320b	hsa-let-7g	hsa-miR-27a	hsa-miR-15b	hsa-miR-101	hsa-miR-26a	hsa-miR-IPC	hsa-miR-221	hsa-miR-16
C	hsa-miR-185	hsa-miR-107	hsa-miR-222	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-1974	hsa-miR-23b	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-30b	hsa-let-7f	hsa-miR-IPC	hsa-miR-181a	hsa-miR-103
D	hsa-miR-144	hsa-miR-30c	hsa-miR-145	hsa-miR-26b	hsa-miR-197	hsa-miR-192	hsa-miR-151-3p	hsa-miR-27b	hsa-miR-186	hsa-miR-CP	hsa-let-7i	hsa-miR-425
E	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-17	hsa-miR-143	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-29c	hsa-miR-146a	hsa-miR-29a	hsa-miR-99a	hsa-miR-152	hsa-miR-148a	hsa-miR-423-5p
F	hsa-miR-19a	hsa-miR-30d	hsa-miR-22	hsa-miR-720	hsa-miR-125b	hsa-miR-378	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-148b	hsa-miR-484	hsa-miR-25	hsa-miR-99b	hsa-miR-93
G	hsa-miR-18b	hsa-miR-652	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-151-5p	hsa-miR-18a	hsa-let-7d	hsa-let-7d*	hsa-miR-34a	hsa-let-7b	hsa-miR-335	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-191
H	hsa-miR-375	hsa-miR-374b	hsa-miR-215	hsa-miR-10b	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-130a	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-33a	hsa-miR-195	hsa-miR-365	Blank (H20)
A	hsa-miR-497	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-210	hsa-let-7a	hsa-miR-30e	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-328	hsa-miR-IPC	hsa-miR-16-2*	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-451
B	hsa-miR-144*	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-584	hsa-let-7e	hsa-miR-205	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-155	hsa-miR-374a	hsa-miR-IPC	hsa-miR-92a	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-16
C	hsa-miR-20b	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-93*	hsa-miR-30a	hsa-miR-29b	hsa-miR-505	hsa-miR-223*	hsa-miR-532-5p	hsa-miR-IPC	hsa-miR-106b*	hsa-miR-15b*	hsa-miR-103
D	hsa-let-7c	hsa-miR-122	hsa-miR-766	hsa-miR-10a	hsa-miR-301a	hsa-miR-346	hsa-miR-425*	hsa-let-7p*	hsa-miR-CP	hsa-miR-128	hsa-miR-32	hsa-miR-425
E	hsa-miR-194	hsa-miR-18a*	hsa-miR-106b	hsa-miR-136	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-154	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-30e*	hsa-miR-326	hsa-miR-133a	hsa-miR-495	hsa-miR-423-5p
F	hsa-miR-1	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-20a*	hsa-miR-660	hsa-miR-376a	hsa-miR-193b	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-543	hsa-miR-132	hsa-miR-363	hsa-miR-629	hsa-miR-93
G	hsa-miR-182	hsa-miR-421	hsa-miR-22*	hsa-miR-92b	hsa-miR-29a*	hsa-miR-500a	hsa-miR-103-2*	hsa-miR-2110	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-29b-2*	hsa-let-7i*	hsa-miR-191
H	hsa-miR-382	hsa-miR-95	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-200c	hsa-miR-605	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-297	hsa-miR-551b	Blank (H20)

