

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MED. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*EINFLUSS DES GENS DMRT1 AUF IMMUNOLOGISCHE MECHANISMEN UND DEN
GESCHLECHTSSPEZIFISCHEN VERLAUF VON ASTHMA IM KINDESALTER*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Stark

2019

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MED. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*EINFLUSS DES GENS DMRT1 AUF IMMUNOLOGISCHE MECHANISMEN UND DEN
GESCHLECHTSSPEZIFISCHEN VERLAUF VON ASTHMA IM KINDESALTER*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Stark

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. univ. Michael Kabesch*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Christian Schulz*

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 21.10.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Asthma – ein wachsendes Problem unserer Zeit.....	7
1.2	Asthma – eine Erkrankung mit vielen Gesichtern	9
1.3	Asthma im Kindesalter – eine Erkrankung der Jungen.....	12
1.4	Genetische Ursachen für Geschlechtsunterschiede bei Asthma	13
1.5	Geschlechtsspezifische <i>DMRT1</i> -Effekte in Makrophagen?.....	15
2	Zielsetzung.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Übersicht zur methodischen Vorgehensweise.....	20
3.2	Induziertes Sputum.....	21
3.3	Phagozytose-Assay.....	26
3.4	Zellkultur.....	28
3.4.1	Kulturbedingungen	28
3.4.2	Plasmid-Generierung und Zell-Transfektion	31
3.4.3	Stimulation der Zellkulturen mit LPS, Der p 1, PHA, Ppg und LpA	33
3.4.4	Stimulation der Zellkulturen mit Geschlechtshormonen	34
3.5	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time qPCR.....	36
3.6	Mikroskopie	42
3.7	Statistische Auswertung	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	<i>DMRT1</i> -Expression in Sputum und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien.....	45
4.2	Kein signifikanter Einfluss von Geschlechtshormonen auf <i>DMRT1</i> -Expression ...	51
4.3	Verringerte <i>DMRT1</i> -Expression nach LPS- und Ppg-Stimulation	53
4.4	<i>MCP-1</i> -Induktion durch LPS und Ppg.....	57

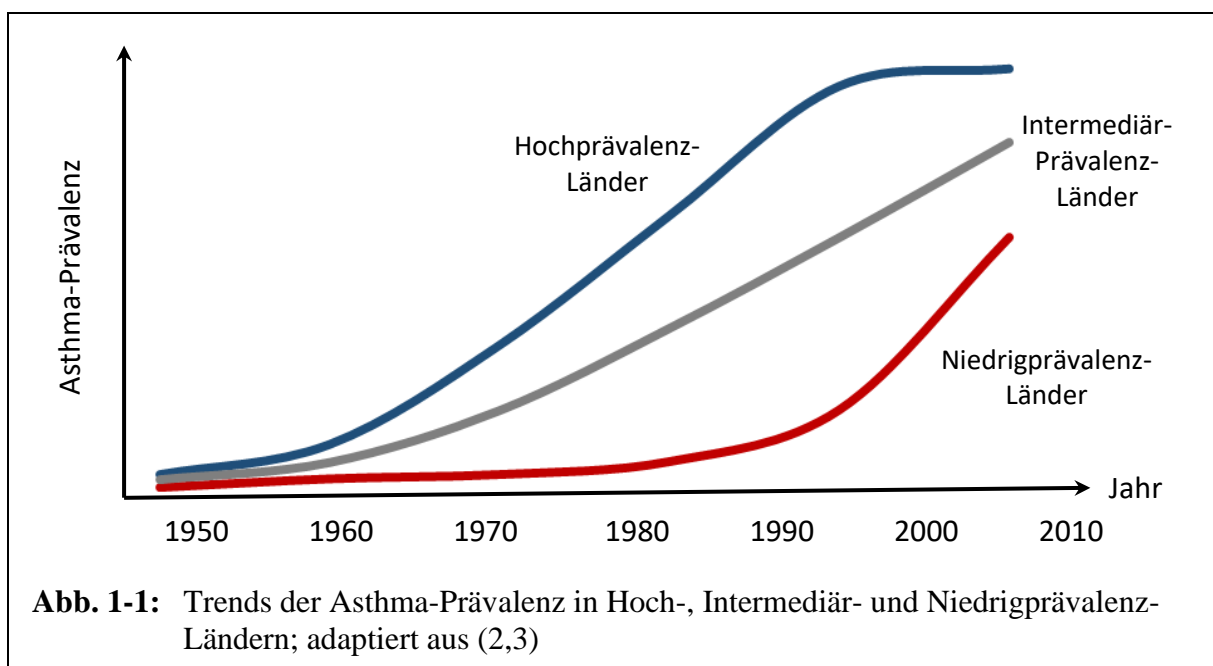
4.5	<i>DMRT1</i> -Überexpression erhöht <i>MCP-I</i> -Expressionsniveau	58
4.6	Lokalisation von tGFP-getagtem <i>DMRT1</i>	59
5	Diskussion.....	60
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
5.2	<i>DMRT1</i> -Expression in Sputum und Makrophagen	61
5.3	Makrophagen-Anteil in Sputum-Zellen	63
5.4	Stimulations- und Überexpressionsexperimente	64
5.4.1	Stimulation mit Geschlechtshormonen	64
5.4.2	Immunstimulation und <i>DMRT1</i> -Expression	65
5.5	Methodische Limitationen und Perspektiven.....	68
5.5.1	Induziertes Sputum	68
5.5.2	Phagozytose-Assay	69
5.5.3	Zellkultur.....	72
5.5.4	Real-time quantitative PCR	73
5.5.5	Zelltransfektion und Mikroskopie.....	76
6	Zusammenfassung und Ausblick	78
7	Darstellung der qPCR-Rohdaten.....	80
8	Abkürzungsverzeichnis.....	86
9	Literaturverzeichnis	89
10	Anhang.....	115
10.1	Danksagung.....	115
10.2	Eidesstattliche Erklärung.....	116

1 Einleitung

1.1 Asthma – ein wachsendes Problem unserer Zeit

Anfallartig pfeifende Atmung, Husten, Brustenge, Atembeschwerden beim Sprechen bis hin zur schweren Atemnot in Ruhe mit Sauerstoffmangel, durch diese Symptome kennzeichnet sich Asthma bronchiale, eine chronische, meist entzündliche Erkrankung der Atemwege. Charakteristisch – für die Diagnose aber nicht zwingend erforderlich – ist zum einen eine variable Verminderung des Atemflusses während der Expiration, welche sich auf atemwegserweiternde Medikamente verbessert, und zum anderen eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems (1).

Im Kindesalter ist Asthma die häufigste chronische Erkrankung (4). Seit mehreren Jahrzehnten steigt die Prävalenz von Asthma weltweit an. Infolge dessen gibt es aktuell über 300 Millionen Betroffene (5). Nachdem die Zahl der Asthmatiker besonders in zahlreichen Industrienationen während der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts auf ein hohes Niveau anstieg, scheint der Prävalenzverlauf in diesen Ländern ein Plateau (vgl. Abb. 1-1) erreicht zu haben (3,6–9). Daten aus der aktuell größten internationalen Studie zu Asthma und Allergien bei Kindern (ISAAC) zeigen, dass sich die Prävalenz von Asthma-Symptomen, wie Husten und pfeifende Atmung, bei Kindern in Hochprävalenzländern wie Großbritannien, Australien oder den USA bis über 25 % bewegt (10).



Wesentlich deutlicher ausgeprägt ist der aktuelle Prävalenzanstieg in bevölkerungsreichen Entwicklungs- und Schwellenländern (vgl. Niedrigprävalenz-Länder in Abb. 1-1), da diese dem Prävalenzverlauf industrialisierter Länder zeitlich verzögert nachzukommen scheinen (2,5,8,11). Beispielsweise erhöhte sich die Zahl der 6- bis 7-jährigen Kinder mit Asthma-Symptomen über die Jahrtausendwende jährlich um 1,14 % im Iran, um 0,69 % in Costa Rica und um 0,67 % in Tunesien (10). Diese ISAAC-Daten zeigen eindrücklich, dass sich die Prognose der WHO aus dem Asthma-Report 2007, welche von einem Anstieg auf über 400 Millionen Asthmatiker bis 2025 ausgeht, wahrscheinlich als zutreffend herausstellen wird (12). Damit stellt Asthma ein schnell wachsendes, globales Problem dar (4,13,14).

Einhergehend mit einer steigenden Prävalenz wächst die durch Asthma verursachte soziale, ökonomische und finanzielle Last (14). Dabei kommt Asthma die Weltgemeinschaft teurer zu stehen als HIV und Tuberkulose zusammen (14,15). Die jährlichen Kosten durch Asthma in Europa wurden nach dem Weißbuch Lunge 2014 auf 33,9 Milliarden Euro geschätzt, wobei der Produktivitätsverlust (z.B. Eltern, die aufgrund erkrankter Kinder nicht arbeiten können) den größten Anteil des volkswirtschaftlichen Schadens darstellt (16). Im Vergleich dazu belief sich die Schätzung 2003 auf 17,7 Milliarden Euro (17). Innerhalb eines Jahrzehnts sind die Kosten in Europa um 91,5 % angestiegen. Die Gründe hierfür liegen nicht allein an der Entwicklung der Asthma-Prävalenz, sondern auch an neuen, teuren Therapiemöglichkeiten wie Antikörpertherapien mit Kosten von weit über 10.000 Euro pro Patient und Jahr (18). Diese Kosten werden bei Asthmatikern durch häufig bestehende Komorbiditäten, wie weiteren Allergien und (Lungen-) Infektionen, aggraviert (19,20). Prävention und effektive Behandlung von Asthma stellen somit auch einen bedeutenden gesellschaftlichen Gewinn dar. Voraussetzung dafür ist es, die Erkrankung und ihre Ursachen besser zu verstehen.

1.2 Asthma – eine Erkrankung mit vielen Gesichtern

Asthma ist eine heterogene Erkrankung, die in verschiedene Phänotypen eingeteilt werden kann (vgl. Abb. 1-2) und durch das gemeinsame Merkmal einer chronischen Atemwegsentzündung gekennzeichnet ist (21–23). Die zwei häufigsten Phänotypen sind das allergische Asthma und das nichtallergische Asthma (24). Im Kindesalter ist das allergische Asthma die vorherrschende Form (25,26).

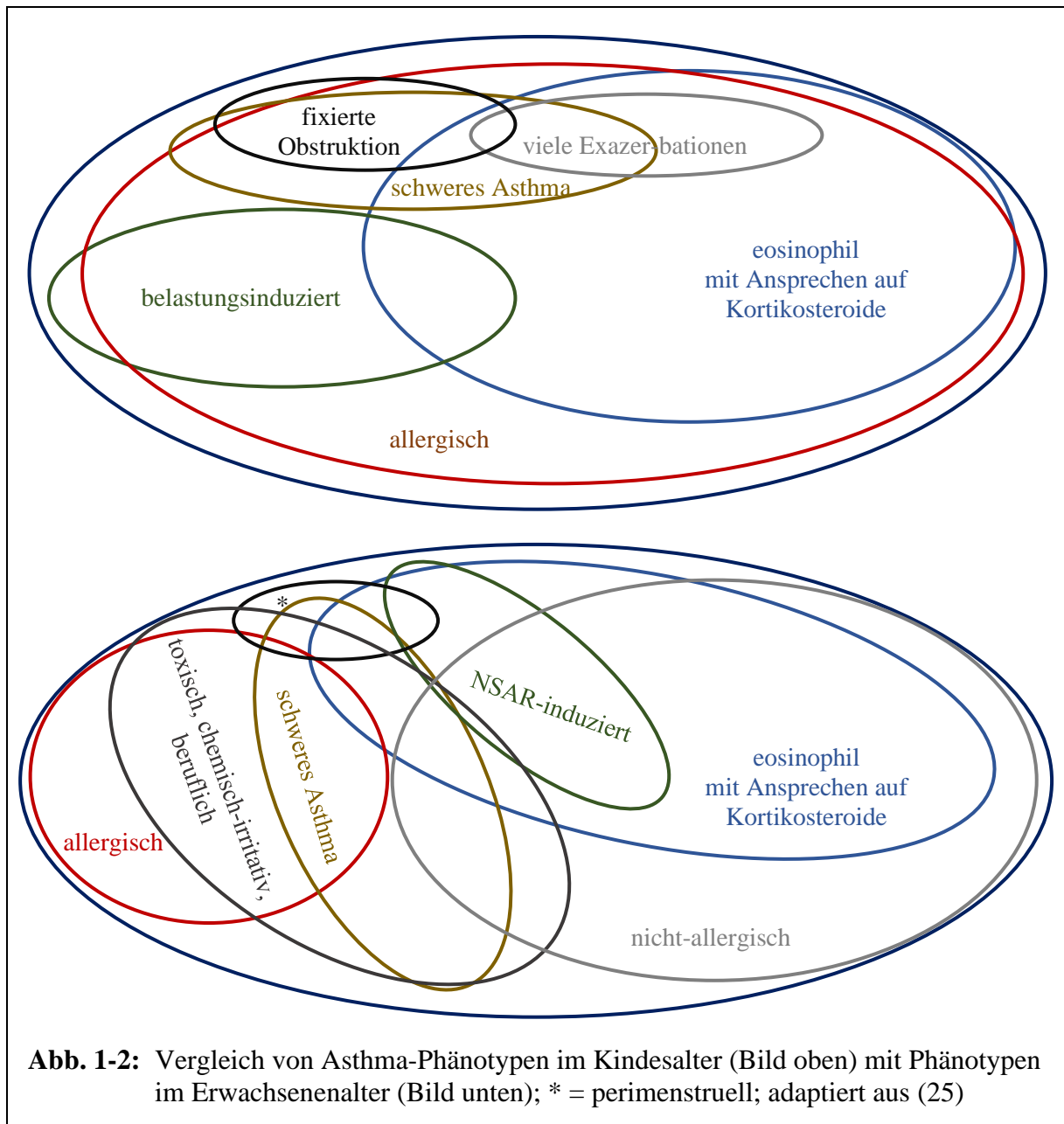


Abb. 1-2: Vergleich von Asthma-Phänotypen im Kindesalter (Bild oben) mit Phänotypen im Erwachsenenalter (Bild unten); * = perimenstruell; adaptiert aus (25)

Herangezogen für die phänotypische Unterteilung von Asthma werden oft klinische Faktoren (häufige Exazerbationen, ausgeprägte oder fixierte Atemwegsobstruktion, Therapieresistenz, Alter), auslösenden Faktoren (allergisch, bei Anstrengung, NSAR-induziert, perimenstruell)

sowie inflammatorische Merkmale (eosinophil, neutrophil, paucigranulozytär). Eine zunehmende Wichtigkeit wird molekularen und genetischen Markern zugeschrieben (27). Trotz beachtlicher Fortschritte, die bereits auf der Suche nach den Ursachen für Asthma erzielt wurden, bleiben Fragen der Asthmapathogenese, wie zum Beispiel nach den ursächlichen Mechanismen des Prävalenzverlaufs (vgl. Abb. 1-1), bislang unbeantwortet. Sicher ist jedoch, dass erstens Umweltfaktoren, zweitens genetische Faktoren und drittens die Interaktion dieser Faktoren die Entstehung und den Verlauf von Asthma maßgeblich bestimmen (28).

Zum Ersten lässt die steigende Prävalenz in zunehmend urbanisierten Entwicklungs- und Schwellenländern vermuten, dass bestimmte Umwelteinflüsse (z.B. Feinstaub, Ozon, organische Verbrennungsprodukte, flüchtige Verbindungen aus Kunststoffen und diverse Medikamente) die Entstehung von Asthma durch allergisierende und direkte toxische Effekte begünstigen (29,30). Dafür spricht auch, dass in Europa mindestens 20 % aller Asthmaerkrankungen im Kindesalter durch Tabakkonsum im direkten Umfeld des Kindes verursacht werden (31). Weitere Risikofaktoren für Asthma sind Frühgeburtlichkeit, schwere RSV-Infektionen in früher Kindheit, Übergewicht sowie elterliches Asthma. Zu den protektiven Umweltfaktoren, die mit einem verminderten Asthma-Risiko assoziiert sind, gehören eine fruchte-, gemüse- und fischreiche Ernährung sowie das ausschließliche Stillen während der ersten drei Lebensmonate (32,33). Ein weiterer sehr gut untersuchter protektiver Faktor ist ein bäuerliches Umfeld für das Kind (32,34). Bereits 1989 wurde die epidemiologische Beobachtung, dass Kinder aus einem „sauberen“ Umfeld häufiger an Asthma, Allergien und chronisch-entzündlichen Erkrankungen leiden, erstmals als „Hygiene-Hypothese“ festgehalten (35,36).

Zum Zweiten sind mittels genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) Einzelnukleotid-Polymorphismen (eng. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) in bestimmten Genregionen identifiziert worden, die mit dem Auftreten von Asthma oder bestimmten Asthma-Phänotypen assoziiert sind. SNPs sind Varianten (im weiteren Sinne Mutationen) der DNA, die in einem relevanten Anteil der Bevölkerung (über 1 %) vorkommen (37). Die Ergebnisse der bisher umfangreichsten GWA-Studien zu Asthma mit mehr als 25.000 (2010) und mehr als 140.000 (2018) Genproben zeigten Assoziationen von Asthma mit SNPs auf Chromosom 2 (*IL1RL1/IL18R1*), 5 (*IL13*), 6 (*HLA-DQ*), 9 (*IL33*), 12 (*STAT6*), 15 (*SMAD3*), 17 (*ORMDL3/GSDMB*) und 22 (*IL2RB*) (38,39). SNPs in der 5q31-Region, welche die genetische Information für Interleukine und Rezeptoren des Immunsystems enthält, sind mit erhöhten Serum-IgE-Spiegeln assoziiert und werden daher mit der Entstehung des allergischen

Asthmas und Atopien in Verbindung gebracht (40–43). Besondere Aufmerksamkeit verdienen SNPs im Bereich von *ORMDL3* auf Chromosom 17q21. Diese waren ausschließlich mit Asthma im Kindesalter (Krankheitsbeginn vor dem 16. Lebensjahr) assoziiert (44). Im Erwachsenenalter fällt hingegen eine Assoziation mit HLA-DQ auf, was darauf hinweist, dass sich die Genetik von Asthma im Kindes- und Erwachsenenalter unterscheidet. Allerdings kann die Diagnose Asthma nicht allein einer Genregion zugeschrieben werden. Das Erkrankungsrisiko für Asthma wird im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen (wie Mukoviszidose, Hämophilie oder Hämochromatose) nicht durch ein einzelnes Gen, sondern durch die Kombination verschiedener Gene bestimmt. Asthma ist somit eine polygenetische Erkrankung, deren Vorhersage und phänotypische Einteilung sich lediglich anhand des Genotyps schwierig gestaltet. Das liegt darüber hinaus an der Tatsache, dass ein einziger Genotyp unterschiedliche Effekte auslösen kann.

Dies führt zum dritten Punkt, der Interaktion von Umwelt und Genetik. Es wäre ein Irrtum zu glauben, dass die identifizierten SNPs bei jedem Individuum zur gleichen Wirkung führen. So gibt es SNPs die primär nur eine geringe oder überhaupt keine Assoziation mit Asthma aufweisen, kommt aber ein bestimmter Umweltfaktor hinzu, lässt sich eine (veränderte) Assoziation nachweisen. Beispielsweise sind Effekte der 17q21-Region auf das Asthma-Risiko bei Kindern in Abhängigkeit davon unterschiedlich stark ausgeprägt, ob die Kinder auf dem Bauernhof leben (45). Ein weiteres Beispiel liegt in der 5q31-Region, welche für den CD14-Rezeptor kodiert, der ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist. Der Schutz vor Asthma und anderen allergischen Erkrankungen durch den Konsum von Rohmilch ist größer, wenn ein bestimmter *CD14*-Genotyp vorliegt (46,47). Einen weiteren Umweltfaktor, für den eine solche Beziehung bekannt ist, stellt oxidativer Stress dar, beispielsweise ausgelöst durch Tabakrauch oder Abgase. *GST*-Gene auf Chromosom 22q11 kodieren für wichtige Enzyme (Glutathion-S-Transferasen) zur antioxidativen Verteidigung. Bei der Untersuchung möglicher Assoziationen zu Asthma fiel eine sehr große Heterogenität zwischen verschiedenen Studien auf (48,49). Dies ist wahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass genetische Effekte nur in bestimmten Subpopulationen zum Tragen kommen, wie zum Beispiel bei Kindern, die Passivrauch exponiert sind (50). Interessanterweise können Umwelteinflüsse nicht nur zu variablen Effekten präexistierender Genvarianten, sondern auch zu direkten Veränderungen des Erbguts führen. So sind beispielsweise Kinder, deren Großmüttern während der Schwangerschaft geraucht haben, einem erhöhten Asthma-Risiko ausgesetzt (51,52). Dieser (epigenetische) Effekt über mehrere Generationen besteht interessanterweise nur auf der

maternalen Seite, ein rauchender Großvater vererbt kein messbar erhöhtes Asthma-Risiko an seine Enkel. Diese Beobachtung unterstreicht nicht nur die enorme Wichtigkeit einer Raucherentwöhnung vor der Schwangerschaft, sondern ist auch ein Hinweis auf einen geschlechtsspezifischen Transfer genetischer Informationen und ein zusätzlicher Erklärungsansatz für eine steigende Asthma-Prävalenz (52,53).

