

Aus der AG Experimentelle Pneumologie (Sprecher: Prof. Dr. Michael Kabesch, Hannover)

# Forschungs-Highlights 2011

Michael Kabesch, Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie

Die AG Experimentelle Pneumologie der GPP gewinnt weiter an Dynamik und neue Mitglieder. Wie bei der AG-Sitzung im Rahmen des hervorragenden GPP-Kongresses in Graz beschlossen, haben wir unter den Mitgliedern der GPP eine Befragung durchgeführt, um neue Mitglieder für die AG zu werben. Dadurch ist der Kreis aktiver Mitglieder nun auf 34 angewachsen. Darüber hinaus wurden 68 weitere GPP Mitglieder gewonnen, die sich für die Arbeit der AG interessieren und nun den neuen Newsletter der AG erhalten. Die Vernetzung der Forschungsgruppen nimmt weiter zu und hat mittlerweile zu mehreren Projekten und – besonders erfreulich – zu mehreren gemeinsamen Publikationen geführt. An der Gründung des Deutschen Lungenzentrums waren mit den Forschungsgruppen von Marcus Mall (Heidelberg), Gesine Hansen und Michael Kabesch (Hannover) sowie Matthias Kopp (Lübeck) mehrere Mitglieder der AG Experimentelle Pneumologie federführend beteiligt. Um diese Interaktion und den Austausch von Ideen weiter zu fördern, wird 2012 ein Forschungstreffen der Pädiatrischen Pneumologie auf Amrum stattfinden, das zusammen mit Karl Paul organisiert wird. Es lohnt sich auch heuer wieder, einen Blick in die Arbeiten der AGs zu werfen. Auch im abgelaufenen Jahr können Mit-

glieder der AG auf einige Highlights aus den Grundlagenforschungsgruppen verweisen. Im Folgenden finden Sie eine kurze und keineswegs vollständige Auswahl der Forschungs-Highlights 2011 aus der AG.

Die AG wird im Hauptprogramm des GPP-Kongresses in Köln 2012 wieder eine spezielle Postersession mit aktuellen Grundlagenarbeiten junger Forscher präsentieren; dort kann man exzellente neue Arbeiten sehen und diskutieren. Wir freuen uns auf zahlreiche Besucher bei den Postern und Vorträgen!

## Schwerpunkt pulmonales Wachstum, Inflammation und CF

Die **Arbeitsgruppe von Wolfgang Bernhard in Tübingen** adressiert den Lipidmetabolismus von Lunge und Leber, den Cholinmangel bei Frühgeborenen sowie die gestörte Lipidhomöostase bei Mukoviszidose (CF). Versuche zur Regulation der Surfactantzusammensetzung zeigten, dass der natürliche Nahrungsbestandteil Myristinsäure via Lipoproteine und Lipofibroblasten spezifisch in der Lunge akkumuliert. Durch Substratkompetition wird die klassische Surfactantkomponente Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin („DPPC“) erniedrigt und stattdessen teilweise Palmitoyl-Myristoyl-Phosphatidylcholin (PMPC) gebildet. Entge-

gen klassischer Paradigmen zeigten Ratten mit einem DPPC-armen, PMPC-reichen („lipid-invertierten“) Surfactant normale Atmung und unverändertes Wachstum [1]. PMPC moduliert spezifisch die Funktion und Differenzierung von Alveolarmakrophagen. Die Surfactantmenge hingegen wird endo-/parakrin reguliert, ebenso wie die Expression der Surfactantproteine und ihre Konzentration im Surfactant. In diesem Kontext wird als Therapieoption bei bronchopulmonaler Dysplasie rekombinanter humaner Keratinozytenwachstumsfaktor (rhKGF, Palifermin®) untersucht. Selbst bei hyperoxisch vorgeschädigten unreifen Lungen zeigte rhKGF eine deutliche Steigerung der Surfactantmenge ohne den Glukokortikoid-typischen Wachstumsstillstand, Arretierung der Pneumozytenproliferation und Gewebskatabolismus [2].