Literaturverzeichnis

- [1] Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. & for Asthma (GINA) Program, G. I. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* **59**, 469–478 (2004).
- [2] Robert-Koch-Institut (Hrsg). Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (2012).
- [3] Schlaud, M., Atzpodien, K. & Thierfelder, W. Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **50**, 701–710 (2007).
- [4] Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2012. *Bethesda, MD: National Institutes of Health* 16 (2012).
- [5] Bibliographisches Institut GmbH. Eintrag: Phänotyp. Duden online (2013). URL <http://www.duden.de/node/797591/visions/1131871/view>.
- [6] Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* **372**, 1107–19 (2008).
- [7] Lancet, T. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Editorial Lancet* **368**, 705 (2006).
- [8] Rackemann, F. A working classification of asthma. *The American journal of medicine* (1947).
- [9] Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature medicine* **18**, 716–25 (2012).
- [10] Burrows, B., Martinez, F. D., Halonen, M., Barbee, R. A. & Cline, M. G. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *The New England journal of medicine* **320**, 271–7 (1989).
- [11] Bentley, A. M. *et al.* Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *The American review of respiratory disease* **146**, 500–6 (1992).
- [12] Humbert, M. *et al.* High-affinity IgE receptor (FcεRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **153**, 1931–7 (1996).
- [13] Humbert, M. *et al.* IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against intrinsic asthma being a distinct immunopathologic entity. *American journal of respiratory and critical care medicine* **154**, 1497–504 (1996).
- [14] Corren, J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discovery medicine* **15**, 243–9 (2013).
- [15] Haldar, P. *et al.* Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *American journal of respiratory and critical care medicine* **178**, 218–24 (2008).
- [16] Moore, W. C. *et al.* Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *American journal of respiratory and critical care medicine* **181**, 315–23 (2010).
- [17] Siroux, V. *et al.* Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *The European respiratory journal* **38**, 310–7 (2011).
- [18] Woodruff, P. G. *et al.* T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **180**, 388–95 (2009).
- [19] Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A. & Holgate, S. T. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *The American review of respiratory disease* **139**, 806–17 (1989).
- [20] Carroll, N., Cooke, C. & James, A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *The European respiratory journal* **10**, 292–300 (1997).

- [21] Sur, S. *et al.* Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *The American review of respiratory disease* **148**, 713–9 (1993).
- [22] Awadh, N., Müller, N. L., Park, C. S., Abboud, R. T. & FitzGerald, J. M. Airway wall thickness in patients with near fatal asthma and control groups: assessment with high resolution computed tomographic scanning. *Thorax* **53**, 248–53 (1998).
- [23] Saglani, S. *et al.* Ultrastructure of the reticular basement membrane in asthmatic adults, children and infants. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **28**, 505–512 (2006).
- [24] Chiappara, G. *et al.* Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **1**, 85–93 (2001).
- [25] James, A. L. *et al.* Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **185**, 1058–64 (2012).
- [26] Fahy, J. V. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**, 46–51 (2001).
- [27] Green, F. H. Y., Butt, J. C., James, A. L. & Carroll, N. G. Abnormalities of the bronchial arteries in asthma. *Chest* **130**, 1025–1033 (2006).
- [28] Simcock, D. E. *et al.* Proangiogenic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**, 146–53 (2007).
- [29] Capetandes, A., Zhuang, M., Haque, F. N., Xie, L. & Frieri, M. Vascular endothelial growth factor is increased by human pulmonary cells stimulated with *Dermatophagoides* sp. extract. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* **28**, 324–30 (2007).
- [30] Park, K.-S. *et al.* SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. *The Journal of clinical investigation* **117**, 978–988 (2007).
- [31] Grainge, C. L. *et al.* Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *The New England journal of medicine* **364**, 2006–15 (2011).
- [32] Davies, D. E. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Annals of the American Thoracic Society* **11 Suppl 5**, S244–51 (2014).
- [33] Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
- [34] Hammad, H. *et al.* House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nature medicine* **15**, 410–6 (2009).
- [35] Hammad, H. *et al.* Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2097–111 (2010).
- [36] Tschernig, T., Debertin, A. S., Paulsen, F., Kleemann, W. J. & Pabst, R. Dendritic cells in the mucosa of the human trachea are not regularly found in the first year of life. *Thorax* **56**, 427–31 (2001).
- [37] Kudo, M., Ishigatsubo, Y. & Aoki, I. Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology* **4**, 263 (2013).
- [38] Svensson, M., Stockinger, B. & Wick, M. J. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *The Journal of Immunology* **158**, 4229–4236 (1997).
- [39] Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine* **18**, 673–83 (2012).
- [40] Paul, W. E. & Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology* **10**, 225–35 (2010).
- [41] Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews. Immunology* **2**, 933–44 (2002).
- [42] Veres, T., Voedisch, S., Spies, E., Tschernig, T. & Braun, A. Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *The American journal of pathology* **179**, 603–609 (2011).