1.3 Asthma im Kindesalter – eine Erkrankung der Jungen

Trotz der komplexen Heterogenität von Asthma hinsichtlich Genetik, Umwelteinflüssen und Krankheitsausprägung ist in epidemiologischen Daten weltweit ein konsistentes Phänomen auffallend: Vor der Pubertät leiden Jungen häufiger als Mädchen an Asthma, wohingegen sich das Prävalenzverhältnis im Erwachsenenalter umkehrt (vgl. Abb. 1-3), dann sind Frauen wesentlich häufiger von Asthma betroffen als Männer (54). Die genauen Ursachen für diese Beobachtung sind bisher unklar (55,56).

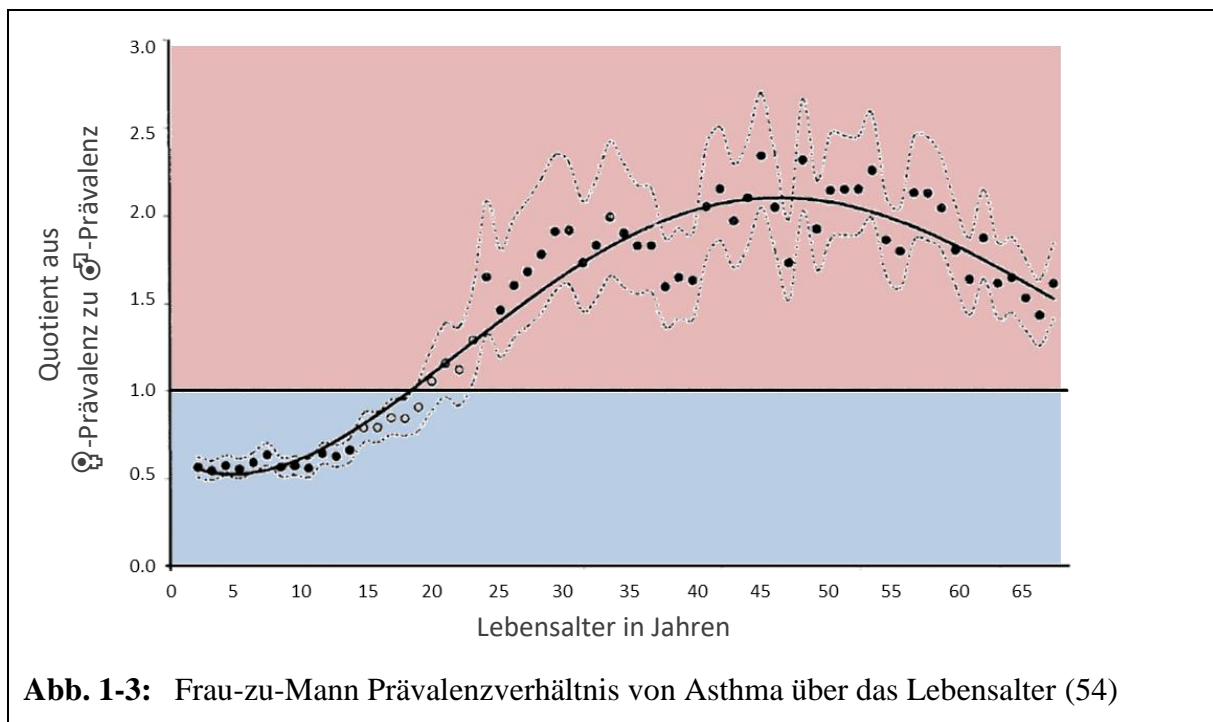


Abb. 1-3: Frau-zu-Mann Prävalenzverhältnis von Asthma über das Lebensalter (54)

Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich Prävalenz und Therapieansprechrates sind in unterschiedlich starker Ausprägung bei weiteren allergischen Erkrankungen ebenfalls zu beobachten (57–60). Als mögliche Erklärungen für dieses Phänomen (vgl. Abb. 1-3) werden hormonelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern, geschlechtsspezifische Einflüsse der Umwelt oder geschlechtsspezifische Reaktion des Körpers auf Umwelteinflüsse diskutiert (55). Ein Erkenntnisgewinn über die Ursachen geschlechtsspezifischer Unterschiede bei Asthma und

Allergien birgt die Chance in Zukunft gezieltere (geschlechtsspezifische) Therapiemaßnahmen sowie diagnostische Werkzeuge zu entwickeln und die Versorgung von vielen Patienten substantziell zu verbessern.

1.4 Genetische Ursachen für Geschlechtsunterschiede bei Asthma

Tatsächlich sind Hinweise auf mögliche Ursachen für die geschlechtsspezifischen Asthma-Effekte im Genom zu finden (61). Am naheliegendsten wäre die Suche nach verantwortlichen Genen für geschlechtsspezifische Effekte in gonosomalen Genregionen, dem X- und Y-Chromosom. Erstaunlicherweise finden sich auf den Gonosomen keine Genregionen, für die sich eine signifikante Interaktion von Geschlecht und Asthma-Risiko nachweisen lässt. Das Manhattan-Diagramm in Abb. 1-4 zeigt die Auswertung einer genomweiten Analyse der Interaktion von Geschlecht und Asthma-Risiko von 1361 Kindern, davon 703 Asthmatiker. In der Grafik repräsentiert ein Punkt jeweils einen SNP. Je höher ein Punkt im Diagramm lokalisiert ist, desto signifikanter ist das geschlechtsspezifische Asthma-Risiko des korrespondierenden SNPs.

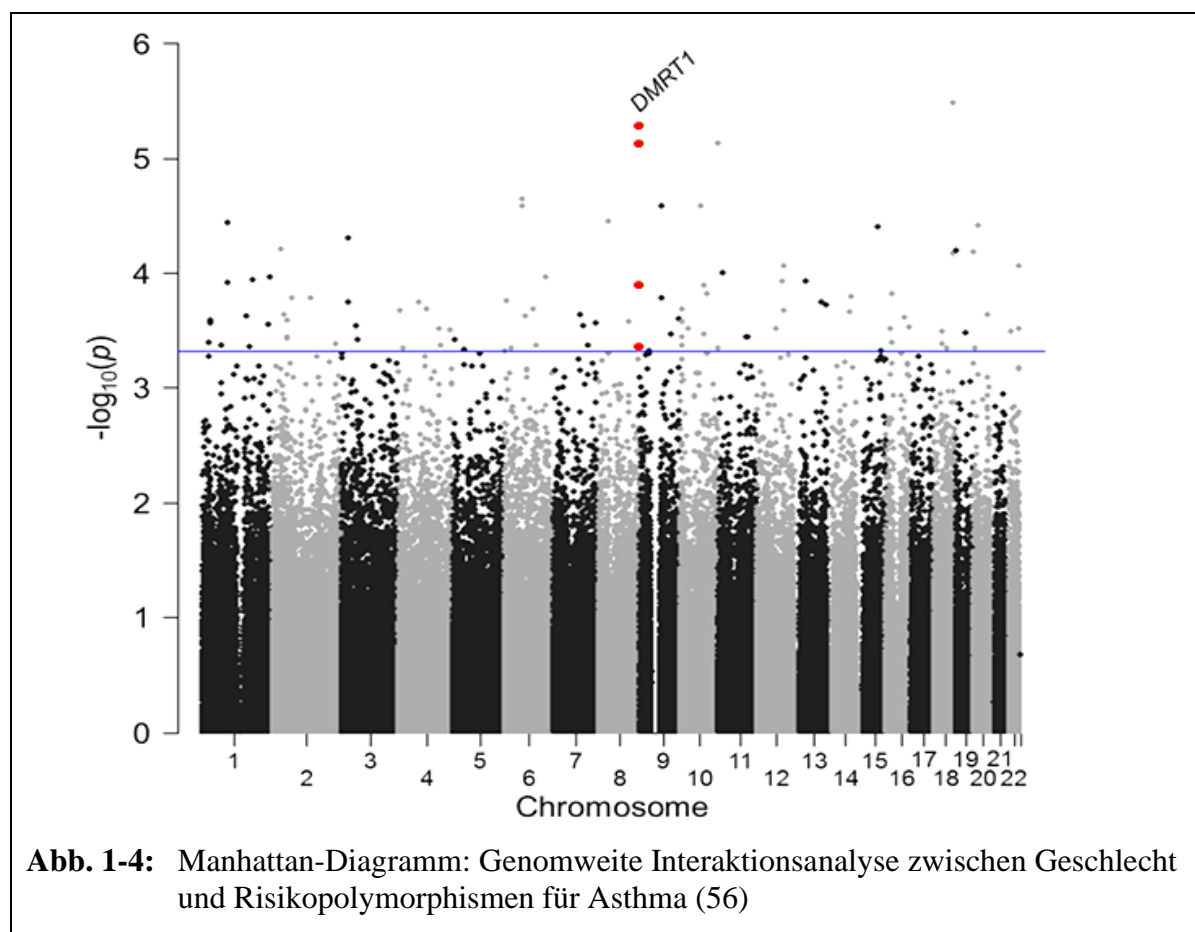


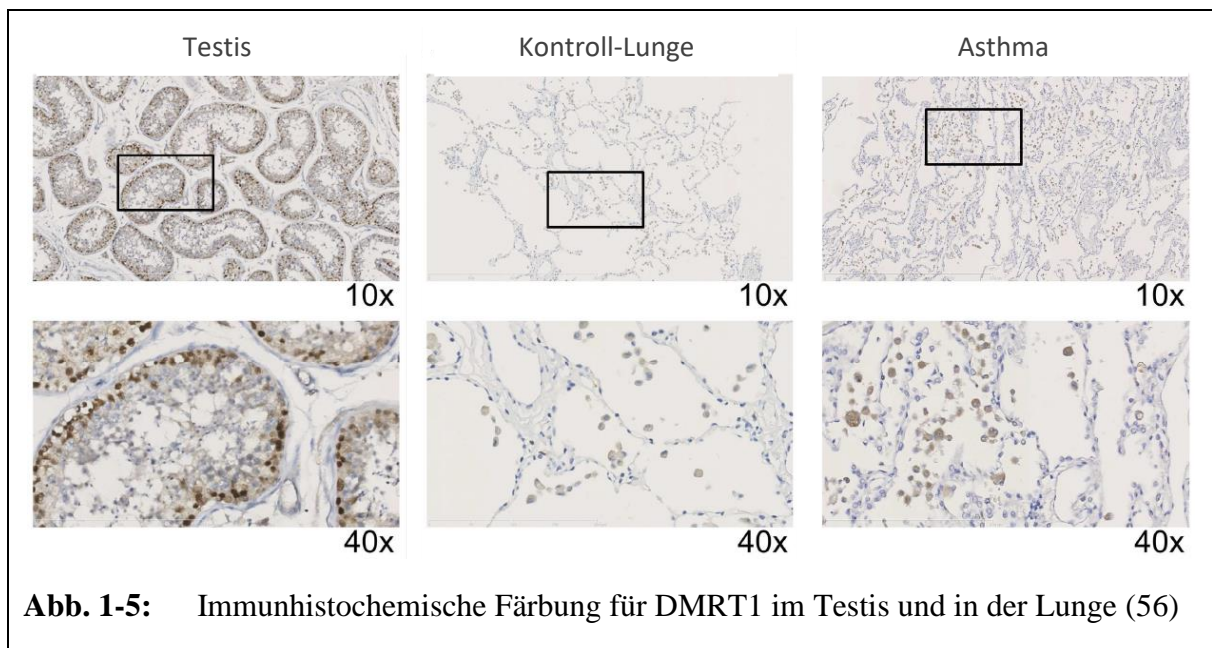
Abb. 1-4: Manhattan-Diagramm: Genomweite Interaktionsanalyse zwischen Geschlecht und Risikopolymorphismen für Asthma (56)

Die hundert signifikantesten SNPs über der horizontal verlaufenden Linie in Abb. 1-4 wurden auf ihre mögliche funktionelle Relevanz hinsichtlich eines geschlechtsspezifischen Effekts hin untersucht. Dabei wurden die SNPs im Promotor-Bereich des Gens *DMRT1* (Doublesex and mab-3 related transkriptionfactor 1, Chromosom 9p24.3) als besonders relevant identifiziert (56). Diese Ergebnisse wurden in einer Reihe von unabhängigen Populationen europaweit repliziert.

Die Genregion von *DMRT1* stellt einen hoch konservierten Bereich der DNA dar. Seit mehreren Hundert Millionen Jahren steuern DMRT-Proteine die sexuelle Differenzierung von Vielzellern (62,63). Evolutionär weit vom Menschen entfernte Lebewesen besitzen das Gen *DMRT1* mit vergleichsweise hoher Übereinstimmung hinsichtlich des genetischen Codes und der Peptidsequenz. Damit gehört *DMRT1* zu den Genen, die im Verlauf der Evolution in ihrer Basenabfolge und möglicherweise auch in ihrer Funktion weitestgehend unverändert geblieben sind. Hoch konservierte Genregionen haben gemeinsam, dass sie für elementare Zellfunktionen wie Energiebereitstellung, Zytoskelett-Aufbau, DNA-Reparatur- und Verpackung, RNA-Prozessierung sowie für Fortpflanzung eine überlebensnotwendige Rolle spielen (64). Eine funktionelle Relevanz des Gens *DMRT1* wurde für Menschen bisher nur im Hodengewebe beschrieben, wo DMRT1 als Transkriptionsfaktor mit mindestens 7.593 DNA-Bindungsstellen interagieren kann (65). Hier ist *DMRT1* an der geschlechtsspezifischen Zelldifferenzierung und phänotypischen Ausprägung des männlichen Geschlechts beteiligt (62,66,67). Das 9p-Deletionssyndrom veranschaulicht diese Genfunktion eindrücklich. Fehlt das Gen *DMRT1*, so kommt es trotz Vorlage eines XY-Karyotypen zur Ausbildung eines weiblichen Phänotyps (68). Im Jahr 2015 wurde dieses als „sex-reversal“ beschriebene Phänomen bei einer phänotypisch weiblichen Patientin mit XY-Karyotyp festgestellt, welche eine erstmals beschriebene R111G-Punktmutation im Gen *DMRT1* aufwies (65).

Diese Erkenntnisse machen *DMRT1* zwar zu einem glaubhaften Kandidaten für einen geschlechtsspezifischen Effekt, können aber seine Rolle bei Asthma nicht erklären. Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass abhängig von einem in Abb. 1-4 markierten *DMRT1*-SNP (rs3812523) signifikant weniger MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1) in peripheren Blut Monozyten (PBMCs) translatiert wird (56). MCP-1 ist ein in die Rekrutierung von T-Zellen involviertes Chemokin, das von Alveolarmakrophagen zur Vermittlung von Entzündungsreaktionen und bei Hyperreagibilität ausgeschüttet wird (69–77). Dies deutet auf eine immunologisch funktionelle Relevanz von *DMRT1* hin, nicht nur im Hodengewebe. Völlig neu ist auch die Erkenntnis, dass *DMRT1* bei pathologischen Prozessen

der Lunge exprimiert wird (vgl. Abb. 1-5). Liegt eine Lungenerkrankung wie die Idiopathische Lungenfibrose, COPD oder Asthma vor, so sind DMRT1-Proteine immunhistochemisch in Alveolarmakrophagen nachweisbar, wohingegen dies in einer gesunden Lunge nicht der Fall ist (56). Interessanterweise scheint der Transkriptionsfaktor DMRT1 in der Lunge von Asthmapatienten vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert und nicht im Zellkern wie bei Sertoli-Zellen links in Abb. 1-5.



Es stellt sich die Frage, wie *DMRT1* in Alveolarmakrophagen mögliche immunologische Funktionen ausübt und damit geschlechtsspezifische Effekte bei Asthma verursacht.

1.5 Geschlechtsspezifische *DMRT1*-Effekte in Makrophagen?

Makrophagen der Lunge spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Regulierung pulmonaler Entzündungsreaktionen (78–80). Als zahlenmäßig vorherrschende Immunzellen der Lunge (ca. 70 %) vermitteln Makrophagen Entzündungsreaktionen bei Asthma durch Sekretion immunmodulatorischer Zytokine und Orchestrierung der Neutrophilenmigration in das Gewebe (81–85). Die Immunantwort auf inhalierte Antigene startet mit der Antigenaufnahme durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen (86). Es folgt die Migration dieser Zellen in lymphatisches Gewebe, um dort die aufgenommenen Antigene zu präsentieren und eine T-Zell-Antwort zu initiieren. Eine inadäquate Immunantwort durch primär harmlose Antigene bei Asthma kann mit einer Fehlregulierung von Makrophagen in Zusammenhang gebracht werden (87–90). Bei der

Betrachtung von Makrophagen der Lunge gilt es zu berücksichtigen, dass diese Zellpopulation eine hohe Diversität aufweist. So können Makrophagen der Lunge zum einen nach ihrer Lokalisation in Alveolarmakrophagen und interstitielle Makrophagen unterschieden werden (87). Zum anderen kann mittels Biomarker die Polarisation von Makrophagen in diverse Subgruppen gemessen werden. Weit verbreitet ist die Unterscheidung in klassisch aktivierte M1- und alternativ aktivierte M2a/b/c-Makrophagen (91). Einige Autoren beschreiben Alveolarmakrophagen als eine heterogene Zellgruppe, deren phänotypische Ausprägung als Kontinuum anzusehen ist (88). Darüber hinaus unterscheiden sich Alveolarmakrophagen aufgrund ihrer Herkunft in gewebsresidente (eng. tissue-resident alveolar macrophages, TR-AMs) und von Monozyten abstammende migrierende MDMs, welche während inflammatorischer Prozesse aus der Blutbahn rekrutiert werden (92). Trotz dieser bisher nur unvollständig verstandenen Diversität deutet zunehmend mehr Literatur auf eine zentrale Rolle von Makrophagen für geschlechtsspezifische Asthmaeffekte hin, wie sie in Abschnitt 1.2 beschrieben sind (56,93–95). Jungen entwickeln im Kindesalter häufiger Asthma als Mädchen und *DMRT1* scheint in diesen Prozess involviert zu sein. Dies führt zu zwei zentralen Überlegungen:

Zum einen stellt sich die Frage, ob bereits bekannte gonadale Zusammenhänge zwischen *DMRT1* und dem Steroidhormonmetabolismus auch in Makrophagen eine Rolle spielen können. So führen unterschiedliche Geschlechtshormonkonzentrationen zu einer veränderten gonadalen Expression von *DMRT1* (96–98). Andersherum kann *DMRT1* die Konzentration von Geschlechtshormonen verändern, indem es das Enzym Aromatase (CYP19A1) herunterregelt, welches die Umsetzung von Androgenen in Estradiol katalysiert (99–103). Effekte auf das Immunsystem erscheinen plausibel, da für Östrogene meist proinflammatorische und für Androgene meist antiinflammatorische Wirkungen auf Makrophagen bekannt sind (104–107). Daher ist es wenig verwunderlich, dass Übergewicht sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen die Entwicklung von Asthma begünstigt (108–110). Denn Übergewichtige produzieren aufgrund der in Adipozyten exprimierten Aromatase mehr Östrogene (111,112). Bei postmenopausalen Frauen unter östrogenhaltiger Hormonersatztherapie wurde ebenso eine erhöhte Rate an Asthmasymptomen gezeigt (113). Eine mögliche Beteiligung von *DMRT1* an pathologischen Immunreaktionen könnte also auch durch Veränderung der zellulären Antwort von Immunzellen auf Steroidhormone vermittelt sein (114). Diese Art der Immunmodulation durch Hormone extrazellulären Ursprungs, die in ihrer Zielzelle direkt oder nach intrazellulärer enzymatischer Umwandlung ihre Wirkung entfalten, ist interessanterweise besonders für

Makrophagen gut beschrieben (93,106,114–118) und wurde als relevanter Mechanismus für geschlechtsspezifische Effekte bei Asthma explizit in diesem Zelltyp vorgestellt (94) .