Die **Arbeitsgruppe von Dominik Hartl in Tübingen** beschäftigte sich 2011 sowohl mit der Rolle von Chitinasen und Chitinase-ähnlichen Proteinen bei CF und Asthma als auch mit der funktionellen Bedeutung dieser Proteine in vitro. Obwohl Menschen kein Chitin produzieren, sind sowohl enzymatisch-aktive Chitinasen als auch Chitinase-ähnliche Proteine im Genom des Menschen angelegt und in Körperflüssigkeiten (z.B. Serum,

Sputum, BAL) auf Proteinebene nachweisbar. Die Funktion von Chitinasen oder Chitinase-ähnlichen Proteinen beim Menschen ist jedoch bislang kaum verstanden. In Vorarbeiten mit der Arbeitsgruppe von Jack Elias, New Haven, konnte bereits gezeigt werden, dass das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40/BRP-39 bei inflammatorischen Vorgängen in der Lunge von aktivierten M2-Makrophagen und Granulozyten freigesetzt wird und durch eine Modulation von Apoptose den pulmonalen Gewebsumbau mitbeeinflusst. Aktuelle Studien von **Aki Hector** charakterisierten nun zum ersten Mal das Expressionsmuster des Chitinase-ähnlichen Proteins YKL-40/BRP-39 bei CF-Patienten und Mäusen mit einer CF-ähnlichen Lungenerkrankung [3]. Genetische Analysen identifizierten SNPs, welche die Serumspiegel von YKL-40 bei CF-Patienten regulieren.

**Michael Kormann** beschäftigt sich mit mRNA als „Shuttle“ für therapeutische Transkripte, um Erkrankungen, die durch unzureichend exprimierte oder defekte Proteine verursacht werden, durch Verabreichung des funktionell aktiven Proteins oder seiner genetisch codierten Vorläufer zu beeinflussen. Humane SP-B-Defizienz ist eine erbliche Erkrankung, die bei Neugeborenen bereits im ersten Lebensjahr zu Atemstill-

stand und Tod führt. Die zweimalige Applikation von intratracheal versprühter, modifizierter SP-B mRNA führte in einem Mausmodell jedoch zu ausreichender SP-B-Expression in der Mauslunge, schützte die Mäuse vor Atemstillstand und sicherte eine gesunde Lungenhistologie über den Behandlungszeitraum von vier Wochen [4]. Diese Studie zeigt das Potenzial der Transkripttherapie für die Behandlung von vererbten Erkrankungen der Lunge, für die bis jetzt keine anderen Therapieverfahren zur Verfügung stehen. In Folgestudien wird der Einsatz der Transkripttherapie bei weiteren Lungenerkrankungen wie CF und Asthma untersucht.

Die **Arbeitsgruppe von Marcus Mall in Heidelberg** hat in der präklinischen CF-Forschung hochauflösende CT-Messungen zum Monitoring des spontanen Verlaufs der CF-ähnlichen Lungenerkrankung in der  $\beta$ ENaC-überexprimierenden Maus etabliert [5]. Diese Methode wird in Zukunft u. a. erlauben, die Wirkung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung der CF, aber auch anderer Lungenerkrankungen in präklinischen Modellen in vivo zu untersuchen. In einer Kooperation mit der AG von Dominik Hartl wurde in diesem Modell für die CF-Lungenerkrankung auch die Rolle eines Chitinase-like Proteins bei CF analysiert [3]. In der translationalen CF-Forschung wurde mit Hilfe elektro-physiologischer Messungen und Rektumschleimhautbiopsien von CF-Patienten mit einem breiten Spektrum an CF-Genotypen eine neue pharmakologische Strategie identifiziert, mit deren Hilfe die Restfunktion von CFTR-Mutanten verstärkt