- [43] Blank, F. *et al.* Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology* **216**, 86–95 (2011).
- [44] Kashiwada, M. *et al.* IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 821–6 (2010).
- [45] Prussin, C. & Metcalfe, D. D. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* **111**, S486–94 (2003).
- [46] Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3546–56 (2008).
- [47] Odaka, M. *et al.* Differential regulation of chemokine expression by Th1 and Th2 cytokines and mechanisms of eotaxin/CCL-11 expression in human airway smooth muscle cells. *International archives of allergy and immunology* **143 Suppl.**, 84–8 (2007).
- [48] Gavett, S. H. *et al.* Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *The American journal of physiology* **272**, L253–61 (1997).
- [49] Bowen, H., Kelly, A., Lee, T. & Lavender, P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**, 1422–31 (2008).
- [50] Webb, D. C. *et al.* Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 108–13 (2000).
- [51] Wills-Karp, M. *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 2258–61 (1998).
- [52] Chiba, Y. *et al.* Involvement of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Respiratory research* **6**, 4 (2005).
- [53] Rothenberg, M. E. *et al.* Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *The Journal of clinical investigation* **81**, 1986–1992 (1988).
- [54] Sanderson, C. J. Interleukin-5: an eosinophil growth and activation factor. *Developments in biological standardization* **69**, 23–9 (1988).
- [55] Leckie, M. J. *et al.* Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* **356**, 2144–8 (2000).
- [56] Ayars, G. H., Altman, L. C., Gleich, G. J., Loegering, D. A. & Baker, C. B. Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *The Journal of allergy and clinical immunology* **76**, 595–604 (1985).
- [57] Durcan, N. *et al.* Eosinophil-mediated cholinergic nerve remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **34**, 775–86 (2006).
- [58] Kay, A. B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends in molecular medicine* **11**, 148–52 (2005).
- [59] Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* **9**, 1341–6 (2008).
- [60] Goswami, R. & Kaplan, M. H. A brief history of IL-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 3283–8 (2011).
- [61] Caron, I. & Carioto, L. [Feline asthma...a disease that cuts your breath]. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* **44**, 654–6 (2003).
- [62] Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A. & Lavoie, J.-P. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology (Carlton, Vic.)* **16**, 1027–46 (2011).
- [63] Holmes, A. M., Solari, R. & Holgate, S. T. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug discovery today* **16**, 659–70 (2011).
- [64] Hayashi, T., Adachi, Y., Hasegawa, K. & Morimoto, M. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c mice. *Scandinavian journal of immunology* **57**, 562–7 (2003).