Zum anderen stellt sich die Frage, ob es Umweltfaktoren gibt, welche die beobachteten *DMRT1*-Effekte in Kindern ermöglichen bzw. begünstigen. Bei der Betrachtung von Umwelteinflüssen auf die Immunfunktion ist besonders im Kindesalter die Differenzierung von angeborenem und dem sich hinzu entwickelnden erworbenen Immunsystem von Relevanz (119). Während das erworbene Immunsystem seine Stärken durch die antigen-spezifische Antikörperbildung und durch den Erhalt von Gedächtniszellen ausübt, arbeitet das angeborene Immunsystem durch die Identifizierung von Antigenen anhand bekannter Muster (120). Mittels sogenannter Mustererkennungsrezeptoren (eng. Pattern Recognition Receptor, PRRs) werden Pathogene anhand von definierten molekularen Mustern (eng. pathogen associated molecular patterns, PAMPs) erkannt, die sich über Generationen hinweg als Bedrohung herausgestellt hatten. Ein wichtiger Umweltfaktor, der mit der Exposition gegenüber den Prototypen einer solchen Bedrohung einhergeht, ist das bäuerliche Umfeld im frühen Kindesalter. Es ist bekannt, dass Kinder, die auf dem Bauernhof aufwachsen, im Vergleich zur Allgemeinheit einem größeren Keimspektrum und damit auch höheren Konzentrationen an Lipopolysaccharid, kurz LPS, exponiert sind (121,122). Diese Kinder haben langfristig eine geringere Wahrscheinlichkeit, Asthma und Allergien zu entwickeln (122–125).

LPS ist ein in der Umwelt ubiquitär vorhandener Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien und ein wichtiges Allergie-Adjuvans (126,127). Im Körper bindet LPS an das LPS-Bindungsprotein (LBP) und aktiviert in Monozyten und Makrophagen über zellmembranständige PRPs – in diesem Fall bestehend aus CD14/TLR4/MD-2 – die Produktion von proinflammatorischer Zytokinen, Stickstoffmonoxid und Eicosanoiden (128). Bei der Pathogenese von Asthma spielt es eine bemerkenswert paradoxe Rolle (129–131). Auf der einen Seite ist seit den 1980er Jahren bekannt und inzwischen vielfach belegt, dass LPS klinisch zu Giemen und allergischen Asthma-Exazerbationen führt (132–134). Auf der anderen Seite werden LPS protektive Effekte gegenüber Asthma zugeschrieben, da Kinder vom Bauernhof weniger wahrscheinlich Asthma entwickeln (135).

Ob geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Asthmapathogenese durch LPS oder andere allergisierende Substanzen verstärkt oder verringert werden, ist nicht bekannt. Ein Einfluss ist allerdings zu vermuten, da geschlechtsspezifische Reaktionen nach LPS-Stimulation in Mäusen beschrieben wurden (136). Für diese Vermutung spricht auch die geschlechtsspezifische

Expression von Estrogenrezeptoren auf Stimulation mit LPS in von humanen Monozyten abstammende Makrophagen (eng. monocyte derived macrophages, MDMs) (118). Dies lässt die Hypothese zu, dass sich die Sensitivität für bestimmte Geschlechtshormone nach Allergenexposition geschlechtsspezifisch verändern kann und damit auch die Stärke der korrespondierenden Immunantwort. Ebenso stellt sich die Frage, ob *DMRT1* an dem Mechanismus beteiligt ist, durch welchen ein Bauernhof bzw. eine Exposition von LPS in der frühen Kindheit vor Asthma schützt.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potenzielle immunologische Funktionen des Gens *DMRT1* in Makrophagen zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund neuer Forschungsergebnisse, welche auf eine geschlechtsspezifische Rolle von *DMRT1* bei Asthma im Kindesalter und immunologische Funktionen in Alveolarmakrophagen hinwiesen.

Um dieses Ziel zu erreichen, lag der Fokus dieser Arbeit auf den in Abschnitt 1.5 vorgestellten Überlegungen zur *DMRT1*-Interaktion mit Geschlechtshormonen und Allergenen. Darüber hinaus wurden das in Kapitel 1.4 präsentierte Ergebnis der immunhistochemisch nachgewiesenen Expression von *DMRT1*-Proteinen im Zytoplasma von Alveolarmakrophagen mittels Überexpressionsexperimenten mikroskopisch genauer untersucht und Effekte der Überexpression gemessen. Konkret wurden folgende zentrale Hypothesen getestet:

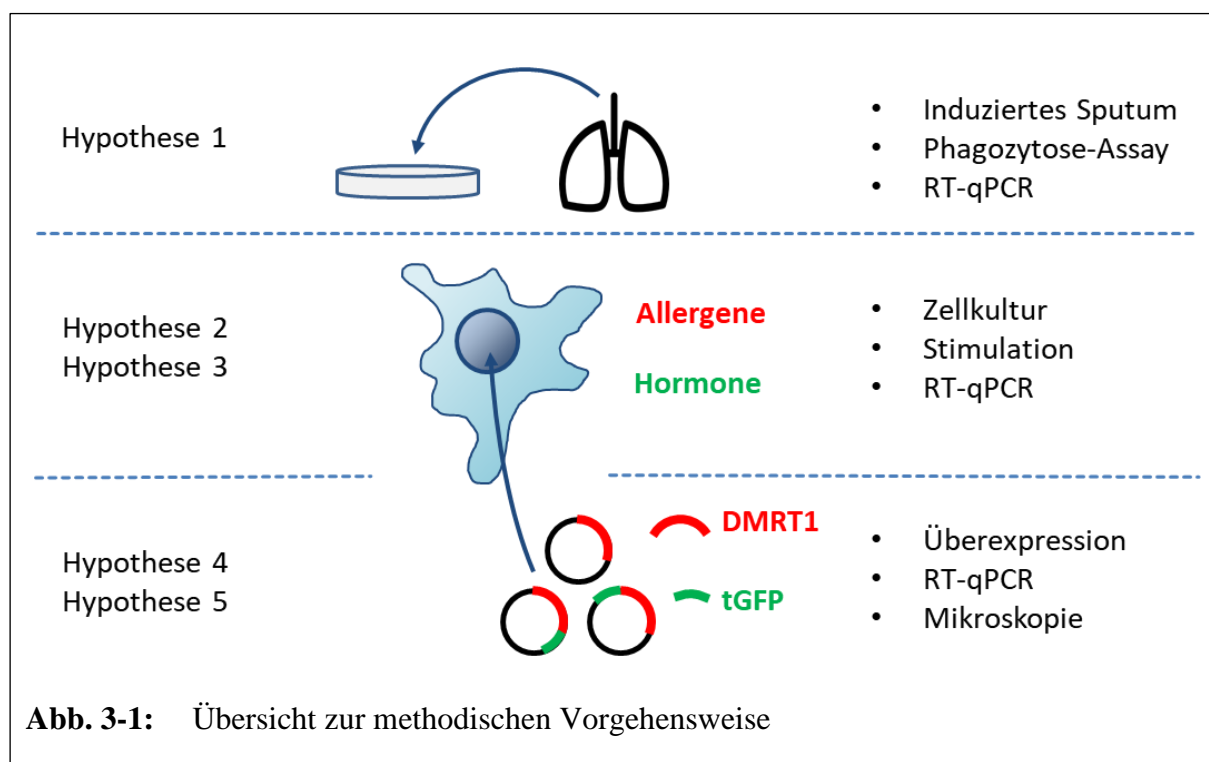
1. *DMRT1*-mRNA ist in induziertem Sputum von Menschen nachweisbar.
2. Die Expression von *DMRT1* in humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien verändert sich auf Stimulation des Immunsystems.
3. Die Expression von *DMRT1* in humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien verändert sich auf Stimulation mit Geschlechtshormonen.
4. Die Überexpression von *DMRT1* verändert die Expression von *MCP-1* und von *CYP19A1* in humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien.
5. Nach Überexpression des Transkriptionsfaktors *DMRT1* in humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien ist eine Lokalisation im Zytoplasma nach Stimulation nachweisbar.

Die Aufklärung möglicher immunologischer Funktionen von *DMRT1* in Makrophagen soll langfristig einen Schritt in Richtung Präzisionsmedizin darstellen und weitere Entwicklungen im Hinblick auf dringend benötigte neue Therapieansätze, verlässliche prognostische Marker und eine geschlechtsspezifische Immuntherapie anstoßen. Darüber hinaus soll diese Arbeit Aspekte der geschlechtsspezifischen Asthmapathogenese beleuchten und sich daraus neu ergebende Forschungsfragen erörtern. Funktionelle Zusammenhänge in Makrophagen zwischen dem Gen *DMRT1* und möglichen immunologischen Funktionen wurden bisher nicht untersucht. Die durchgeführten Experimente führten zu einem besseren Verständnis der Rolle von *DMRT1* in Makrophagen.

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht zur methodischen Vorgehensweise

Um die erste in der Zielsetzung genannte Hypothese zu testen, wurde Sputum von humanen Probanden induziert, das Phagozytose-Verhalten der Zellen bestimmt und auf eine Expression von *DMRT1* mittels RNA-Isolation und anschließender qPCR getestet. Die humanen Monozyten/Makrophagen-Zelllinien THP-1, U937, HL-60 und Mono-Mac-6 (MM6) wurden als Modelle für Alveolarmakrophagen verwendet, um die Hypothesen zwei bis fünf zu prüfen. Für die Überexpressions- und Lokalisationsexperimente zur Hypothese vier und fünf wurden drei *DMRT1*-Vektoren kloniert: Ein *DMRT1*-Vektor ohne Fusionsprotein sowie *DMRT1* n- und t-terminal mit *tGFP* (eng. turbo green fluorescent protein) getagt (vgl. Abb. 3-1). Die Zelllinien wurden für das zweite und dritte Ziel mit Allergenen und Geschlechtshormonen stimuliert.



Es wurde *DMRT1* mittels der generierten Vektoren überexprimiert und anschließend die *DMRT1*- *MCPI*- und *CYP19A1*-Expression auf RNA-Ebene gemessen. Lasermikroskopische Betrachtungen der mit tGFP versehenen DMRT1-Proteine erfolgten vor und nach Stimulation mit LPS, mit dem Ziel eine vermutete Translokation von DMRT1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma nach Stimulation nachweisen zu können.

3.2 Induziertes Sputum

Zur Induktion des Sputums wurde ein von Pizzichini im Jahr 1996 vorgestelltes, gut untersuchtes Protokoll verwendet, welches als reproduzierbar und valide beschrieben wurde (137). Das vielfach verwendete Protokoll gilt auch bei Kindern als sicher und unbedenklich (138–140). Angewandte Abwandlungen des ursprünglich von Pizzichini publizierten Protokolls werden im Verlauf erklärt und begründet.

Induziert wurde Sputum bei zehn freiwilligen Probanden (60 % weiblich, 40 % männlich) ohne Hinweis auf eine Infektion der Atemwege. Details zu den einzelnen Probanden sind Tabelle 3-1 zu entnehmen. „Asthma“ wurde hier definiert als behandlungsbedürftiges Asthma bronchiale mindestens der Stufe 1 nach der Global Initiative for Asthma-Leitlinie 2016.

Nr.	Geschlecht	Alter	Asthma	Allergien	Raucher/in
1	männlich	24	nein	nein	nein
2	weiblich	29	nein	nein	ja
3	weiblich	24	ja	nein	nein
4	männlich	24	ja	nein	nein
5	weiblich	24	nein	nein	nein
6	männlich	44	nein	nein	ehemalig
7	weiblich	25	nein	nein	nein
8	männlich	34	nein	nein	nein
9	weiblich	19	nein	nein	ja
10	weiblich	35	nein	nein	nein

Tabelle 3-1: Liste der Sputum-Spender

Mittels der nachfolgenden Arbeitsschritte wurde das Sputum induziert:

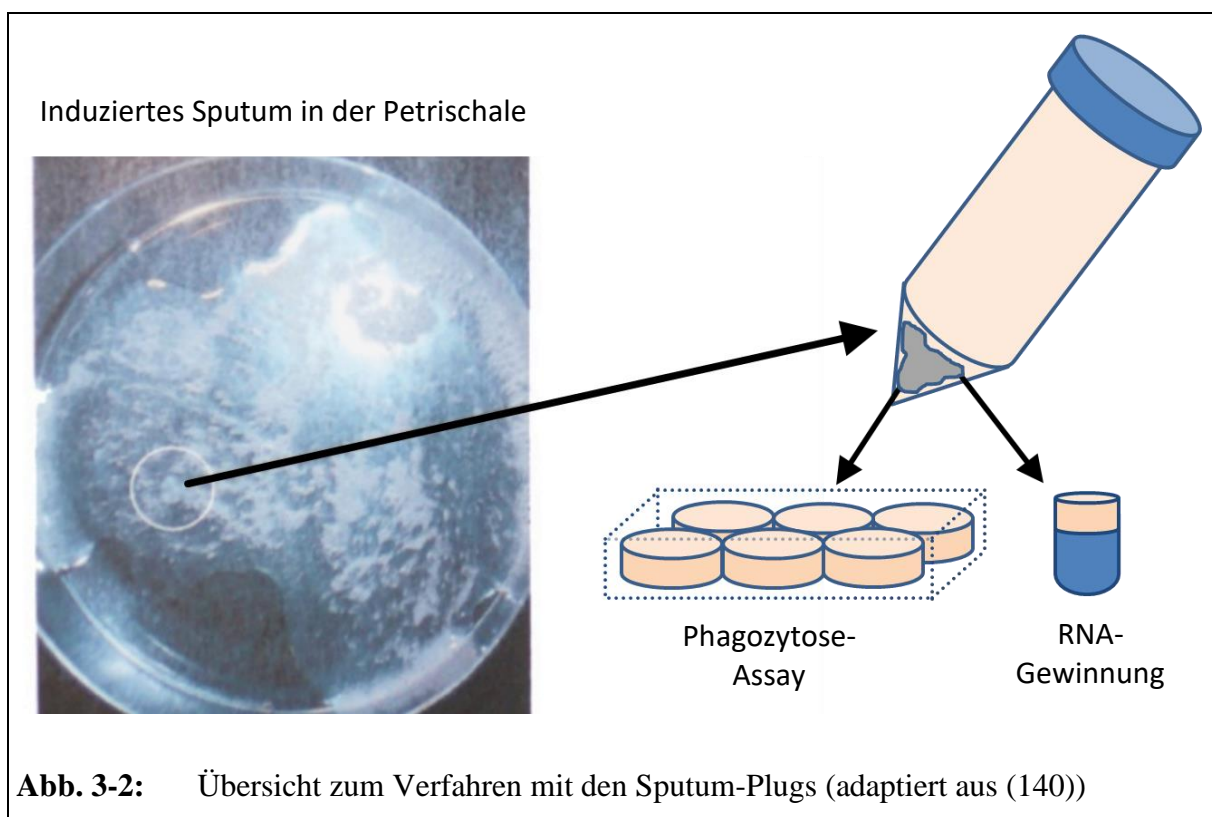
1. Messung und Dokumentation des Peak-Flows mittels Peak-Flow-Meter.
 - a. Es erfolgten drei Messungen, der beste Werte wurde notiert.
 - b. Die Messung erfolgte im Stehen nach vollständiger Inspiration durch eine kräftige und schnellstmögliche Expiration (141).
 - c. Falls bei einem Messwert ein Ergebnis kleiner 80 % des alters-, geschlechts- und größenabhängigen Referenzwertes (z.B. 420 L/min für eine 20-jährige, 160 cm große Frau) auftrat, wurde kein Sputum induziert.

- d. Falls bei späteren Messungen ein Abfall des Peak-Flows um mehr als 10 % des Ausgangswertes erfolgte, wurde die Untersuchung abgebrochen.
2. Inhalation von 400 µg Salbutamol mit anschließender Wartezeit von 15 Minuten.
 - a. Inhaliert wurden vier Hübe eines Salbutamol-Dosieraerosols mit 100 µg Salbutamol pro Hub.
 - b. Besondere Beachtung wurde der korrekten Durchführung und vorhergehenden Einweisung der Probanden geschenkt (142).
3. Erneute Messung und Dokumentation des Peak-Flows.
4. Inhalation von 3 % steriler Natriumchlorid-Lösung für 7 Minuten mittels eines Ultraschallverneblers. Die Verwendung von hypertoner Kochsalzlösung hat sich in Voruntersuchungen gegenüber der Verwendung von ausschließlich isotonischen Lösungen bewährt (143).
 - a. Während der Inhalation wurde normal weitergeatmet. Aus Sicherheitsgründen sollte keine Hyperventilation angestrebt werden.
 - b. Bei Auftreten von signifikantem Husten oder Beschwerden wie Unwohlsein wurde die Untersuchung abgebrochen.
 - c. Verwendet wurde ein Ultraschallvernebler (Pariboy®) mit einer Ultraschallfrequenz von ca. 1,7 MHz, einer durchschnittlichen Partikelgröße (MMAD, Mass Median Aerodynamic Diameter) von 3,9 µm und einer Verneblungsrate von ca. 0,5 ml/min.
5. Nach der Inhalation erfolgte ein Auswaschen des Mundes mit Leitungswasser, um den Anteil an Plattenepithel aus dem Mund-Nasen-Rachenraum im Sputum zu reduzieren. Gegurgelt werden sollte nicht, da dabei versehentlich Sputum verloren gehen könnte. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Sputum-Donor darauf hingewiesen auf Sprechen zu verzichten.
6. Nun erfolgte durch tiefes Husten die Gewinnung von Sputum, welches in ein 50 ml Falcon-Röhrchen aus Polypropylen gespuckt wurde.
 - a. Das Sputum sollte aus den Atemwegen kommen und nicht aus dem Mundraum. Speichelreste konnten zuvor geschluckt oder ausgespuckt werden, daraufhin wurde der Mundraum erneut mit Wasser gespült.
 - b. Der Husten sollte bereits bei den ersten Versuchen produktiv sein, Sputum hervorbringen und feucht klingen.
 - c. Nach etwa drei Versuchen oder wenn der Klang des Hustens trocken wurde, erfolgte eine erneute Messung des Peak-Flows. Die Untersuchung wurde abgebrochen, wenn der Messwert um mehr als 10 % zum Ausgangswert gefallen war.

7. Anschließend folgte eine Erholungspause von zwei bis vier Minuten.
8. Die Schritte 4. bis 7. wurden nun mit 4 % und 5 % steriler Natriumchlorid-Lösung wiederholt. Das gewonnene Sputum wird in das gleiche Falcon-Röhrchen hinzugegeben. Zwischen den Messungen wird das Sputum im Falcon-Röhrchen auf Eis gelagert.
9. Das Sputum wurde innerhalb einer Stunde zügig weiterverarbeitet, alle weiteren Arbeitsschritte fanden stets auf Eis statt. Die Zentrifugationen wurden in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge durchgeführt.