werden kann [6]. Durch Aktivierung von basolateralen Kalium-Kanälen mit dem Wirkstoff 1-EBIO konnte die Triebkraft für CFTR-vermittelte Chloridsekretion gesteigert werden. Dieser Mechanismus könnte bei CF-Patienten mit CFTR-vermittelter Restfunktion therapeutisch genutzt werden. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen erstmals, dass die pharmakologische Modulation von mutierten CFTR-Chloridkanälen in Rektumschleimhautbiopsien funktionell nachgewiesen werden kann. Diese Messungen könnten somit in Zukunft auch helfen, zu untersuchen, ob CF-Patienten mit seltenen CFTR-Mutationen auf sog. CFTR-Verstärker oder Korrektoren ansprechen, die sich derzeit in der klinischen Prüfung befinden.

Die **Arbeitsgruppe von Nicolas Regamey am Inselspital in Bern** beschäftigt sich mit Atemwegsinfektionen bei CF-Patienten, da diese eine wesentliche Rolle in der pulmonalen Morbidität spielen. Während die Signifikanz von bakteriellen Infektionen bei CF gut bekannt ist, ist die pathogenetische Rolle von Viren bei CF-Patienten unklar. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass mehr als 40 Prozent aller pulmonalen Exazerbationen und ca. die Hälfte aller Hospitalisierungen von CF-Patienten durch respiratorische Viren, vor allem Rhinoviren (RV) verursacht werden. Um mögliche zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe primäre Atemwegsepithelzellkulturen von CF-Patienten etabliert und in vitro mit respiratorischen Viren infiziert. **Eli-sabeth Kieninger** aus der AG konnte zeigen, dass das CF-

Atemwegsepithel im Vergleich zum gesunden Atemwegsepithel auf RV-Infektion mit einer abgeschwächten Entzündungsantwort und erhöhtem Zelltod nach viraler Infektion reagiert [7]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei CF die RV-Replikation im Vergleich zu gesunden Zellen deutlich erhöht und mit einer verminderten Produktion von antiviralen Mediatoren, insbesondere von Typ-I( $\beta$ )- und -III( $\lambda$ )-Interferonen (IFN), assoziiert ist. Exogene Zugabe von IFN konnte diesen Defekt korrigieren und die RV-Replikation deutlich senken [unpublizierte Daten]. Die In-vitro-Daten konnten in vivo bei bronchoalveolären Lavagen von Kindern mit CF reproduziert werden. Ob dieser Defekt in der Virus-Kontrolle CF-spezifisch ist, ist bisher unbekannt. In vitro durchgeführte CFTR-knock-down-Experimente [unpublizierte Daten] und Daten von Asthma und COPD suggerieren, dass eher das Milieu der chronischen Entzündung in den Atemwegen für die schlechte Virus-Kontrolle verantwortlich ist.

### Schwerpunkt Asthma und Allergie

Die **Arbeitsgruppe von Philippe Stock an der Charité in Berlin** beschäftigt sich mit den immunologischen Grundlagen allergischer Erkrankungen und hier besonders mit der Rolle von NKT-Zellen an der Pathophysiologie von Allergie und Asthma. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte erstmals im Mausmodell gezeigt werden, dass die Antagonisierung von NKT-Zellen die Entwicklung allergischer Atemwegserkrankungen verhindern kann [8]. Hieraus ergeben sich möglicherweise neuartige Präven-

tions- oder Therapiekonzepte für den Menschen. Außerdem untersucht die Arbeitsgruppe immunologische Toleranz und regulatorische T-Zellen sowie deren pharmakologische Beeinflussung. In einer weiteren Arbeit [9] wurde dargestellt, dass der Applikationsweg von Kortikosteroiden (lokal versus systemisch) darüber entscheidet, ob eine immunologische Toleranz durch Steroide gehemmt wird oder nicht. Diese Untersuchungen könnten helfen, die kontrovers diskutierten Effekte von Kortikosteroiden auf regulatorische T-Zellen zu verstehen.