- [65] Saglani, S. *et al.* Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite-exposed neonatal mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **41**, 281–289 (2009).
- [66] Nials, A. T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms* **1**, 213–20 (2008).
- [67] Kumar, R. K., Herbert, C. & Foster, P. S. The "classical ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current drug targets* **9**, 485–94 (2008).
- [68] Johnson, J. R. *et al.* Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* **169**, 378–85 (2004).
- [69] Carroll, N., Elliot, J., Morton, A. & James, A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *The American review of respiratory disease* **147**, 405–410 (1993).
- [70] Wenzel, S. & Holgate, S. T. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**, 1173–1176; discussion 1176–1178 (2006).
- [71] Shinagawa, K. & Kojima, M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *American journal of respiratory and critical care medicine* **168**, 959–67 (2003).
- [72] Boyce, J. A. & Austen, K. F. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1869–1873 (2005).
- [73] Buhl, R. *et al.* [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* **60**, 139–77 (2006).
- [74] Jackson, D. J. *et al.* Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American journal of respiratory and critical care medicine* **178**, 667–72 (2008).
- [75] Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F. & Kjellman, B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *American journal of respiratory and critical care medicine* **161**, 1501–7 (2000).
- [76] Payne, D. *et al.* Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma. *Archives of disease in childhood* **84**, 423–6 (2001).
- [77] Vijverberg, S. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics: targets & ...* 199–210 (2013).
- [78] Lesko, L. & Jr, A. A. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies 1. *Annual review of pharmacology and ...* (2001).
- [79] Grootendorst, D. C. *et al.* Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **27**, 769–79 (1997).
- [80] Simpson, J. L., Scott, R., Boyle, M. J. & Gibson, P. G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology (Carlton, Vic.)* **11**, 54–61 (2006).
- [81] Gibson, P. G., Simpson, J. L., Hankin, R., Powell, H. & Henry, R. L. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* **58**, 116–21 (2003).
- [82] Bacci, E. *et al.* Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* **129**, 565–72 (2006).
- [83] Gogate, S. & Katial, R. Pediatric biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and leukotriene E4. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **8**, 154–7 (2008).
- [84] Yates, D. H. Role of exhaled nitric oxide in asthma. *Immunology and cell biology* **79**, 178–90 (2001).
- [85] Alving, K., Weitzberg, E. & Lundberg, J. M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *The European respiratory journal* **6**, 1368–70 (1993).
- [86] Ferrante, G., Malizia, V., Antona, R., Corsello, G. & Grutta, S. L. The value of FeNO measurement in childhood asthma: uncertainties and perspectives. *Multidisciplinary respiratory medicine* **8**, 50 (2013).

- [87] Pijnenburg, M. W. H. & De Jongste, J. C. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**, 246–59 (2008).
- [88] Petsky, H. L. *et al.* A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax* **67**, 199–208 (2012).
- [89] Knuffman, J. E. *et al.* Phenotypic predictors of long-term response to inhaled corticosteroid and leukotriene modifier therapies in pediatric asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **123**, 411–6 (2009).
- [90] Frangogiannis, N. G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological reviews* **92**, 635–88 (2012).
- [91] Woodruff, P. G. *et al.* Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15858–63 (2007).
- [92] Corren, J. *et al.* Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *The New England journal of medicine* **365**, 1088–98 (2011).
- [93] Jia, G. *et al.* Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* **130**, 647–654.e10 (2012).
- [94] Thaler, E. R. & Hanson, C. W. Medical applications of electronic nose technology. *Expert review of medical devices* **2**, 559–66 (2005).
- [95] Dragonieri, S. *et al.* An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *The Journal of allergy and clinical immunology* **120**, 856–62 (2007).
- [96] Fens, N. *et al.* Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **180**, 1076–82 (2009).
- [97] Rabinovitch, N. Urinary leukotriene E4 as a biomarker of exposure, susceptibility and risk in asthma. *Immunology and allergy clinics of North America* **32**, 433–45 (2012).
- [98] Cai, C., Yang, J., Hu, S., Zhou, M. & Guo, W. Relationship between urinary cysteinyl leukotriene E4 levels and clinical response to antileukotriene treatment in patients with asthma. *Lung* **185**, 105–12 (2007).
- [99] Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. & Wang, K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research* **717**, 85–90 (2011).
- [100] Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
- [101] Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* **19**, 92–105 (2009).
- [102] Bernstein, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* **35**, 215–7 (2003).
- [103] Boyd, S. D. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest* **88**, 569–578 (2008).
- [104] Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051–60 (2004).
- [105] Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1097–101 (2006).
- [106] Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* **14**, 1902–10 (2004).
- [107] Woods, K., Thomson, J. M. & Hammond, S. M. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2130–4 (2007).
- [108] Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* **17**, 3011–6 (2003).
- [109] Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 834–8 (2001).