Das Sputum wurde wie folgt weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte die Selektion von weißlichen Sputum-Plaques in einer Petrischale, da dies gegenüber der Weiterverarbeitung des gesamten Sputums den Anteil von Mukus verringert und somit die Durchführung von Downstream-Experimenten erleichtert (144):

1. Das Gewicht des Sputums wurde ermittelt, indem das Gewicht des Falcon-Röhrchens mit Sputum vom Eigengewicht des Falcon-Röhrchens subtrahiert wurde.
2. Das Sputum wurde in eine Petrischale auf Eis überführt.
3. Mittels einer 1000 ml Eppendorf-Pipette und einer Impföse wurden so viele Sputum-Plugs wie möglich in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Klarer Speichel und zellfreier muköser Schleim verblieb in der Petrischale (vgl. Abb. 3-2)



4. Es wurde die vierfache Menge an frisch gemischtem Sputolysin® (Cat. No. 560000, Millipore) mit destilliertem Wasser im Mischungsverhältnis 1:9 hinzugegeben.
 - a. Das verwendete Sputolysin® bestand aus 10 mg/mL DTT (Dithiothreitol) zur Auflösung der mukösen Sputum-Bestandteile.
 - b. Die Zielkonzentration zur Sputolyse betrug 1 mg/mL DTT
Beispiel: Zu 2 g separiertem Sputum wurden 8 ml DTT-Lösung der Konzentration 1 mg/mL hinzugegeben.
5. Die Sputum-Plugs wurden sofern möglich mit einer 1000 µl-Pipette vorsichtig mehrmals auf und ab pipettiert und für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Nun wurden die Sputum-plugs erneut vorsichtig mehrmals auf und ab pipettiert (dies sollte nach dem Vortexen möglich sein).
6. Anschließend erfolgte die weitere Sputolyse durch Inkubation auf Eis im Kühlraum bei 4 °C mit einem Schüttler mit 200 rpm für 15 Minuten.
7. Nach Inkubation auf dem Schüttler folgte die Zugabe des doppelten Sputumgewichts an auf 4 °C gekühltem PBS in das Falcon-Röhrchen (im Beispiel von Punkt 4b entsprechend 4 ml PBS).
8. Erneutes Vortexen für 15 Sekunden zur Durchmischung des in Sputolysin gelösten Sputums mit dem PBS.
9. Die entstandene Zellsuspension des Sputums wurde mit Hilfe eines sterilen 70 µm Nylon-Filters (Cat. No. CLS431751, Sigma Aldrich) in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und gefiltert. Zuvor wurde der Filter mit einigen Tropfen auf 4 °C gekühlten PBS angefeuchtet, um den Filtrationsvorgang am Anfang zu erleichtern.
10. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit Trypan-Blau-Lösung (Cat. No. 15250061, Thermofisher) im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypan-Blau kann mit vier dissoziierten, geladenen Sulfonsäuregruppen die Zellmembran gesunder Zellen nicht überwinden. Weisen Zellen Störungen der Zellmembranintegrität (z.B. Risse) auf, dringt Trypan-Blau in die Zelle ein und macht diese unter dem Mikroskop als stark beschädigt, nicht mehr viabel beziehungsweise „tot“ kenntlich.
 - a. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl 0,4 % Trypan-Blau-Lösung durch Auf- und Abpipettieren vermischt.
 - b. Eine Neubauer Zählkammer wurde befüllt und die Zellkonzentration und Viabilität quantifiziert und dokumentiert.
11. Während der Auszählung unter dem Mikroskop wurden die restlichen Zellen bei 250 g bei ausgeschalteter Zentrifugengremse für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

12. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit PBS auf eine Zellkonzentration von $0,5 \times 10^6$ / ml eingestellt.
 - a. Dabei wurden zunächst etwa 500 μ l PBS hinzugegeben und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert.
 - b. Erst im Anschluss wurde mit PBS auf das finale Volumen verdünnt, weil sich bei sofortiger Zugabe des gesamten Verdünnungsvolumens das Zell-Pellet gelegentlich nicht vollständig auflösen könnte.
13. Die Zellsuspension wurde unverzüglich mittels Phagozytose-Assay (siehe Kapitel 3.3) weiterverwendet und Aliquots von $0,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml RNAprotect (Cat. No. 76526, QIAGEN) für eine spätere Auswertung mittels qPCR (siehe Kapitel 3.4.2) resuspendiert und bei -80 °C zwischengelagert.
14. Ein Teil der Zellen wurde sofort dem ersten Schritt der RNA-Isolation zugeführt, um RNA-Verluste zu minimieren.

3.3 Phagozytose-Assay

Ein Charakteristikum von Alveolarmakrophagen ist die Phagozytose von inhalierten Partikeln und Pathogenen (145). Um die Fraktion der phagozytierenden Zellen (der Makrophagen) im induzierten Sputum der Probanden 1, 2 und 3 zu quantifizieren, wurden 6×10^5 Sputum-Zellen in 1,2 ml PBS für 10 Minuten bei 4 °C und 250 g bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet anschließend resuspendiert in 1 ml 36 °C warmen Zellkulturmediums bestehend aus RPMI 1640 GlutaMAX Medium (Cat. No. 61870044, ThermoFisher) mit 10 % humanem Serum (cat. no. HSF-HBZ, RMBI). Ein Volumen von 2 ml der Sputum-Zellsuspension mit einer Konzentration von nun 6×10^5 Zellen pro Milliliter wurden in eine 6-Well Platte überführt (Cat. No. 657160, Greiner Bio-One).

Es wurden 2,64 µl einer Suspension von 1 µm im Durchmesser messenden fluoreszierenden Polystyrol-Kugeln in das Well hinzugegeben (Fluoresbrite® YG Microspheres, Cat. No. 17154-10, Polyscience) und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die ursprüngliche Suspension enthält gemäß dem Datenblatt $4,55 \times 10^{10}$ Microspheres pro Milliliter. 1,32 µl enthalten 60×10^6 Microspheres, was pro Milliliter Zellsuspension 100 Micospheres pro Zelle und Well entspricht. Diese Kombination aus Material (Polystyrol)-Größe (1 µm)- und Konzentration (100/Zelle) der Partikel hat sich als wirksam erwiesen, um eine ausreichende Markierung phagozytierender Zellen in der Lunge innerhalb von wenigen Stunden zu erzielen (146). Die Zellen wurden bei 5 % CO₂-Kontentration und 36 °C Temperatur für vier Stunden mit den Microspheres inkubiert.

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die mit Microspheres versehenen Zellen nach der Inkubationszeit mobilisiert und in ein benachbartes Well überführt. Die nicht-adhärenen Sputum-Zellen wurden in das leere Nachbar-Well überführt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die adhärenen Sputum-Zellen wurden mit frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium bedeckt und anschließend analysiert. (vgl. Abb. 3-3). Es erfolgte die Bestimmung und Dokumentation der Zellviabilität mittels Trypan-Blau-Farbstoff sowie die Bestimmung des Anteils an phagozytierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop „Nikon Eclipse TE2000-U“ mit der Software „NIS Elements“ Version 3.22.11. Unter dem Licht einer zugeschalteten Quecksilberdampflampe mit der Hauptemissionslinie bei 436 nm wurden die Microspheres mit einem Exzitationsmaximum von 441 nm angeregt. Durch die Darstellung des emittierten grünen Lichts der Microspheres bei 486 nm (Emissionsmaximum) und durch die mittels Software realisierte anschließende Überlagerung des hellfeldmikroskopischen mit dem

fluoreszenzmikroskopischen Bild konnten die phagozytierenden Zellen identifiziert und deren Anteil im induzierten Sputum beurteilt werden. Als positiv wurden Zellen mit mehr als fünf Microbeads in Projektion auf das Zytoplasma gewertet.

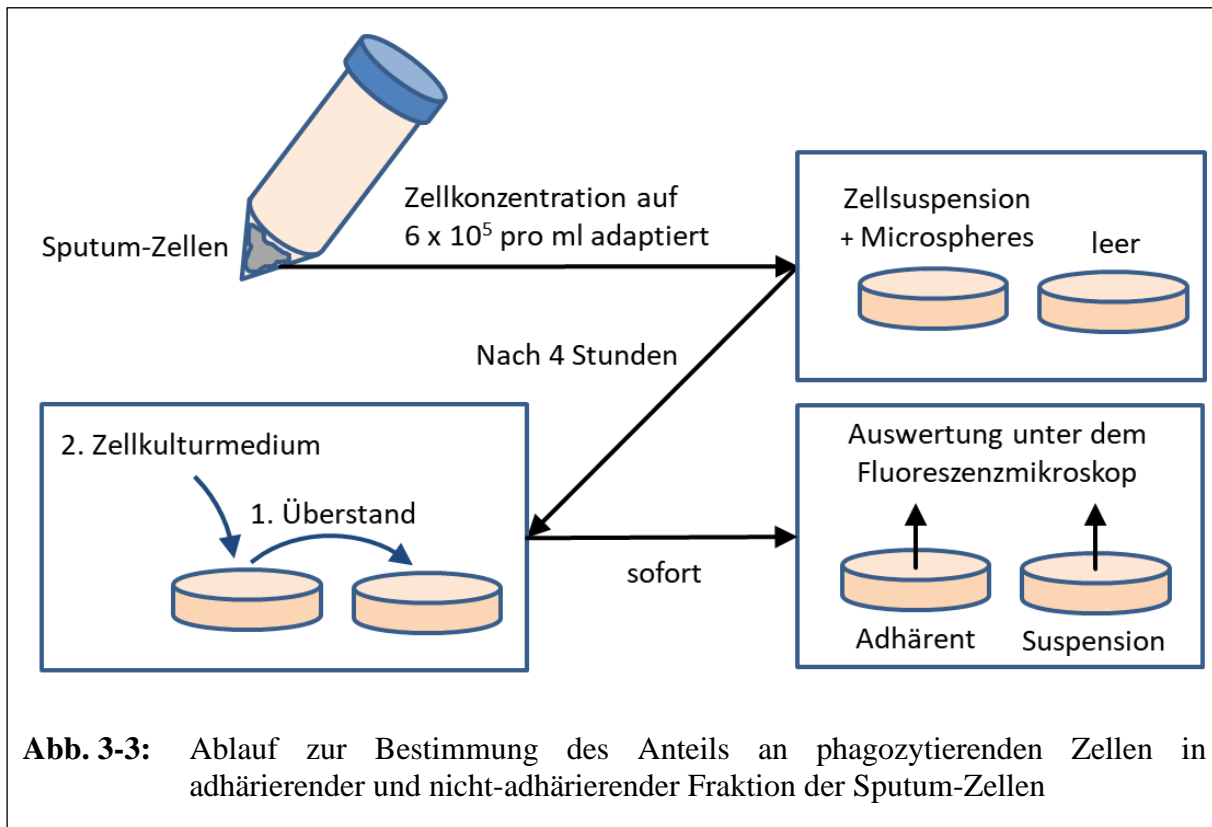


Abb. 3-3: Ablauf zur Bestimmung des Anteils an phagozytierenden Zellen in adhärenz- und nicht-adhärenz-fractionen der Sputum-Zellen

3.4 Zellkultur

Die humanen Zelllinien THP-1, U937, HL-60 und Mono-Mac-6 (MM6) wurden vom Leibniz-Institut DMSZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zellkulturen wurden als Modell für Atemwegsmakrophagen in Überexpressions- und Stimulationsexperimenten verwendet. Die unterschiedlichen Charakteristika der Zelllinien hinsichtlich des Geschlechts, Alters und Herkunft gibt Tabelle 3-2 wieder.

	THP-1	U-937	HL-60	MM6
Patientenalter in Jahren	1	37	36	64
Ethnie	asiatisch	kaukasisch	kaukasisch	kaukasisch
Geschlecht	männlich	männlich	weiblich	männlich
Immoralität durch	AML M5	histiozytäres Lymphom	AML M2	AML M5
Wachstum	Suspension	Suspension	Suspension	Suspension

Tabelle 3-2: Besonderheiten der Zelllinien THP-1, U-937, HL-50 und MM6

3.4.1 Kulturbedingungen

Alle vier Zelllinien wurden in RPMI 1640 GlutaMAX Medium (Cat. No. 61870044, ThermoFisher) kultiviert. Ergänzende Zusätze für alle Zelllinien waren 10 % Fetal Bovine Serum (FBS Superior, Cat. No. S0615, Biochrom), 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 250 ng/ml Amphotericin B (Cat. No. P11-002, A&E Scientific). Die MM6-Zelllinie erhielt darüber hinaus 10 µg/ml humanes Insulin (Cat. No. I9278, Sigma-Aldrich) und 100 µg/ml Natrium-Pyruvate (Cat. No. S8636, Sigma-Aldrich) gemäß den Empfehlungen des DMSZ. Alle Zelllinien wurden bei 5 % CO₂-Konzentration und 36 °C Temperatur in einem Zellinkubator aufbewahrt.

Die vier Zelllinien wurden montags, mittwochs und freitags passagiert und die Zellen dabei auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml verdünnt. Um die Zellkonzentration und Zellviabilität zu bestimmen, wurde der vollautomatische Zellzähler Countess II (Cat. No. AMQAF1000, ThermoFisher) mit Einwegzählkammern (Cat. No. C10314, ThermoFisher) verwendet. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl der 0,4 % Trypan-Blau-Lösung (wie in Abschnitt 3.2) in

einem Eppendorf-Gefäß vermischt und anschließend in die Zählkammer zur automatisierten Zellkonzentrations- und zur Viabilitätsbestimmung gegeben. Das Ergebnis wurde wie in Abb. 3-4 auf dem Display des Geräts dargestellt und die angegebenen Werte an lebendigen Zellen zur Bestimmung der notwendigen Menge an frischem Zellkulturmedium verwendet. Für Experimente wurden Zellen bis zur zehnten Passage verwendet.

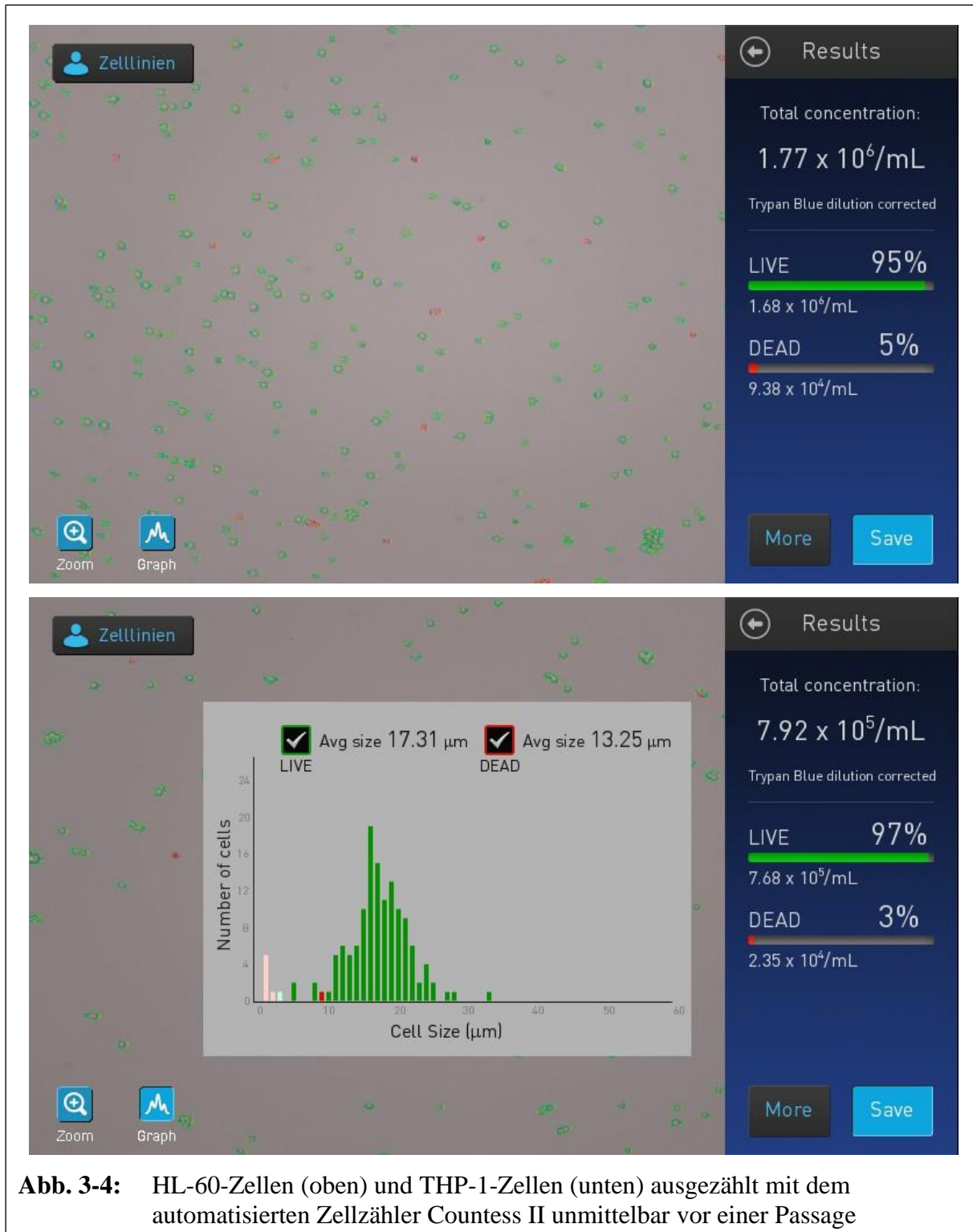


Abb. 3-4: HL-60-Zellen (oben) und THP-1-Zellen (unten) ausgezählt mit dem automatisierten Zellzähler Countess II unmittelbar vor einer Passage

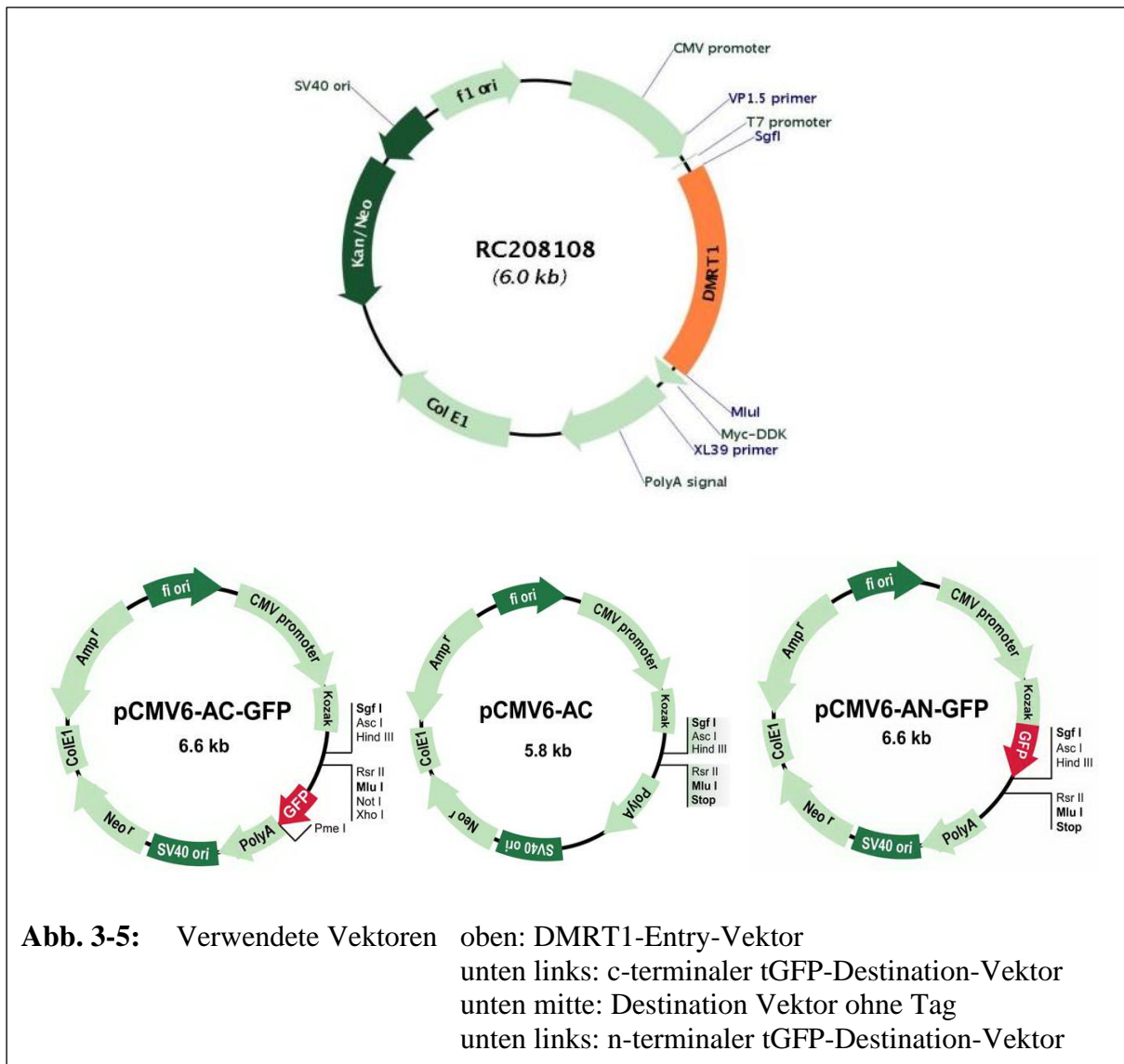
In der zweiten oder dritten Passage wurden 10 Millionen Zellen einer Zelllinie 5 Minuten bei 50 g zentrifugiert und anschließend in 900 µl FBS mit 100 µl sterilen DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei –80 °C gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut und in Kultur genommen. Um eine gleichmäßige und konstante Temperaturabnahme zu gewährleisten, wurden die Zellen während des Einfriervorgangs in Isopropanol gelagert.