Die **Arbeitsgruppe von Anna Dittrich an der medizinischen Hochschule Hannover** konnte in einem Mausmodell einer Th1-polarisierten Atemwegs-entzündung zu zeigen, dass die erleichterte Sensibilisierung gegen Zweitantigene im Rahmen einer Th1-polarisierten Atemwegs-entzündung, wie sie z. B. nach viralen Th1-polarisierten Atemwegs-entzündungen klinisch zu beobachten ist, auf die Wirkung von Th17 zurückzuführen ist. Weiterhin erleichtert eine Th17-polarisierte Atemwegs-entzündung die Zweitensibilisierung ebenfalls. Dabei ist die Th17-polarisierte Atemwegs-entzündung durch ein neutrophiles und monozytär-lymphozytäres Infiltrat und eine schwere Atemwegshyperreagibilität gekennzeichnet. Schließlich unterscheiden sich die im Rahmen einer Th17-polarisierten Atemwegs-entzündung nachweisbaren IL-17- oder IFN-gamma-produzierenden Zellen stark hinsichtlich ihres Gedächtnisphänotyps, was darauf hinweisen könnte, dass sie unterschiedliche Reifungsprozesse durchlaufen [10].

In der **Arbeitsgruppe von Gesine Hansen an der Medizinischen Hochschule Hannover** wurde in den vergangenen Jahren eine neue diagnostische Methode entwickelt, mit der Zellen lebend auf Mikrofluidik-Chips gebunden werden und mit einer unlimitierten Anzahl an fluoreszierenden Markern über mehrere Monate schrittweise genau analysiert werden können, wie dies bei der Basophilen-Charakterisierung angewandt wurde [11]. Sowohl die hohe Anzahl der messbaren Parameter an sehr kleinen Zellzahlen sowie das schrittweise Vorgehen stellen einen großen Vorteil gegenüber der FACS Analyse dar. Mit Hilfe eines neu entwickelten „Switch-Antikörpers“ kann die Restfluoreszenz der gemessenen Marker nach der Messung unmittelbar ausgeschaltet und so das Verfahren der Analyse erheblich beschleunigt werden. Beim bundesweiten Wettbewerb „Gründungsoffensive Biotechnologie (GO-Bio)“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung wurde diese neu entwickelte Methode „Chipzytometrie“ zur Förderung ausgewählt, wodurch Christian Hennig die Möglichkeit erhielt, die aktuelle Technologie in Richtung einer kommerziellen Anwendung weiterzuentwickeln. Mit Hilfe der hoch sensitiven Chipzytometrie wurde nun von der AG in Zellen der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit von Patienten die Expression von Foxp3 in alveolären Makrophagen nachgewiesen [unpublizierte Daten]. Umfangreiche funktionelle Untersuchungen in Tiermodellen unterstützen eine Rolle von Foxp3 für die Differenzierung, Proliferation und immunologische Funktion von Makrophagen und eröffnen die Möglichkeit, dass Foxp3 nicht

nur für die regulatorischen T-Zellen von Bedeutung ist.

Die Arbeitsgruppe von **Bianca Schaub (Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München)** hat im vergangenen Jahr in mehreren Studien die funktionelle Auswirkung von Genveränderungen in Asthma-Kandidatengen im Nabelschnurblut untersucht. Zum einen wurde gezeigt, dass ORMDL3- und GSDMA-Polymorphismen einen Einfluss auf die frühe Immunantwort und auf die Sekretion von IL-17, einem inflammatorischen Zytokin, haben [12]. Zum anderen wurde demonstriert, dass TLR2-Polymorphismen abhängig von mütterlicher Atopie eine wichtige Rolle für die Modulation von regulatorischen T-Zellen spielen [13]. Einige der TLR-SNPs zeigten eine Assoziation mit allergischen Erkrankungen bis zum Alter von drei Jahren, was im Verlauf der Kindheit weiter untersucht wird. Bereits in früheren Studien konnte die AG zeigen, dass regulatorische T-Zellen in der frühen Immunentwicklung entscheidend für die Entwicklung allergischer Erkrankungen sind. Beide Arbeiten zu den Genveränderungen sind in Kooperation mit der AG von Michael Kabesch durchgeführt worden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Urs Frey wurde der Einfluss von Umweltverschmutzung während der Schwangerschaft auf die frühe Immunregulation (ebenfalls im Nabelschnurblut) untersucht [14]. Diese Studien zeigen, dass exogene und endogene Einflüsse auf die frühe Immunentwicklung für verschiedene zelluläre Funktionen wie die T-Zell-Immunregulation während der Immunmaturation ganz entscheidend sind.