- [110] Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 22–32 (2008).
- [111] Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* **79**, 351–79 (2010).
- [112] Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* **18**, 504–11 (2004).
- [113] Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 1931–4 (2007).
- [114] Griffiths-Jones, S. The microRNA Registry. *Nucleic acids research* **32**, D109–11 (2004).
- [115] Tan, Z. *et al.* Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *American journal of human genetics* **81**, 829–34 (2007).
- [116] Su, X.-W. *et al.* Association between single-nucleotide polymorphisms in pre-miRNAs and the risk of asthma in a Chinese population. *DNA and cell biology* **30**, 919–23 (2011).
- [117] Lu, T. X. *et al.* MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 3362–73 (2011).
- [118] Mattes, J., Collison, A., Plank, M., Phipps, S. & Foster, P. S. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 18704–9 (2009).
- [119] Collison, A., Mattes, J., Plank, M. & Foster, P. S. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology* **128**, 160–167.e4 (2011).
- [120] Zhai, Y. *et al.* Coordinated changes in mRNA turnover, translation, and RNA processing bodies in bronchial epithelial cells following inflammatory stimulation. *Molecular and cellular biology* **28**, 7414–26 (2008).
- [121] Kumar, M. *et al.* Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* **128**, 1077–85.e1–10 (2011).
- [122] Zhang, Y.-y., Zhong, M., Zhang, M.-y. & Lv, K. [Expression and clinical significance of miR-155 in peripheral blood CD4(+);T cells of patients with allergic asthma]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* **28**, 540–3 (2012).
- [123] Mayoral, R. J. *et al.* MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 433–45 (2009).
- [124] Mayoral, R. J. *et al.* MiR-221 influences effector functions and actin cytoskeleton in mast cells. *PloS one* **6**, e26133 (2011).
- [125] Qin, H.-b. *et al.* Inhibition of miRNA-221 suppresses the airway inflammation in asthma. *Inflammation* **35**, 1595–9 (2012).
- [126] Perry, M. M., Baker, J. E., Gibeon, D. S., Adcock, I. M. & Chung, K. F. Airway Smooth Muscle Hyperproliferation is Regulated by microRNA-221 in Severe Asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* (2013).
- [127] Chiba, Y., Tanabe, M., Goto, K., Sakai, H. & Misawa, M. Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of Rhoa in bronchial smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* **180**, 713–9 (2009).
- [128] Sharma, A. *et al.* Antagonism of mmu-mir-106a attenuates asthma features in allergic murine model. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **113**, 459–64 (2012).
- [129] Lee, C. G. *et al.* Studies of vascular endothelial growth factor in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* **8**, 512–5 (2011).
- [130] Song, C., Ma, H., Yao, C., Tao, X. & Gan, H. Alveolar macrophage-derived vascular endothelial growth factor contributes to allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *Scandinavian journal of immunology* **75**, 599–605 (2012).

- [131] Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry* **56**, 1733–41 (2010).
- [132] Weickmann, J. L. & Glitz, D. G. Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. *The Journal of biological chemistry* **257**, 8705–10 (1982).
- [133] Vickers, K. C. & Remaley, A. T. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current opinion in lipidology* **23**, 91–7 (2012).
- [134] Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research* **39**, 7223–33 (2011).
- [135] Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 5003–8 (2011).
- [136] Simons, M. & Raposo, G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology* **21**, 575–81 (2009).
- [137] Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology* **19**, 43–51 (2009).
- [138] Zernecke, A. *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling* **2**, ra81 (2009).
- [139] Rechavi, O. *et al.* Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small RNAs. *Genes & development* **23**, 1971–9 (2009).
- [140] Zhang, Y. *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* **39**, 133–44 (2010).
- [141] Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**, 654–9 (2007).
- [142] Bitzer, M., Ben-Dov, I. Z. & Thum, T. Microparticles and microRNAs of endothelial progenitor cells ameliorate acute kidney injury. *Kidney international* **82**, 375–7 (2012).
- [143] Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* **18**, 997–1006 (2008).
- [144] Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)* **50**, 298–301 (2010).
- [145] Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10513–8 (2008).
- [146] Schöler, N., Langer, C., Döhner, H., Buske, C. & Kuchenbauer, F. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp Hematol* **38**, 1126–1130 (2010).
- [147] Hanke, M. *et al.* A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic oncology* **28**, 655–61 (2010).
- [148] Park, N. J. *et al.* Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5473–7 (2009).
- [149] Liu, F., Qin, H.-B., Xu, B., Zhou, H. & Zhao, D.-Y. Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p. *Molecular medicine reports* **6**, 1178–82 (2012).
- [150] Kirschner, M. B. *et al.* The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Frontiers in Genetics* **4**, 1–13 (2013).
- [151] Bruchova, H., Yoon, D., Agarwal, A. M., Mendell, J. & Prchal, J. T. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Experimental Hematology* **35**, 1657–1667 (2007).
- [152] Kang, K., Peng, X., Luo, J. & Gou, D. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *Journal of animal science and biotechnology* **3**, 4 (2012).