Um die gefrorene Zellsuspension bei Bedarf in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen rasch in einem auf 36 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und anschließend zu 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium mit enthaltenen Antibiotika hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 36 °C und 50 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert. Zunächst wurde eine kleinere Menge Zellkulturmedium hinzugegeben, um das Zellpellet zu lösen, erst nach Resuspension des Zellpellets im kleineren Volumen (ca. 1 ml) wurde das restliche Zellkulturmedium hinzugegeben. In diesem Arbeitsschritt wurde das verwendete DMSO herausgewaschen. Die Anzahl, Viabilität und die Dichte der Zellen wurden unter dem Mikroskop geprüft.

Alle 4-8 Wochen und jeweils vor dem Einfrieren eines Zellsuspension-Aliquots wurde ein Mykoplasma-PCR-Test (cat. no. MP0025, Sigma Aldrich) durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml der Zellsuspension unmittelbar vor eine Passage für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proteine in Suspension wurden kurz herunterzentrifugiert und der Überstand mit der darin enthaltenen DNA zusammen mit Mykoplasma-spezifischen Primern auf Mykoplasmen-DNA einer PCR zugeführt. Auf diese Weise konnte laut Produktdatenblatt des verwendeten Mykoplasma-Tests hochsensibel und spezifisch die DNA bereits weniger Mykoplasma-Bakterien (1-5 fg) nachgewiesen werden. Gelelektrophoretisch (wie in Abschnitt 3.5 beschrieben) wurde die Zellkultur-DNA mit Positiv- und Negativkontrollen verglichen. Die Tests auf eine Mykoplasma-Kontamination erbrachten stets negative Ergebnisse.

3.4.2 Plasmid-Generierung und Zell-Transfektion

Für die *DMRT1*-Überexpressions- und Lokalisationsexperimente wurden *DMRT1*- und *tGFP*-Ursprungsplasmide von OriGene (Cat. No. RC208108, PS100020, PS100010, PS100019) bezogen (Plan der Vektoren vgl. Abb. 3-5).



Elektrokompetente *E. coli* Bakterien (Cat. No. C4040-52, ThermoFisher) wurden in flüssigem Wachstumsmedium aus 25 g/L Luria Broth Base (Cat. No. 12795-027, ThermoFisher) und festem Wachstumsmedium aus 32 g/L Lennox L Agar (Cat. No. 22700-025) vermehrt. Darüber hinaus wurde zur nachfolgenden Selektion der Plasmid-DNA enthaltenden Bakterien 100 µg/L Ampicillin (Cat. No. A0166, Sigma-Aldrich) oder 25 µg/L Kanamycin (Cat. No. 60615, Sigma-Aldrich) zu den Nährmedien gegeben. Für den Plasmid-Verdau und die Ligation

(Subklonierung) wurde das TrueORF™ Vector-System von OriGene verwendet (Protokoll vom Okt. 2014). Die Klonierung wurde mit folgenden Schritten durchgeführt:

1. Transformation elektrokompenter E. coli Bakterien mit den Plasmiden zur Herstellung einer größeren Menge an Ausgangsplasmiden. Die Aufreinigung der Plasmide aus den Bakterien erfolgte mittels dem QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN (Cat. No. 27106, Protokoll vom Feb. 2015).
2. Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmide mit den Restriktionsenzymen Sgf I und Mlu I (vgl. Abb. 3-5).
3. Ligation der verdauten Plasmide mit T4-Ligase. Das n-terminal mit tGFP getaggte Produkt ist in Abb. 3-6 dargestellt.

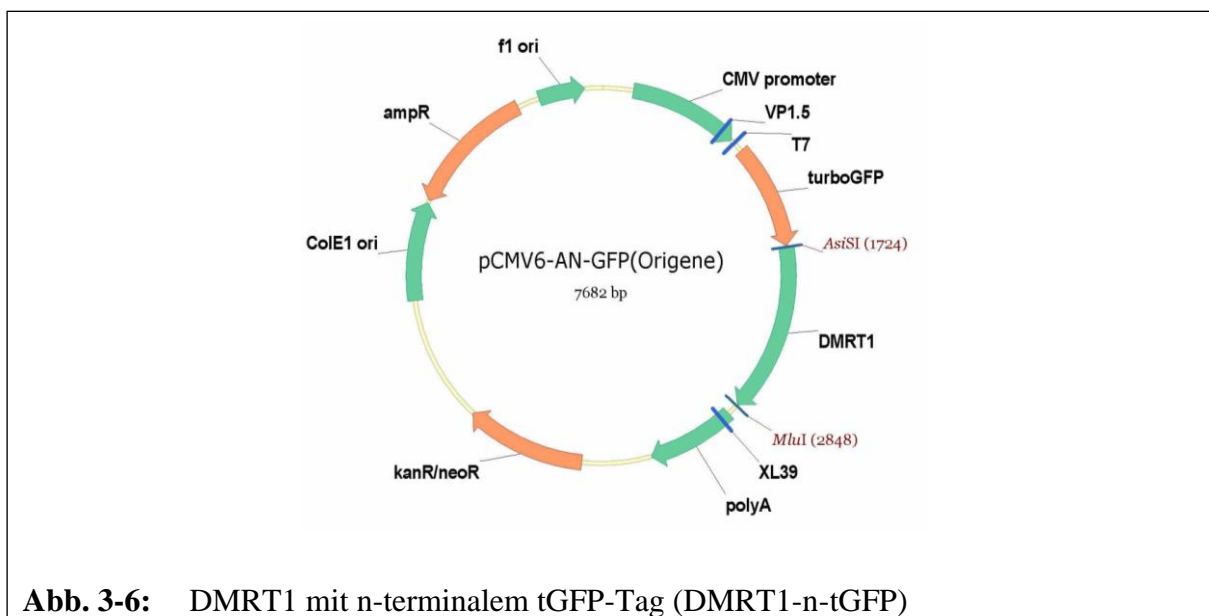


Abb. 3-6: DMRT1 mit n-terminalem tGFP-Tag (DMRT1-n-tGFP)

4. Erneute Transformation mit den drei hergestellten Plasmiden (*DMRT1*, *DMRT1-n-tGFP* und *DMRT1-c-tGFP*).
5. Überprüfung der korrekten Plasmid-Sequenz durch ein externes Unternehmen (GeneArt, DNA-Sequencing Service, ThermoFisher). Die Bindungsstelle für den Vorwärtsprimer ist in Abb. 3-6 mit „VP1.5“ gekennzeichnet. Die Bindungsstelle für den Rückwärtsprimer mit „XL39“.
6. Herstellung von 1 bis 3 mg Plasmid-DNA mittels des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Cat. No. 12165, Protokoll von Februar 2011).

Die Transfektion wurde 24 Stunden nach Passagieren mit je 10^6 THP-1 Zellen im Nucleofector II (Lonza) durchgeführt. Eingesetzt wurden 1 µg Plasmid-DNA in 100 µl Amaxa® Cell Line

Nucleofector® Kit V-Lösung (Cat. No. VVCA-1003, Lonza). Es wurde das Programm V-001 für ein hohes Expressionsniveau verwendet. 3×10^5 transfizierte THP-1 Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, in einer 12-Well-Platte ausgesät und unverzüglich in den Inkubator gelegt. Genexpressionsanalysen und Mikroskopie-Experimente wurden 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt.

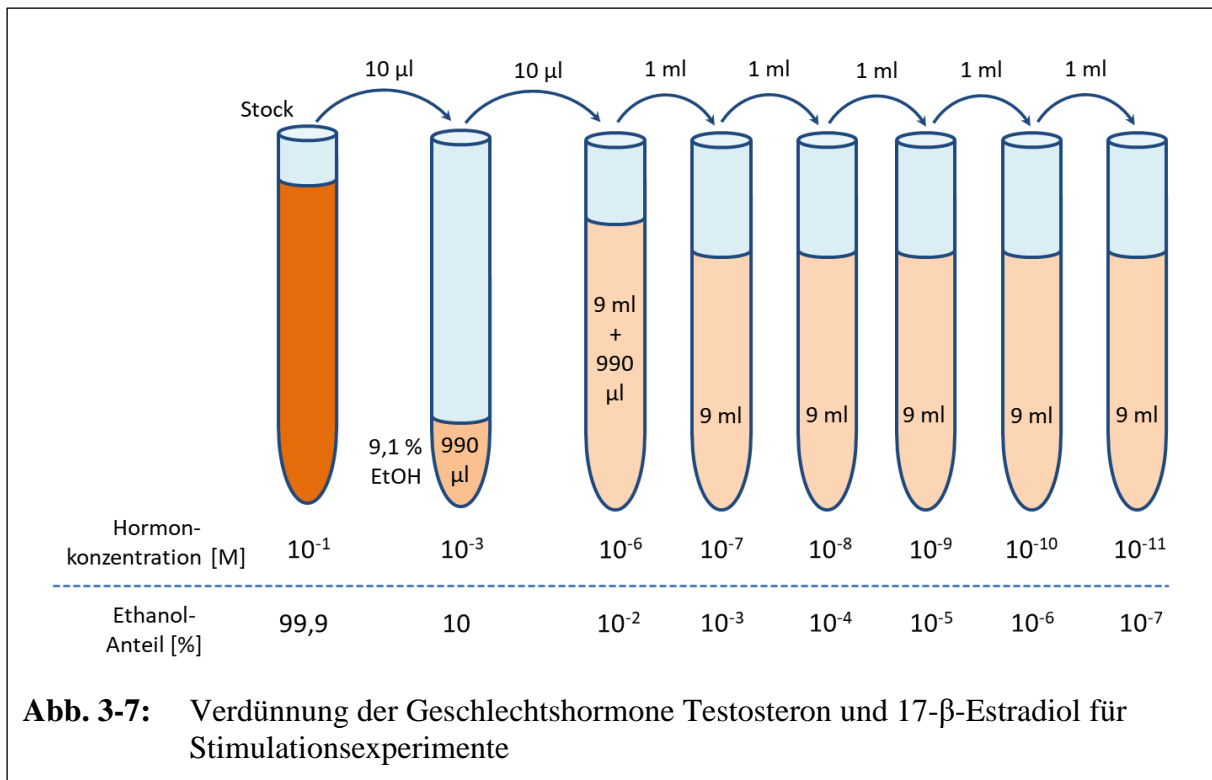
3.4.3 Stimulation der Zellkulturen mit LPS, Der p 1, PHA, Ppg und LpA

3×10^5 Zellen jeder Zelllinie (THP-1, U937, HL-60 und MM6) wurden in 24-Well-Platten (Art.-Nr. 662970, Greiner-Bio-One) in jeweils 1 ml Zellkulturmedium (wie in Kapitel 3.4.1) unmittelbar nach einer Zellpassage ausgesät und mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen von 100 ng bis 1 µg pro ml Lipopolysacharid (LPS, cat. no. L4391, Sigma-Aldrich) stimuliert. Dabei handelt es sich um LPS von *Escherichia coli* Bakterien des Stammes O111:B4, welches sich bereits als effektiver Stimulator von Alveolarmakrophagen bewährt hatte (147–149). Stimuliert wurde darüber hinaus mit Phytohemagglutinin (PHA, cat. no. L9017, Sigma-Aldrich), welches auch in der Positivkontrolle von Gamma-Interferon-Tuberkulose-Tests verwendet werden kann (150,151). Hier wurde eine vergleichbare Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Eine weitere Stimulation erfolgte mit dem Hausstaubmilbenantigen aus Hausstaubmilben Der p 1 (cat. no. NA-DP1-1, Indoor Biotechnologies) in einer Konzentration von 3,6 µg/ml. Diese Konzentration hat sich in Stimulationsexperimenten als ausreichend erwiesen, um eine adäquate Immunantwort auszulösen (152,153). Der p 1 ist eine Cysteinprotease, die durch Hausstaubmilben fäkal ausgeschieden wird und gegen welche IgE-Antikörper gebildet werden, die bei der Pathogenese der Hausstauballergie, der atopischen Dermatitis und der von Asthma eine Rolle spielen (154–156). Als viertes Allergen wurde ein bakterielles Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus* (Ppg, cat. no. 77140, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Ppg ist Bestandteil der bakteriellen Mureinhülle, bestehend aus einem linearen Polysaccharid-Rückgrat mit gekoppelten Oligopeptiden. Die verwendete Konzentration an Ppg hat sich als immunstimulierend in Makrophagen und T-Zellen erwiesen (157,158). Es erfolgte ebenso eine separate Stimulation mit LpA in der Konzentration von 1 µg/ml. Diese Konzentration hatte sich bereits in zahlreichen Zellkultur-Versuchen als wirksam erwiesen (159–161). Lipid A (LpA) ist ein Bestandteil von LPS und dient der Verankerung von LPS in der äußeren Membran der bakteriellen Zellwand.

Zur Stimulation wurden die Substanzen unmittelbar nach einer Passage auf 3×10^5 Zellen in 1 ml frischem Zellkulturmedium gegeben. Die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden bei den in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Bedingungen. Bei den LPS-Stimulationen wurden weitere Konzentrationen und Inkubationszeiten von einer Stunde bis 72 Stunden durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf der *DMRT1*-Expression nach Stimulation beurteilen zu können.

3.4.4 Stimulation der Zellkulturen mit Geschlechtshormonen

Die Stimulation der Zellkulturen mit Testosteron und 17- β -Estradiol wurden mit THP-1- und HL-60-Zellen durchgeführt. Für alle Stimulationen wurde ein mittels Aktivkohle gefiltertes Steroidhormon-reduziertes FBS (cat. no. S 3113, Biochrom) verwendet. Die Variabilität der Geschlechtshormonspiegel beim Menschen reicht von 10^{-7} bis 10^{-11} M bei Testosteron und 10^{-8} bis 10^{-12} M bei 17- β -Estradiol (162,163). Entsprechend wurden fünf Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-11} M bei Testosteron (cat. no. 86500, Sigma-Aldrich) und 10^{-8} bis 10^{-12} M bei 17- β -Estradiol (cat. no. E2257, Sigma-Aldrich) in jeweils 10-fach absteigender Verdünnung gewählt. Die Stimulation erfolgte unmittelbar im Anschluss an eine Passage. 3×10^5 Zellen wurden in 900 μ l frisches Zellkulturmedium in einer 24-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 100 μ l Zellkulturmedium mit Geschlechtshormonen hinzugefügt. Die Verdünnung der Ausgangsmenge von 1 g Testosteron (molare Masse: 288,4 g/mol) und 250 mg 17- β -Estradiol (molare Masse: 272,4 g/mol) erfolgte durch Zugabe von 34,67 ml und 9,18 ml hochreinen Ethanols, um für beide Geschlechtshormone Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 mM zu erhalten, welche bei -20 °C gelagert wurden. Da sich beide Steroidhormone hervorragend in Ethanol, aber nur in geringem Umfang in Wasser lösen (Löslichkeitsgrenze für Testosteron $8,6 \times 10^{-6}$ M, für 17- β -Estradiol $1,1 \times 10^{-4}$ M bei 20 °C und pH 7), erfolgten die Verdünnungen bei Konzentrationen über diesen Löslichkeitsschwellen in Zellkulturmedium mit 10 % Ethanol. Die weiteren Verdünnungen unterhalb der Löslichkeitsschwellen erfolgte in Zellkulturmedium ohne Ethanol (vgl. Abb. 3-7).

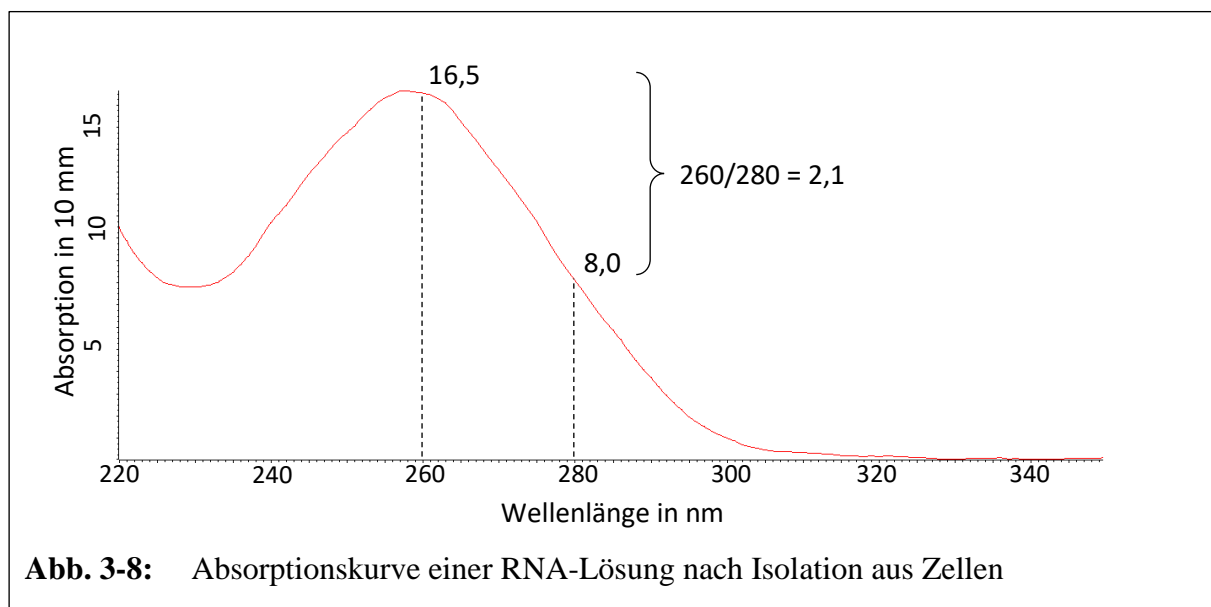


Für die erste Verdünnung wurde 10 μ l Geschlechtshormon-Stocklösung mit 10^{-1} M zu 990 μ l Zellkulturmedium mit 9,1 % Ethanol gegeben. Für die zweite Verdünnung wurde 10 μ l Geschlechtshormon-Lösung mit 10^{-3} M zu 9,995 ml Zellkulturmedium gegeben, um eine Konzentration von 10^{-6} M zu erreichen. Jeweils 1 ml der hergestellten Hormon-Lösung wurde mit 9 ml frischen Zellkulturmediums vermischt, um eine 10-fach verdünnte Lösung zu erhalten wie in Abb. 3-7 beschrieben.

100 μ l Geschlechtshormon-Lösung ab einer Konzentration von 10^{-6} M wurden zu 900 ml Zellsuspension pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt, um so eine 10-fach verdünnte Zielkonzentration im Well zu erhalten. Der Anteil an verschlepptem Ethanol belief sich auf diese Weise bereits in der höchsten Geschlechtshormon-Konzentration im Well auf 0,01 Promille, die Notwendigkeit einer Ethanol-Kontrolle war somit nicht gegeben, diese werden erst ab Konzentrationen von 0,1 Promille empfohlen, da darunter keine signifikanten Veränderungen der Genexpression zu erwarten sind (164). Inkubiert wurde wie bei den Stimulationsexperimenten mit direkten Immunstimulantien (LPS, Der p 1, etc.) jeweils für 24 Stunden zu den in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Bedingungen, bevor die Auswertung mittels RNA-Isolation und qPCR erfolgte.