*Prof. Dr. med. Michael Kabesch  
Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie  
Carl-Neuberg-Str. 1  
30625 Hannover  
E-Mail: Kabesch.Michael@mh-hannover.de*

### Literatur

- [1] Bernhard W, Raith M, Pynn CJ, Gille C, Stichtenoth G, Stoll D et al. Increased palmitoyl-myristoyl-phosphatidylcholine in neonatal rat surfactant is lung specific and correlates with oral myristic acid supply. *J Appl Physiol.* 2011 Aug; 111 (2): 449–57.
- [2] Gesche J, Fehrenbach H, Koslowski R, Ohler FM, Pynn CJ, Griese M, et al. rhKGF stimulates lung surfactant production in neonatal rats in vivo. *Pediatr Pulmonol.* 2011 Sep; 46 (9): 882–95.
- [3] Hector A, Kormann MS, Mack I, Latzin P, Casaulta C, Kieninger E, et al. The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One.* 2011; 6 (9): e24399.
- [4] Kormann MS, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol.* 2011 Feb; 29 (2): 154–7.
- [5] Wielputz MO, Eichinger M, Zhou Z, Leotta K, Hirtz S, Bartling SH, et al. In vivo monitoring of cystic fibrosis-like lung disease in mice by volumetric computed tomography. *Eur Respir J.* 2011 Nov; 38 (5): 1060–70.
- [6] Roth EK, Hirtz S, Duerr J, Wenning D, Eichler I, Seydewitz HH, et al. The K channel opener 1-EBIO potentiates residual function of mutant CFTR in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e24445.
- [7] Kieninger E, Varelle M, Kopf BS, Blank F, Alves MP, Gisler FM, et al. Lack of an exaggerated inflammatory response upon virus infection in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2011 Jun 30.
- [8] Lombardi V, Stock P, Singh AK, Kerzerho J, Yang W, Sullivan BA, et al. A CD1d-dependent antagonist inhibits the activation of invariant NKT cells and prevents development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol.* 2010 Feb 15; 184 (4): 2107–15.
- [9] Kerzerho J, Wunsch D, Szely N, Meyer HA, Lurz L, Roesel L, et al. *J Immunol.* 2012 in press
- [10] Albrecht M, Chen HC, Preston-Hurlburt P, Ranney P, Hoymann HG, Maxeiner J, et al. T(H)17 cells mediate pulmonary collateral priming. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jul; 128 (1): 168–77 e8.
- [11] Dijkstra D, Hennig C, Witte T, Hansen G. Human SLE basophils do not express MHC-II (comment to Nat Med. 2010 Jun; 16 (6): 701–7). *Nat Med.* 2012 in press.
- [12] Lluis A, Schedel M, Liu J, Illi S, Depner M, von Mutius E, et al. Asthma-associated polymorphisms in 17q21 influence cord blood ORMDL3 and GSDMA gene expression and IL-17 secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jun; 127 (6): 1587–94 e6.
- [13] Liu J, Radler D, Illi S, Klucker E, Turan E, von Mutius E, et al. TLR2 polymorphisms influence neonatal regulatory T cells depending on maternal atopy. *Allergy.* 2011 Aug; 66 (8): 1020–9.
- [14] Latzin P, Frey U, Armann J, Kieninger E, Fuchs O, Roosli M, et al. Exposure to moderate air pollution during late pregnancy and cord blood cytokine secretion in healthy neonates. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23130.