- [153] Lunn, M.-L., Mouritzen, P., Faber, K. & Jacobsen, N. MicroRNA quantitation from a single cell by PCR using SYBR® Green detection and LNA-based primers. *Nature Methods* **4**, 24–25 (2008).
- [154] Benes, V. & Castoldi, M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods (San Diego, Calif.)* **50**, 244–9 (2010).
- [155] Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. a. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* **1**, 1559–82 (2006).
- [156] Snowdon, J., Boag, S. & Feilotter, H. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Canadian Urological ...* (2013).
- [157] Avissar, M., Christensen, B. C., Kelsey, K. T. & Marsit, C. J. A MicroRNA Expression Ratio is Predictive of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* **15**, 2850–2855 (2009).
- [158] D'haene, B., Mestdagh, P., Hellemans, J. & Vandesompele, J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **822**, 261–72 (2012).
- [159] Sachs, L. & Hedderich, J. ROC-Analyse. In *Angewandte Statistik : Methodensammlung mit R*, chap. 4.5.1, 136–137 (SPRINGER, 2006).
- [160] Robin, X. *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC bioinformatics* **12**, 77 (2011).
- [161] Mamtani, M. R. *et al.* A simple method to combine multiple molecular biomarkers for dichotomous diagnostic classification. *BMC bioinformatics* **7**, 442 (2006).
- [162] Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289 – 300 (1995).
- [163] DiGiovanni, F. A. *et al.* Concurrent dual allergen exposure and its effects on airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mice. *Disease models & mechanisms* **2**, 275–282 (2009).
- [164] Grünig, G. *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 2261–2263 (1998).
- [165] Leigh, R. *et al.* Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **27**, 526–535 (2002).
- [166] Song, J. *et al.* Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive Diseases and Sciences* **57**, 897–904 (2012).
- [167] Zhu, H. T. *et al.* Identification of suitable reference genes for qRT-PCR analysis of circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Molecular Biotechnology* **50**, 49–56 (2012).
- [168] Sutherland, M. A. *et al.* Acute stress affects the physiology and behavior of allergic mice. *Physiology and Behavior* **98**, 281–287 (2009).
- [169] Garbacki, N. *et al.* MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PloS one* **6**, e16509 (2011).
- [170] Yamamoto, M. *et al.* Decreased miR-192 expression in peripheral blood of asthmatic individuals undergoing an allergen inhalation challenge. *BMC genomics* **13**, 655 (2012).
- [171] Brain, O. *et al.* The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity* **39**, 521–36 (2013).
- [172] Li, X. *et al.* Ovalbumin-induced experimental allergic asthma is Toll-like receptor 2 dependent. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* **35**, e15–20 (2014).
- [173] Liu, C.-F., Drocourt, D., Puzo, G., Wang, J.-Y. & Riviere, M. Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/4 co-activation. *PloS one* **8**, e75983 (2013).
- [174] Duan, W. *et al.* Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* **126**, 1284–93.e10 (2010).