3.5 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time qPCR

Für die Messung der Expression von *DMRT1* in Sputum sowie der Effekte der Stimulation und der Überexpression war es notwendig, das Expressionsniveau von *DMRT1*, *CYP19A1* und *MCP-1* zu bestimmen. Hierfür wurde RNA aus Zellen mithilfe des RNEasy MinElute®-Kits (Cat. No. 74204, Qiagen) nach Anweisungen des Herstellerprotokolls vom Oktober 2010 extrahiert. Verwendet wurden ausschließlich RNase-freie Materialien. Der optionale Schritt mit DNase-Verdauung zur Qualitätsverbesserung der Proben durch DNA-Minimierung wurde in das Protokoll inkludiert. Die Quantität der RNA wurde mit dem Qubit 3.0 Fluorometer (Cat. No. Q33216, Thermofischer) und dem Broad-Range-Assay (Cat. No. Q32850, Thermofischer) gemessen. Die Qualität und Quantität der RNA wurde spektrophotometrisch unter Verwendung des Nonodrops 2000 gemessen. RNA-Proben mit einem Wellenlängenverhältnis kleiner 1,8 260 nm zu 280 nm wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen, da dieses Wellenlängenverhältnis auf eine Kontamination mit Proteinen hindeutet. Proteine absorbieren aufgrund der enthaltenen aromatischen Carbonsäuren bei 280 und bei 230 nm. In Abb. 3-8 ist das Absorptionsspektrum einer RNA-Probe mit Berechnung des 260/280-Verhältnisses dargestellt.



Auch Proben mit einem Wellenlängen-Verhältnis 260 nm zu 230 nm kleiner 1,9 wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Eine verstärkte Absorption im Bereich von 230 nm weist neben der Möglichkeit einer Protein-Kontamination auf eine Kontamination mit Puffer- oder Wasch-Lösungen hin. Häufiger Übeltäter ist dabei das verwendete Guanidiniumthiocyanat (165). Dieses aggressive Salz zersetzen die Zellen und inhibiert RNAsen während der RNA-

Extraktion. Wird dieses Salz nicht ausgewaschen, blockiert es die Enzyme in den Downstream-Applikationen (reverse Transkriptase, Polymerase) und hat das Potential, gemessene Resultate zu verfälschen.

Aus der isolierten RNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse-Transkription-Kit (Cat. No. 205314, Qiagen) unter Einsatz von 1 µg RNA cDNA für die Analyse mittels qPCR hergestellt. Die hergestellte Stock-cDNA-Lösung wurde 1:15 verdünnt und anschließend für die qPCR eingesetzt. Bei der Suche nach einer *DMRT1*-Expression in Sputum-Zellen wurde die cDNA-Stocklösung unverdünnt eingesetzt.

Die qPCR erfolgte in 25 µl-96-Well-Platten (cat. no. HSL9601, Bio-Rad) auf dem PCR-Gerät „StepOne™ Plus“ (cat. no. 4376357, Thermofisher) mit der StepOne™ Software v2.3. Die PCR Reaktionen wurden mit einer initialen Denaturierungs- und Aktivierungsphase von 2 min bei 95 °C gestartet, es folgten 40 Zyklen mit 15 Sekunden Denaturierungszeit und 30 Sekunden Hybridisierungs- und Elongationszeit. Die Ziel-Transkripte (*DMRT1*, Hs00232766_m1, Thermofisher) wurden mittels der delta-delta-Ct-Methode zu Housekeeping-Genen referenziert (166,167). Als Referenzgene wurden entweder Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*, Hs02786624_g1, Thermofisher) oder *18S rRNA* verwendet. Primer und Hybridisierungssonden wurden für *18S rRNA* von Metabion International bezogen (vgl. Abb. 3-9). Dem PCR-Ansatz wurde zudem 10 % Betain mit 5 M zugesetzt, um den Reaktionsablauf durch Vermeidung von DNA-Sekundärstrukuren zu verbessern.

Forward primer:	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'
Reverse primer:	5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'
Fluoreszierende Sonde:	5'-6-Fam-CGCCCGTCGCTACTACCGATTGG-Tamra-3'

Abb. 3-9: Primer und Hybridisierungssonde für *18s rRNA*

Abb. 3-10 zeigt die verwendeten Ansätze für die Durchführung der qPCR-Experimente. Die Mastermixe wurden für die benötigte Anzahl an Samples (plus 5 bis 10 % Reservevolumen) hergestellt und bis zum Ausbringen auf der Reaktionsplatte auf Eis gelagert. Die Reaktionsplatte wurde während des Pipettiervorgangs auf einem Kühlblock gelagert.

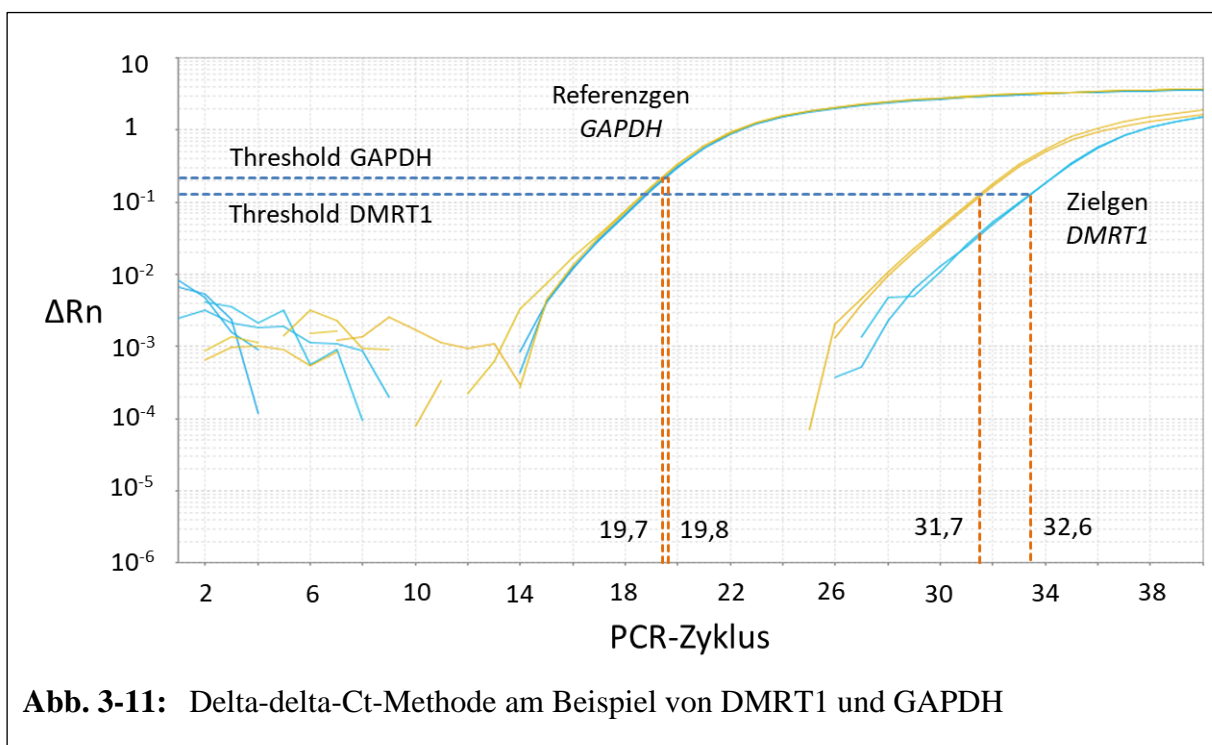
GAPDH		DMRT1	
Metabion PCR Mix	10,00 μ l	Metabion PCR Mix	10,00 μ l
GAPDH Assay Hs02758991_g1	1,00 μ l	DMRT1 Assay Hs01015859_m1	1,00 μ l
cDNA sample	1,65 μ l	cDNA sample	1,65 μ l
H2O	7,35 μ l	H2O	7,35 μ l

MCP-1		CYP19A1	
Metabion PCR Mix	10,00 μ l	Metabion PCR Mix	10,00 μ l
MCP1 Assay Hs00234140_m1	1,00 μ l	CYP19A1 Assay Hs00903411_m1	1,00 μ l
cDNA sample	1,65 μ l	cDNA sample	1,65 μ l
H2O	7,35 μ l	H2O	7,35 μ l

18S rRNA	
Metabion PCR Mix	10,00 μ l
Forward primer (25 μ mol/L)	0,12 μ l
Reverse primer (25 μ mol/L)	0,12 μ l
Fluorescent probe (25 pmol/L)	0,04 μ l
Betain (5 mol/L)	2,00 μ l
H2O	6,07 μ l
cDNA sample	1,65 μ l

Abb. 3-10: Pipettierpläne zur Herstellung der verwendeten qPCR-Ansätze

In Abb. 3-11 ist ein Beispiel der verwendeten delta-delta-Ct-Methode dargestellt. Als Thresholds wurden die Werte 0,25792 für *DMRT1*, 0,35135 für *GAPDH*, 0,04677 für *18S rRNA*, 0,13150 für *CYP19A1* und 0,21415 für *MCP-1* eingesetzt.



Für die delta-delta-Ct-Methode ist eine Effizienz des verwendeten Assays von möglichst genau 100 % notwendig, da die PCR-Effizienz Einfluss auf die weitere Berechnung des relativen Expressionsniveaus nimmt. Besonders bei großen Abständen der Ct-Werte zwischen dem Ziel- und Referenzgen können bereits wenige Prozentpunkte der Assay-Effizienz einen erheblichen Unterschied in der Berechnung des normalisierten Expressionsniveaus zur Folge haben, da jeder Zyklus im Exponenten in die Berechnung einfließt. Daher wurde vor Beginn der qPCR-Experimente eine Effizienztestung der verwendeten Assays durchgeführt. Hierfür wurden Verdünnungsreihen angefertigt und anschließend getestet (vgl. Abb. 3-12). Die StepOne™ Software errechnete aus den Parametern der Verdünnungsreihe die Effizienz des eingesetzten Assays, welche für den eingesetzten *DMRT1*-Assay 100,96 % betrug. Im Beispiel aus Abb. 3-11 bedeutet dies für die Differenz (das delta-delta-Ct) der beiden delta-Cts (12,8 und 12,0) von 0,8, dass diese nun zu einem relativen Expressionsunterschied von $2,01^{0,8}$ (bei 101 % Effizienz) statt $2^{0,8}$ (bei 100 % Effizienz) führt. Dies bewirkt einen Unterschied von absolut 0,7 % des relativen Expressionsniveaus.

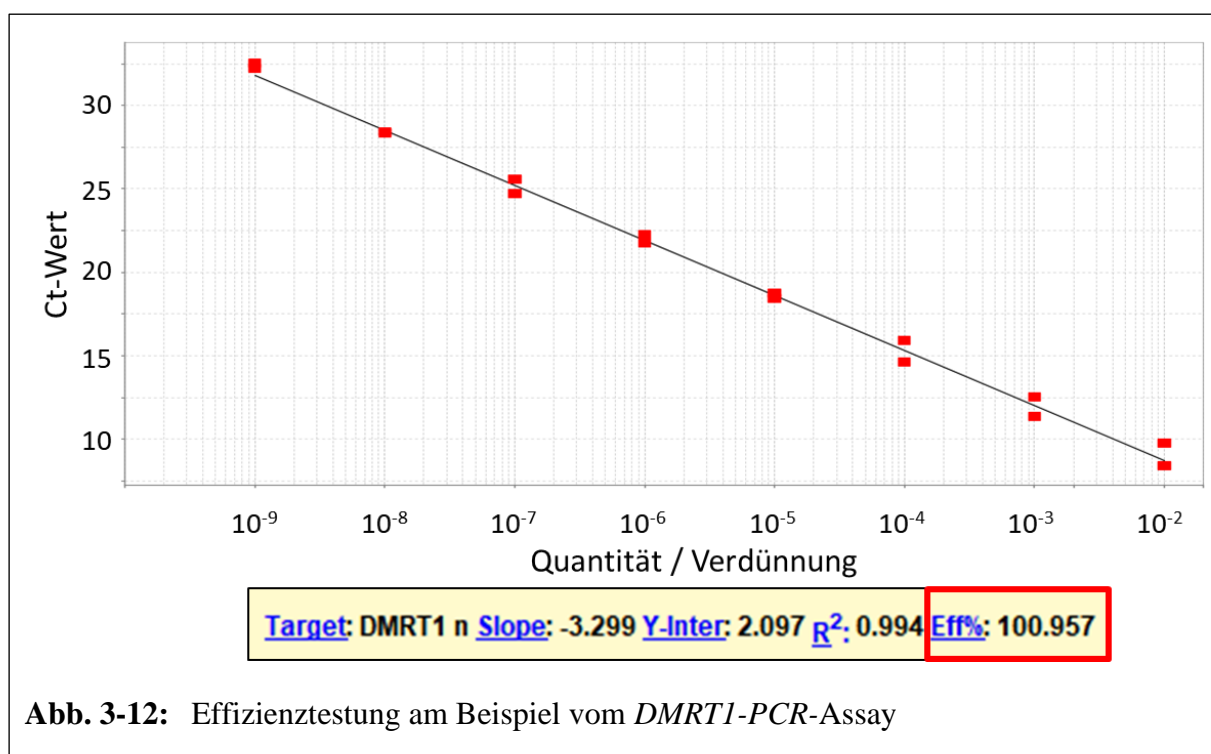


Abb. 3-12: Effizienztestung am Beispiel vom *DMRT1*-PCR-Assay

Bei den Überexpressionsanalysen wurde eine –RT-Kontrolle (minus reverse Transkriptase Kontrolle) verwendet, um mögliche Plasmid-DNA-Verschleppungen durch das RNA-Isolations- und cDNA-Synthese-Verfahren nachzuweisen. Durch die fehlende reverse Transkriptase darf in den –RT-Proben kein PCR-Signal gemessen werden, da keine RNA in cDNA umgewandelt werden konnte. Tritt dennoch ein PCR-Signal auf, so kann dieses Signal

nicht durch transkribierte RNA verursacht worden sein, sondern muss auf Plasmid-DNA zurückgeführt werden, welche im DNase-Verdau nicht vollständig eliminiert wurde und die nachfolgende Messung verfälscht. Proben mit einem Signal in den –RT-Kontrollen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen, da in diesen Proben Plasmid-DNA nachgewiesen wurde, und nicht die zu messende transkribierte RNA. Ebenso wurden Platten von der Analyse ausgeschlossen, deren Negativkontrolle ein Signal zeigte. Für jedes biologische Replikat wurden zwei technische Replikate auf die PCR-Platte pipettiert und der Mittelwert beider Messwerte für die Berechnung des normalisierten Expressionsniveaus verwendet. Ergebnisse wurden von der Berechnung ausgeschlossen, wenn die Messwerte der technischen Replikate mehr als eine Standardabweichung voneinander differierten. Die Anzahl an biologischen Replikaten ist im Ergebnisteil für jedes Experiment separat dargestellt. Weiter wurden Messwerte automatisch von der Software erkannt und ausgeschlossen („Flag settings“), die ein fehlerhaftes passives Referenzsignal zeigten. Die übrigen Ausschlusskriterien sind in Abb. 3-13 dargestellt.

Flag	Description	Use	Attribute	Condition	Value
AMPNC	Amplification in negative control	<input checked="" type="checkbox"/>	Cr	<	35
BADROX	Bad passive reference signal	<input checked="" type="checkbox"/>	Bad passive reference algorithm result	>	0.6
BLFAIL	Baseline algorithm failed	<input checked="" type="checkbox"/>			
CTFAIL	Cr algorithm failed	<input checked="" type="checkbox"/>			
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	<input checked="" type="checkbox"/>			
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	<input checked="" type="checkbox"/>			
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	<input checked="" type="checkbox"/>	Cr standard deviation	>	0.9
NOAMP	No amplification	<input checked="" type="checkbox"/>	Amplification algorithm result	<	0.1
NOISE	Noise higher than others in plate	<input checked="" type="checkbox"/>	Relative noise	>	4
SPIKE	Noise spikes	<input checked="" type="checkbox"/>	Spike algorithm result	>	1
NOSIGNAL	No signal in well	<input checked="" type="checkbox"/>			
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	<input checked="" type="checkbox"/>			
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	<input checked="" type="checkbox"/>			

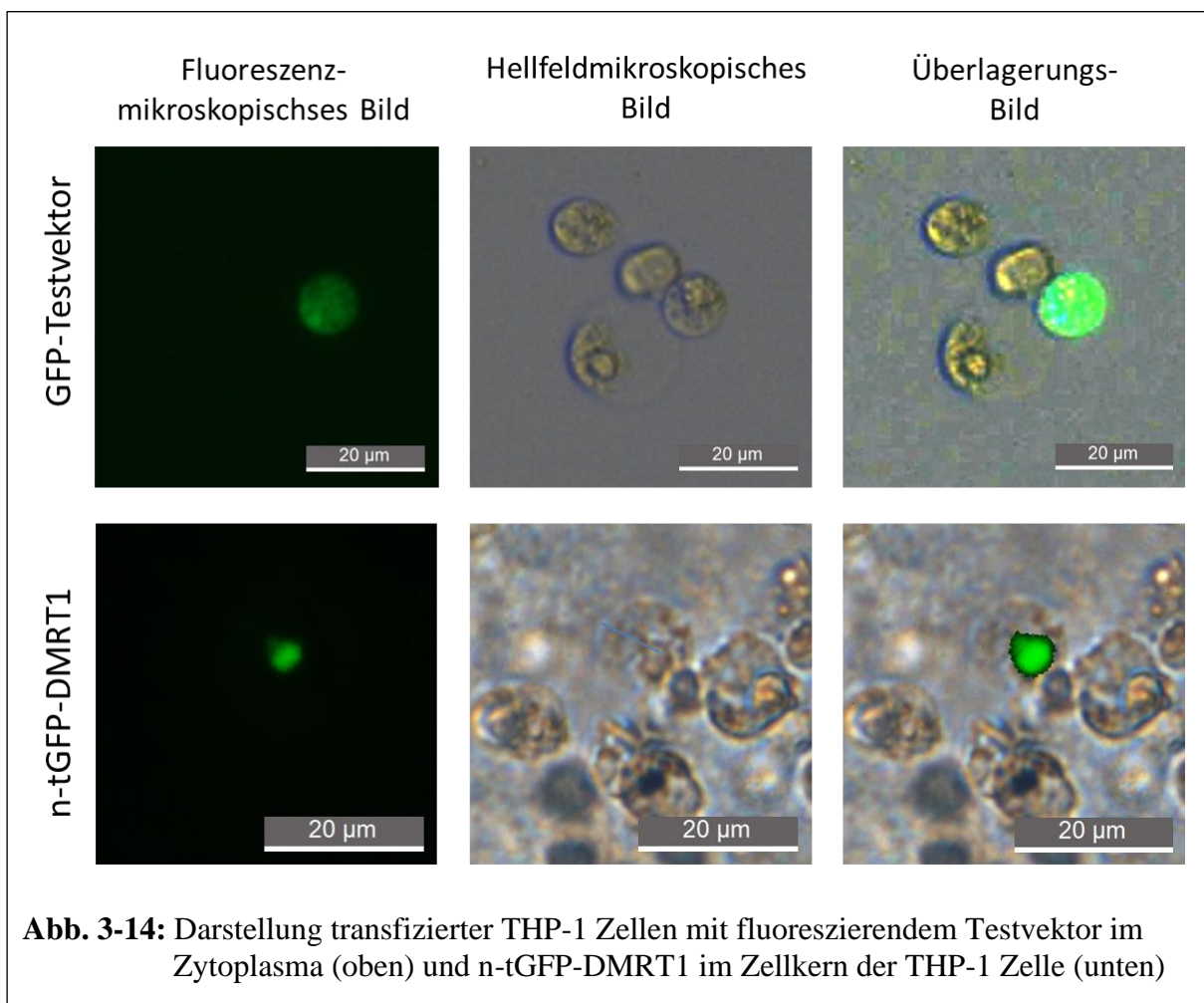
Abb. 3-13: Ausschlusskriterien („Flag settings“) der StepOne™ Software v2.3.