- [175] Kabesch, M. *et al.* Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *The Journal of allergy and clinical immunology* **111**, 813–7 (2003).
- [176] Weidinger, S. *et al.* Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **35**, 866–72 (2005).
- [177] Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 547–9 (1993).
- [178] Ciprandi, G., Cuppari, C. & Salpietro, C. Serum IL-23: a surrogate biomarker for asthma? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **42**, 1416–7; author reply 1418 (2012).
- [179] Peng, J., Yang, X. O., Chang, S. H., Yang, J. & Dong, C. IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation. *Cell research* **20**, 62–71 (2010).
- [180] Li, Y. *et al.* Silencing IL-23 expression by a small hairpin RNA protects against asthma in mice. *Experimental & molecular medicine* **43**, 197–204 (2011).
- [181] Mauviel, A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods in molecular medicine* **117**, 69–80 (2005).
- [182] Stumm, C. L. *et al.* Lung Remodeling in a Mouse Model of Asthma Involves a Balance between TGF- β 1 and BMP-7. *PloS one* **9**, e95959 (2014).
- [183] Min, S. *et al.* TGF- β -associated miR-27a inhibits dendritic cell-mediated differentiation of Th1 and Th17 cells by TAB3, p38 MAPK, MAP2K4 and MAP2K7. *Genes and immunity* **13**, 621–31 (2012).
- [184] Xie, N. *et al.* miR-27a Regulates Inflammatory Response of Macrophages by Targeting IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **193**, 327–334 (2014).
- [185] Liu, W. *et al.* Cell-specific activation profile of extracellular signal-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinases in asthmatic airways. *The Journal of allergy and clinical immunology* **121**, 893–902.e2 (2008).
- [186] Alam, R. & Gorska, M. M. Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **41**, 149–59 (2011).
- [187] Liu, W. *et al.* Establishment of extracellular signal-regulated kinase 1/2 bistability and sustained activation through Sprouty 2 and its relevance for epithelial function. *Molecular and cellular biology* **30**, 1783–99 (2010).
- [188] Goplen, N. *et al.* ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 1934–45 (2012).
- [189] Yamashita, M. *et al.* T cell antigen receptor-mediated activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway controls interleukin 4 receptor function and type-2 helper T cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1024–9 (1999).
- [190] Cheng, Z. *et al.* MiR-320a is downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *Journal of clinical immunology* **33**, 567–76 (2013).
- [191] Hirst, S. J., Walker, T. R. & Chilvers, E. R. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. *The European respiratory journal* **16**, 159–77 (2000).
- [192] Singer, C. A., Salinthon, S., Baker, K. J. & Gerthoffer, W. T. Synthesis of immune modulators by smooth muscles. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26**, 646–55 (2004).
- [193] Kuhn, A. R. *et al.* MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **42**, 506–13 (2010).

- [194] Alder, J. K. *et al.* Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 5645–52 (2008).
- [195] Deshpande, D. A., Walseth, T. F., Panettieri, R. A. & Kannan, M. S. CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca²⁺ signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 452–4 (2003).
- [196] Jude, J. A. *et al.* miR-140-3p regulation of TNF- α -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **303**, L460–8 (2012).
- [197] Dunn, S. *et al.* Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. *Blood* **83**, 2469–2479 (1994).
- [198] Euchenhofer, C. In Murine 3T3 Fibroblasts, Different Second Messenger Pathways Resulting in the Induction of NO Synthase II (iNOS) Converge in the Activation of Transcription Factor NF-kappaB. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6039–6044 (1996).
- [199] Collart, M. A., Baeuerle, P. & Vassalli, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Molecular and cellular biology* **10**, 1498–506 (1990).
- [200] Sancéau, J., Kaisho, T., Hirano, T. & Wietzerbin, J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *The Journal of biological chemistry* **270**, 27920–31 (1995).
- [201] Xu, Y. *et al.* MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4. *FEBS letters* **588**, 1692–8 (2014).
- [202] Yamada, K. M. & Araki, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of cell science* **114**, 2375–82 (2001).
- [203] Kwak, Y.-G. *et al.* Involvement of PTEN in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1083–92 (2003).
- [204] Ma, J. *et al.* NF-kappaB-dependent microRNA-425 upregulation promotes gastric cancer cell growth by targeting PTEN upon IL-1 β induction. *Molecular cancer* **13**, 40 (2014).
- [205] Najam, F. I., Giasuddin, A. S. & Shembesh, A. H. Tumour necrosis factors in childhood asthma. *Indian journal of pediatrics* **68**, 217–22 (2001).
- [206] Cembrzynska-Nowak, M., Szklarz, E., Inglot, A. D. & Teodorczyk-Injeyan, J. A. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *The American review of respiratory disease* **147**, 291–5 (1993).
- [207] Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Chensue, S. W., Widmer, M. & Kunkel, S. L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **154**, 5411–7 (1995).
- [208] Scheurich, P., Thoma, B., Ucer, U. & Pfizenmaier, K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **138**, 1786–90 (1987).
- [209] Catal, F. *et al.* A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma. *Allergologia et immunopathologia* (2014).
- [210] Zhang, J. *et al.* NF-kappaB-modulated miR-130a targets TNF-alpha in cervical cancer cells. *Journal of translational medicine* **12**, 155 (2014).
- [211] Moschos, S. A. *et al.* Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC genomics* **8**, 240 (2007).

-
- [212] Fry, R. C. *et al.* Air toxics and epigenetic effects: Ozone altered microRNAs in the sputum of human subjects. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **306**, L1129–1137 (2014).
- [213] Dorhoi, A. *et al.* MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *The Journal of clinical investigation* (2013).
- [214] Johnnidis, J. B. *et al.* Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* **451**, 1125–9 (2008).
- [215] Cittelly, D. M. *et al.* Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. *Molecular cancer* **9**, 317 (2010).
- [216] Sun, C.-Y. *et al.* miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis* **34**, 426–35 (2013).
- [217] Nakano, T. *et al.* Lower levels of hsa-mir-15a, which decreases VEGFA, in the CD4+ T cells of pediatric patients with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **132**, 1224–1227.e12 (2013).
- [218] Lee, C.-T., Risom, T. & Strauss, W. M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA and cell biology* **26**, 209–218 (2007).

Danksagung

Allen voran möchte ich Dr. med. Katrin Milger danken. Durch ihre professionelle Mitbetreuung konnte ich das Projekt zielstrebig und zu meiner tiefsten Zufriedenheit abschließen. Von einer soliden, guten Einarbeitung in die angewandten Methoden, über praktische Unterstützung und gute Ratschläge bis hin zur kritischen Durchsicht meiner Dissertationsschrift war sie stets hilfsbereit, geduldig, motivierend und trug wesentlich zum erfolgreichen Abschluss des Projekts bei.

Mein herzlichster Dank geht an Prof. Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann und ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen, welches mir ermöglichte unter ihrer Supervision als Doktorand im Comprehensive Pneumology Center München tätig zu sein. Ihre eingebrachte fachliche Kompetenz, konstruktive Kritik und gründliches Korrekturlesen waren mir eine große Hilfe.

Ebenfalls danken möchte ich dem ganzen Team am Comprehensive Pneumology Center München mit Marc Kästle, Nora Krahl, Petra Nathan, Rabea Imker, Raphaël Prunghaud und Sabine Bartel für Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen, gute Zusammenarbeit im Team und praktische Unterstützung insbesondere mit den Versuchstieren.

Danke sagen will ich außerdem Philipp Shah für das mathematische Mitdenken bei der statistischen Auswertung sowie Dr. phil. Anne-Katharina Harr für die sprachliche Korrektur der Dissertation.

Überdies bin ich meinen Eltern Johannes und Brigitte Götschke sehr dankbar für ihre Unterstützung jeglicher Art. Nur so war es für mich möglich das Medizinstudium in München zu beginnen und diese Doktorarbeit zu schreiben.

Abschließend danke ich meiner Ehefrau Melanie Götschke, die mir inhaltlich mit Rat und konstruktiver Kritik zur Hilfe stand sowie mich motivierte und unterstützte die Promotion anzugehen und abzuschließen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Beschreibung eines potentiellen microRNA-basierten Biomarkers für
allergisches Asthma*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 18. Januar 2018

Jeremias Götschke, Doktorand