Für die Verifizierung der Identität einzelner PCR-Produkte aus den Sputum-Experimenten wurden die entsprechenden PCR-Replikate gelelektrophoretisch dargestellt. Um eine Auflösung von 20-50 Basenpaaren zu gewährleisten, wurde ein Elektrophorese-Gel mit 2,5 % Agarose hergestellt (je höher die Konzentration an Agarose, desto geringer wird die mögliche auflösbare Amplikonlänge). Die Agarose wurde in TAE-Puffer (2 M Tris, 0,5M EDTA, konzentrierte Essigsäure, pH 8) durch Aufkochen und regelmäßiges Schwenken in der Mikrowelle bei 800 Watt aufgelöst. Unter weiterem Schwenken wurde nun das Fluorophor

GelRed (cat. no 41003, Biotium) dem flüssigen Agarose-Gel zugeführt. GelRed interkaliert Nukleinsäuren und färbt unter Exposition gegenüber ultraviolettem Licht DNA durch Emission von orangem Licht an. Nach Vermengung des Gels mit GelRed wurde dieses auf einen Gelträger ausgegossen und mit einem Kamm versehen, der die Taschen für die nachfolgende Beladung mit den DNA-Proben bildet. Während des Abkühlens bildet die Polysaccharose Agarose durch Anlagerung der einzelnen Zuckerketten eine nicht-polymerisierte Matrize. Das abgekühlte Gel wurde mit den Kammern an der Kathode orientiert in eine Elektrophoresekammer (Model 40-2314, PEQLAB Biotechnologie GmbH) gegeben, welche mit dem gleichen TAE-Puffer aufgefüllt worden ist, der zur Herstellung des Gels verwendet wurde. Zur Beschwerung und besseren Sichtbarkeit der Lauffront wurden 10 µl eines DNA-Samples 2 µl eines bromophenolhaltigen Farbstoffs (6 X DNA Gel Loading Dye, cat. no. R0611, Thermofisher) zugegeben und im Anschluss in eine der Taschen des Gels pipettiert. Neben den DNA-Samples selbst wurde ein Größenvergleich in Form einer DNA-Leiter aufgetragen. Um die Länge der PCR-Replikate ideal zu vergleichen, wurde mit einer 50 bp-DNA-Leiter (cat. no. SM0371, Thermofisher) und einer 100 bp-DNA Leiter (cat. no. SM0241, Thermofisher) gearbeitet. Für die Elektrophorese wurden mittels eines Netzteils (PowerPac 300, Bio Rad) eine 110 V-Gleichspannung angelegt und die DNA-Samples für 1-2 Stunden laufen gelassen. Mit dem UV-Transluminator (Universal Hood II, Bio Rad) wurde das Gel dargestellt, die Dokumentation und farbliche Anpassung der Ergebnisse erfolgte per Software (Image Lab Beta, Version 2 3.0.1 von Bio-Rad). Die Beschriftung des Gels erfolgte mit Microsoft PowerPoint 2013 (Microsoft Cooperation).

3.6 Mikroskopie

Für die Lokalisationsexperimente nach der Transfektion von THP-1 Zellen mit *tGFP-DMRT1* wurde das Fluoreszenzmikroskop vom Typ E600 (Nikon) mit der Software EZ-C1 Version 3.91 verwendet. 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit *tGFP-DMRT1*-Plasmiden, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, ist das Ergebnis der Transfektion vor Fixierung der Zellen im Well fluoreszenzmikroskopisch überprüft worden (vgl. Abb. 3-14). Im Anschluss wurde mit der Fixierung der THP-1-Zellen fortgefahren.



Die Effizienz der Transfektion wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Auszählung des Anteils an fluoreszierenden Zellen ermittelt. Die Transfektionseffizienz lag für die DMRT1-Vektoren bei 4 % (c-tGFP-DMRT1) und 7 % (n-tGFP-DMRT1).

Zur Fixierung der Zellen wurden je 200 µl der transfizierten THP1-Zellsuspension mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in ein Well eines Kammerobjektiv-Trägersystems (Chamber-Slide-System, cat. no. 154534, ThermoFisher) mit 8 Wells zu je $0,7 \text{ cm}^2$ auf einem

Glasobjektträger pipettiert und im Inkubator bei 36 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Zuvor wurde einem Teil der Zellen 100 ng (500 ng/ml) LPS zugeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Chamber-Slides vorsichtig aus dem Inkubator genommen, das Zellkulturmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen für 10 Minuten mit einer Methanol-freien Formaldehyd-Lösung (Pierce 16 %, cat. no. 28908, ThermoFisher) fixiert, nachdem diese mit PBS auf 4 % verdünnt wurde. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS (ohne Formaldehyd) gefüllt, für fünf Minuten inkubiert und wieder abgesaugt (gewaschen). Nun folgte die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, cat. no. D1306, ThermoFisher). DAPI interkaliert DNA und fluoresziert in diesem Zustand nach Anregung mit UV-Licht (Exzitationsmaximum von 358 nm). Es emittiert blaues Licht von 461 nm Wellenlänge, welches die DNA-reichen Zellkerne darstellt. Aufgelöst wurde das als Lyophilisat vorliegende DAPI in 2 mL deionisiertem Wasser, um einen DAPI-Stock mit 14,3 mM herzustellen, welcher bei -20 °C gelagert wurde. 2,1 µl des DAPI-Stocks wurden in 100 µl PBS gegeben, um eine Lösung mit 3×10^{-4} M herzustellen. 10 µl dieser Lösung wurden in 10 ml PBS gegeben, um die Zielkonzentration für die Färbung von 3×10^{-7} M herzustellen. Die Wells wurden mit der DAPI-Lösung gefüllt, für 10 Minuten inkubiert und die DAPI-Lösung wieder abgesaugt. Im Anschluss wurde das restliche DAPI mit dreimaligem Waschen mit PBS entfernt. Abschließend wurden die Plastikkammern vorsichtig entfernt und der Objektträger zum Schutz der empfindlichen Fluorophore mit Dako Fluorescence Mounting Medium (cat. no. S302380-2, Agilent Dako) benetzt und für 24 Stunden zum Trocknen bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Die Arbeitsschritte zur Fixierung und Färbung wurden soweit möglich in Abwesenheit von hellen Lichtquellen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die weitere Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit.

3.7 Statistische Auswertung

Um die relative mRNA-Expression der Zielgene (*DMRT1*, *MCP-1*, *CYP19A1*) aus den Samples unabhängiger Stimulationsexperimente mittels Housekeeping-Genen (*GAPDH*, *18S rRNA*) vergleichen zu können, wurden aus den Ct-Werten der qPCR-Experimenten wie im vorherigem Abschnitt beschrieben mittels der delta-delta-Ct-Methode die normalisierten Genexpressionsniveaus in Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation) berechnet und die Ergebnisse mit dem Statistik-Programm SPSS Version 24.0.0.0 ausgewertet und graphisch dargestellt. Zuvor wurden die Daten jedes Experiments auf ihre Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Zum Vergleich der Mittelwerte zweier normalverteilten Gruppen an biologischen Replikaten wurde der parametrische, zweiseitige T-Test für unabhängige Stichproben mit dem Levene-Test auf Varianzhomogenität verwendet. Zum Vergleich zweier nicht-normalverteilter Gruppen an biologischen Replikaten wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Vor der Berechnung des normalisierten Genexpressionsniveaus wurden bei jedem Experiment beide verwendeten Referenzgene (*GAPDH* und *18S rRNA*) hinsichtlich ihrer Stabilität (Varianz der Ct-Werte der biologischen Replikate) verglichen und das stabiler exprimierte Referenzgen eines Experiments, also das Referenz-Gen mit der geringeren Varianz, für die Normalisierung des Zielgens für die nachfolgenden Auswertung zugrunde gelegt. Darstellungen der qPCR-Rohdaten und der daraus resultierenden Varianzen sind in Abschnitt 7 aufgeführt. Für nicht mehr detektierte Samples wurde ein Ct-Wert der maximalen Zykluszahl von 40 für die Berechnung des normalisierten Expressionsniveaus zugrunde gelegt.

4 Ergebnisse

4.1 DMRT1-Expression in Sputum und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien

Um zu prüfen, ob sich die Expression immunhistochemisch nachgewiesener DMRT1-Proteine in Alveolarmakrophagen bei Krankheitsprozessen im Lungengewebe (vgl. Abb. 1-5 in Abschnitt 1.4) mittels qPCR nachweisen lässt, wurde Sputum induziert und die gewonnenen Sputum-Zellen auf eine mögliche *DMRT1*-Expression hin untersucht. Abb. 4-1 zeigt den qPCR-Amplifikationsplot mit einer geringen *DMRT1*-Expression in induzierten Sputum-Zellen.

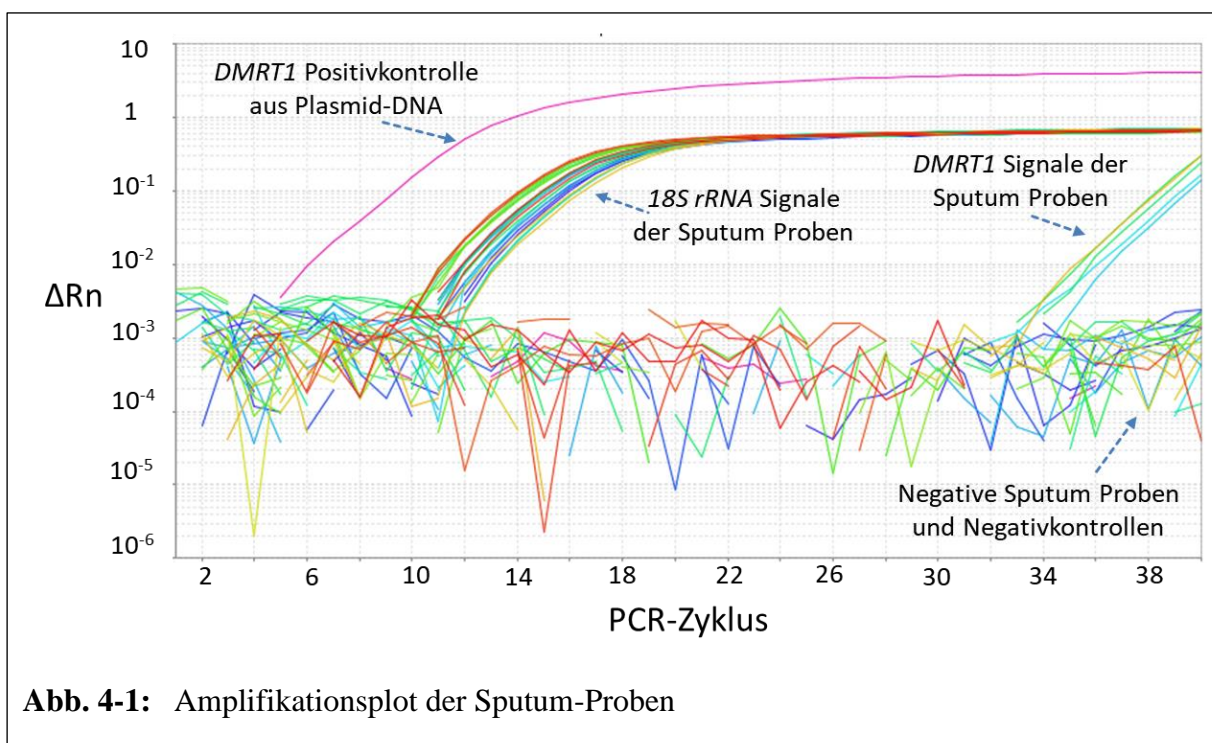


Abb. 4-1: Amplifikationsplot der Sputum-Proben

Zur Detektion dieser Signale war der Einsatz unverdünnter cDNA notwendig. Auch unter Einsatz unverdünnter cDNA zeigte sich ein qPCR-Signal nur bei Probandin 9 in beiden technischen Replikaten (vgl. Tabelle 4-1). Diese Probandin hat kein Asthma, ist Raucherin und mit 19 Jahren die Jüngste der Probanden.

Proben-Nr.	Geschlecht	Alter	Asthma	Raucher	PCR-Signal in Replikate 1/2
1	männlich	24	nein	nein	Ct = 36,0 / kein
2	weiblich	29	nein	ja	Ct = 36,8 / kein

3	weiblich	24	ja	nein	kein / kein
4	männlich	24	ja	nein	kein / kein
5	weiblich	24	nein	nein	kein / kein
6	männlich	44	nein	ex	kein / kein
7	weiblich	25	nein	nein	kein / kein
8	männlich	34	nein	nein	Ct = 35,5 / kein
9	weiblich	19	nein	ja	Ct = 35,9 / Ct = 36,1
10	weiblich	35	nein	nein	Ct = 37,2 / kein

Tabelle 4-1: Anteil der phagozytierenden Zellen in den einzelnen Sputum Proben

Aufgrund des sehr niedrigen Expressionsniveaus und der fehlenden PCR-Signale in manchen technischen Replikaten erfolgte der Nachweis der *DMRT1*-Amplifikation durch die Darstellung des *DMRT1*-Amplifikationsprodukts mittels DNA-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 4-2).

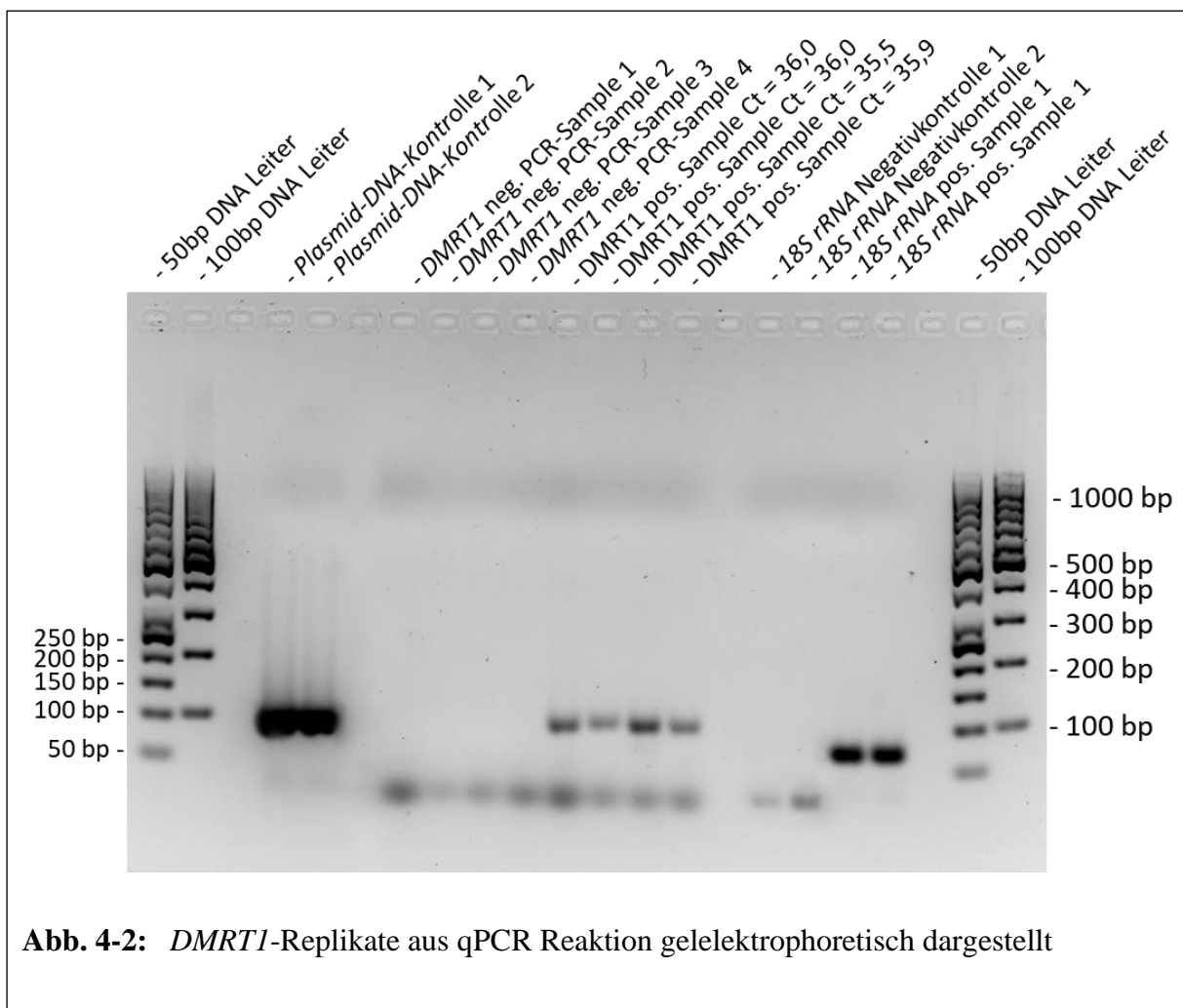


Abb. 4-2: *DMRT1*-Replikate aus qPCR Reaktion gelelektrophoretisch dargestellt

Die Länge des *DMRT1*-Amplikons beträgt gemäß den Herstellerangaben 97 Basenpaare (168). Das Ergebnis der Gelelektrophorese zeigt, dass sich tatsächlich ein *DMRT1*-Amplifikat der korrekten Länge in Sputum nachweisen lässt.

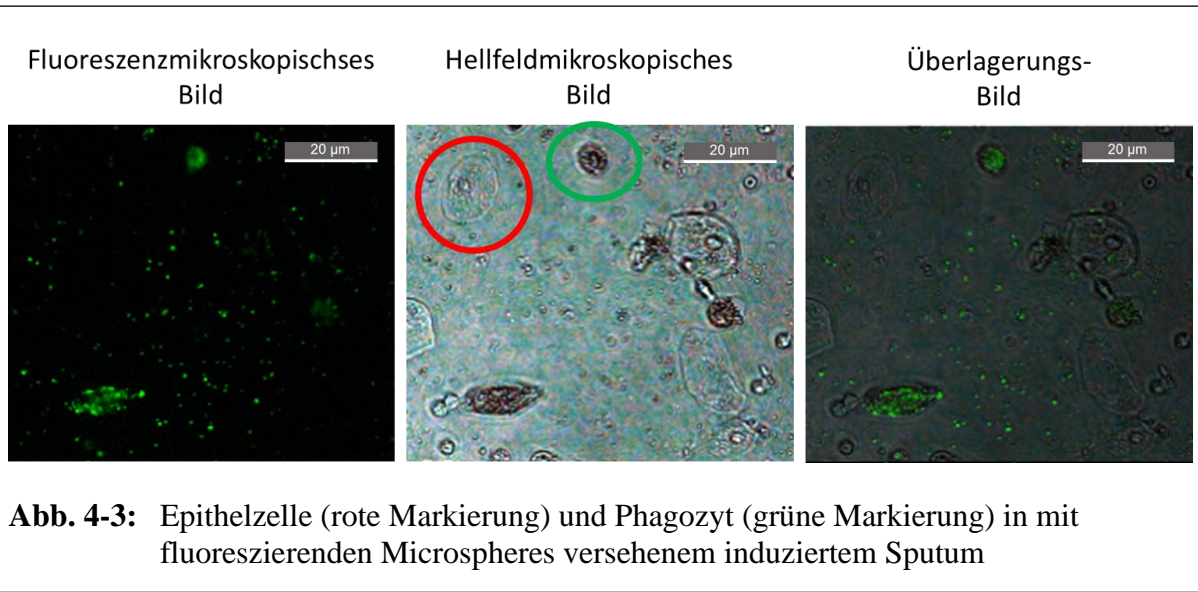
Da eine *DMRT1*-Expression nur in Makrophagen und nicht in anderen Sputum-Zellen (z.B. Epithelzellen, Granulozyten, Eosinophilen) angenommen wird, könnte eine möglichst selektive Analyse der Makrophagen die Detektionsschwelle der qPCR für *DMRT1* herabsetzen sowie einen Expressionsunterschied zwischen verschiedenen Zellgruppen zeigen. Eine einfache Selektionsmethode stellt die separate Analyse adhärenter- und nicht-adhärenter Zellen dar. Diese Selektion erfolgte bei den Probanden 1-3, da nur diese Probanden für eine erneute Sputum-Induktion zur Verfügung standen. Aufgrund der Tatsache, dass Alveolarmakrophagen-Subpopulationen auch nicht adhären (169,170), wurde der Anteil an phagozytierenden Zellen in der adhären- und nicht-adhären Zellfraktion mittels Phagozytose-Assay bestimmt, um den Anteil an Phagozyten/Makrophagen in der jeweiligen Gruppe zu bestimmen (vgl. Tabelle 4-2 und Abb. 4-4).

Proben-Nr.	Phagozyten-Anteil an			Zell-Viabilität		Zellzahl pro ml	
	adhären-ten Zellen	Zellen in Suspension	Sputum insgesamt	vor Assay	nach Assay	vor Assay	Zellen in Suspension
1	83 %	12 %	50 %	83 %	63 %	6,1 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵
2	87 %	19 %	58 %	76 %	60 %	6,0 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵
3	76 %	22 %	43 %	68 %	45 %	6,3 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵

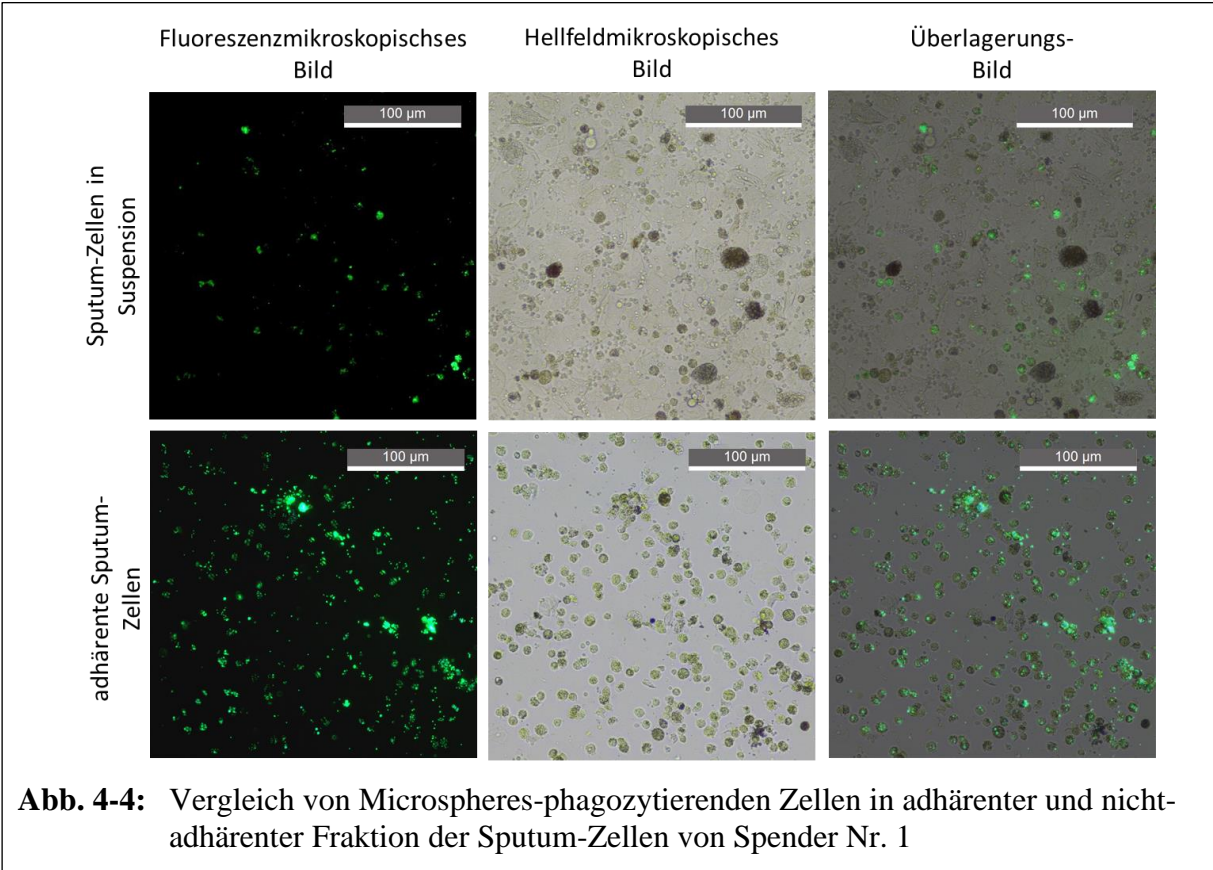
Tabelle 4-2: Anteil der viablen und phagozytierenden Zellen in Sputum-Proben

Der Anteil an Microspheres-phagozytierenden Sputum-Zellen stellt sich in der adhären Zell-Fraktion größer dar (76 - 83 %) als bei nicht-adhären Sputum-Zellen in Suspension (12 - 22 %). Bei Probandin 2 (Raucherin) und 3 (niedrige post-Assay-Viabilität) zeigte sich ein erhöhter Anteil (19-22 %) nicht-adhärenter Phagozyten in Suspension im Vergleich zu Proband 1 mit 12 % (kein Raucher, höchste post-assay-Viabilität).

Unter dem Mikroskop zeigten sich im Sputum „spiegeleierförmige“ Epithelzellen aus dem Mund-Nasen-Rachenraum. Diese können während der Induktion in das Sputum verschleppt werden und den relativen Anteil an Phagozyten dadurch reduzieren (exemplarisch rot markierte Epithelzelle in Abb. 4-3).



In der adhärennten Zellfraktion zeigten sich nur vereinzelt Epithelzellen, diese stellten sich in der nicht-adhärennten Zellfraktion dar (vgl. Abb. 4-4). Die adhärennte Zellfraktion eignet sich aufgrund des höheren Anteils an Phagozyten und aufgrund fehlender Epithelzellen besser für eine Messung der *DMRT1*-Expression als die Zellfraktion in Suspension.



Der Anteil an allen Sputum-Zellen, die nach Induktion und vier Stunden Inkubation zum Adhärenzen noch viabel waren, lag zwischen 45 und 63 % und verringerte sich somit zu den Werten vor Durchführung des Phagozytose-Assays im Durchschnitt um 16 - 22 % (vgl. Tabelle 4-1). Aufgrund der verringerten Viabilität und der geringeren Zellzahlen in den einzelnen Fraktionen der Sputum-Zellen, zeigte sich die isolierte RNA-Masse zu gering für die geplante separate Analyse beider Zellfraktionen mittels qPCR.

Daher wurde auf Makrophagen-ähnliche Zelllinien zurückgegriffen und diese auf eine *DMRT1*-Expression hin überprüft. Interessanterweise ließ sich für *DMRT1* eine Expression in allen vier Zelllinien (THP-1, U937, HL-60 und MM6) nachweisen (vgl. Abb. 4-5 links).

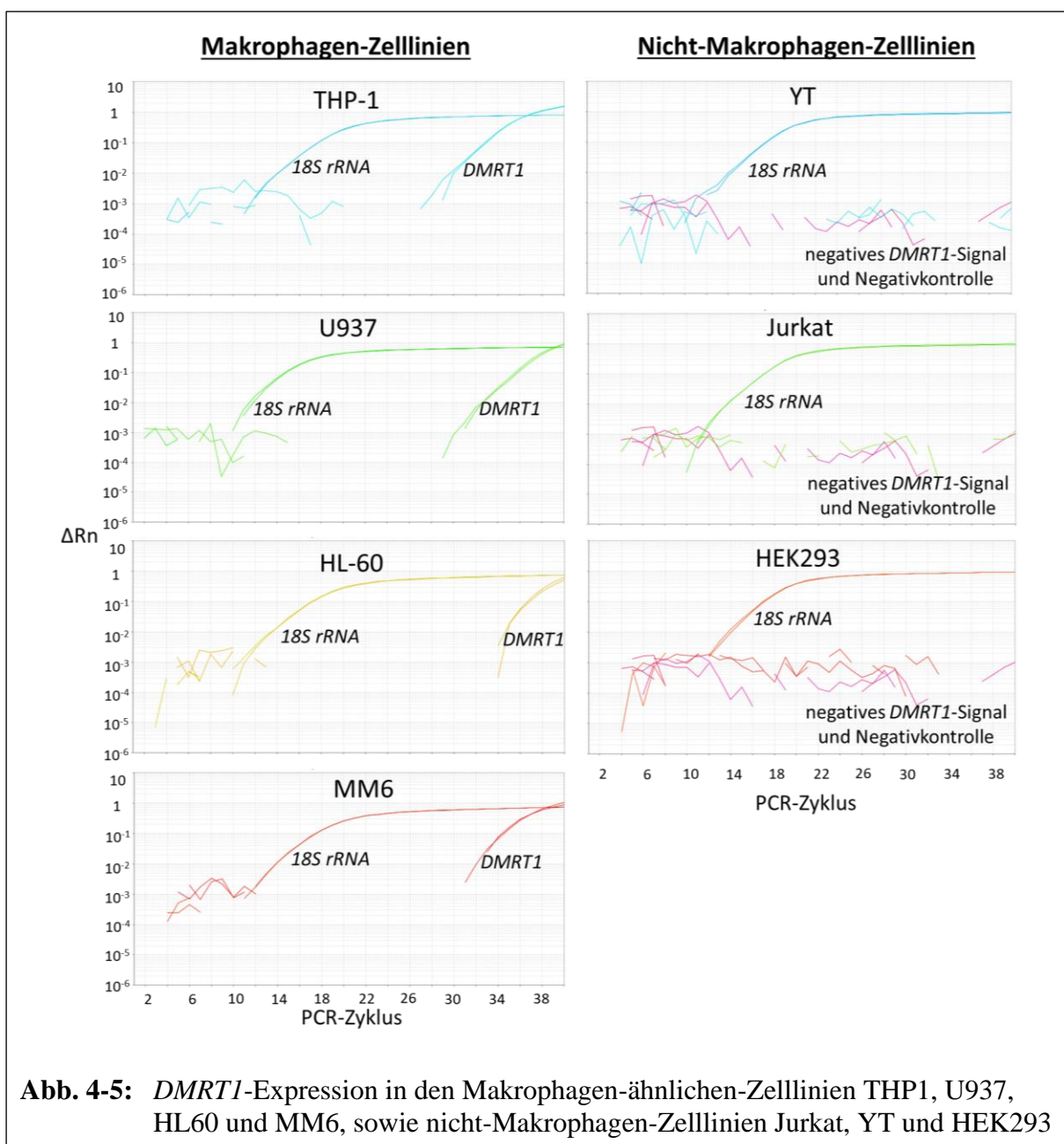
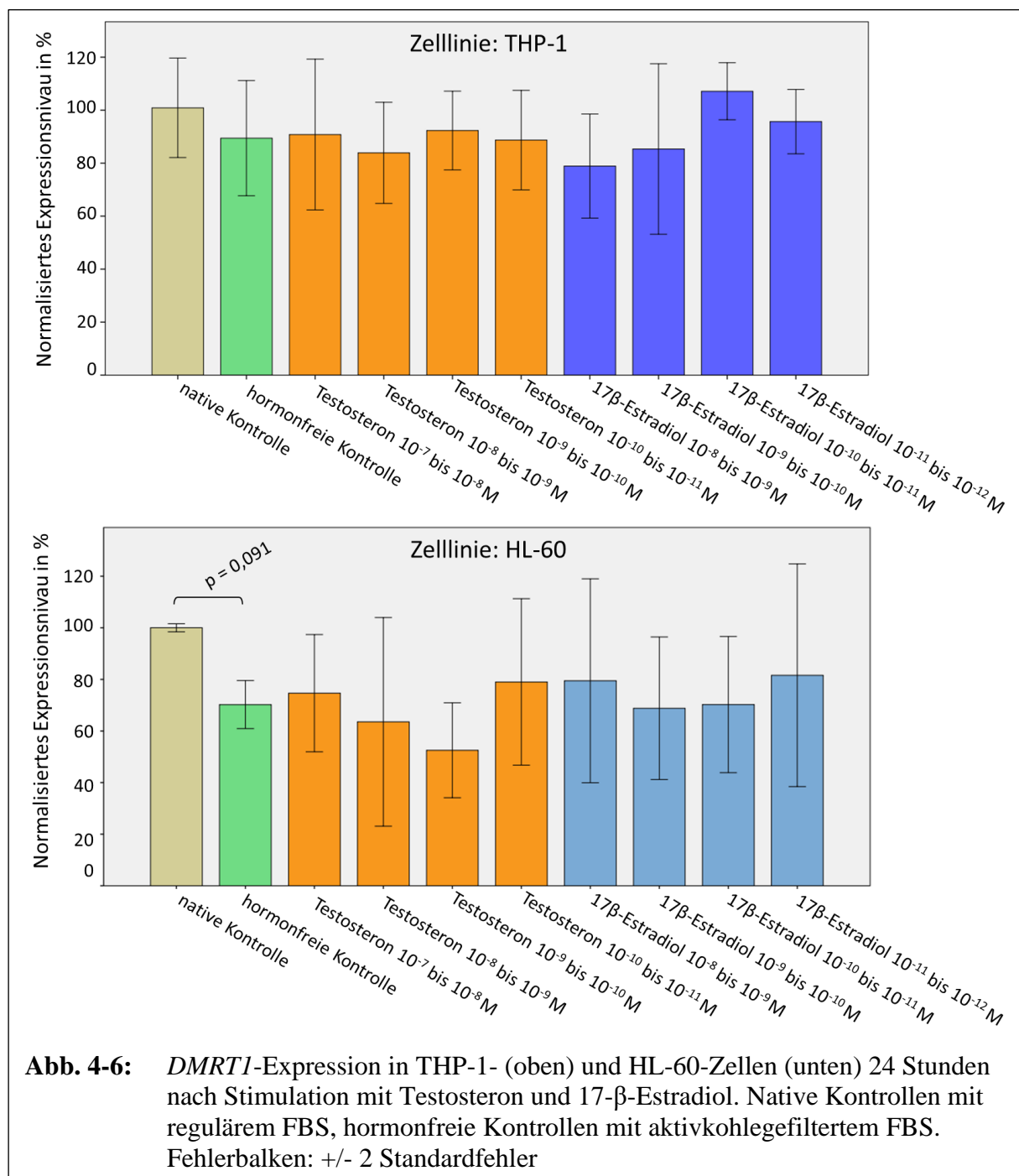


Abb. 4-5: *DMRT1*-Expression in den Makrophagen-ähnlichen-Zelllinien THP1, U937, HL60 und MM6, sowie nicht-Makrophagen-Zelllinien Jurkat, YT und HEK293

Diese Zelllinien sind sowohl männlich (THP-1, U937 und MM6) als auch weiblich (HL-60). Das stärkste qPCR-Signal zeigte sich in THP-1-Zellen, welche von einem männlichen Säugling stammen. Alle anderen Zelllinien stammen von Erwachsenen. In nicht-Makrophagen Zelllinien wie Jurkat- (T-Zellen), YT- (T/NK-Zellen) und HEK293-Zellen (embryonale Nierenzellen) konnte sich im Gegensatz zu den getesteten Makrophagen-ähnlichen Zelllinien interessanterweise keine *DMRT1*-Expression nachweisen lassen (vgl. Abb. 4-5).

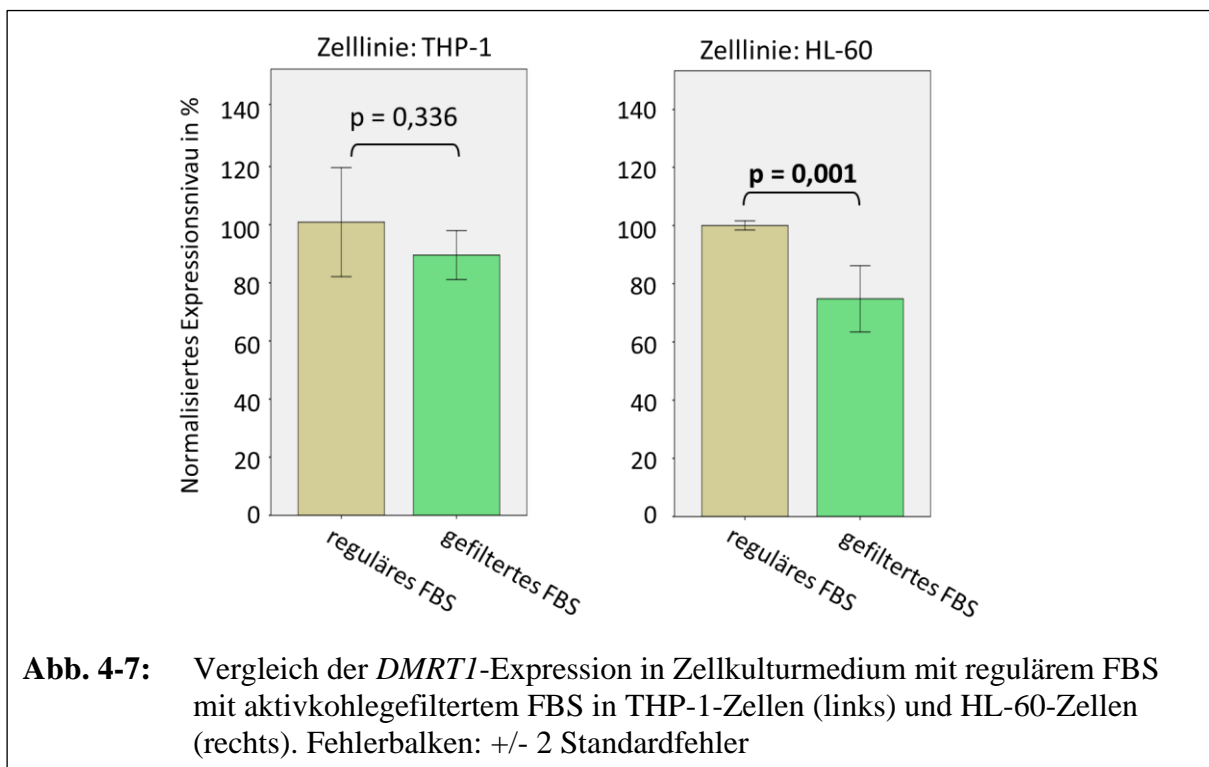
4.2 Kein signifikanter Einfluss von Geschlechtshormonen auf *DMRT1*-Expression

Als Nächstes wurde eine Charakterisierung der in Zelllinien festgestellten *DMRT1*-Expression durch Stimulation mit Geschlechtshormonen durchgeführt, um die aus den aus Hodengewebe bekannten Zusammenhänge von *DMRT1* mit dem Steroidhormonmetabolismus erstmalig auch in Makrophagen zu untersuchen. Testosteron und 17- β -Estradiol zeigten auf die *DMRT1*-Expression in THP-1-Zellen mit einem männlichen Karyotyp keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur hormonfreien Kontrolle (vgl. Abb. 4-6 oben).



Auch bei HL-60-Zellen mit einem weiblichen Karyotyp zeigte sich kein Unterschied zwischen den stimulierten Zellen und den Kontrollen. Ein geringer, statistisch jedoch nicht signifikanter Unterschied ergab sich bei HL-60-Zellen zwischen der hormonfreien Kontrolle (aktivkohlesteroidhormongefiltertes FBS) und der Kontrolle mit regulärem Zellkulturmedium (ungefiltertes Standard-FBS).

Beim Vergleich aller Proben in Zellkulturmedium mit aktivkohle-gefiltertem FBS mit den nativen Kontrollen (mit regulärem, unbehandeltem FBS) zeigte sich ein geringer, statistisch signifikanter Unterschied in HL-60-Zellen. Auf diesen Unterschied scheinen die Geschlechtshormone keinen Einfluss zu haben. Der Effekt kommt durch die Verwendung des aktivkohle-gefilterten FBS zustande. In THP-1 Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.



4.3 Verringerte *DMRT1*-Expression nach LPS- und Ppg-Stimulation

Es stellte sich als Nächstes die Frage, ob die *DMRT1*-Expression in Makrophagen auf eine direkte Immunstimulation reagiert. In Stimulationsexperimenten mit LPS, Der p 1, PHA, Ppg und LpA zeigten sich signifikante Effekte auf die *DMRT1*-Expression unter Stimulation mit bakteriellen Zellwandbestandteilen (LPS und Ppg). Den stärksten Effekt auf die *DMRT1*-Expression übte die LPS-Stimulation in THP-1-Zellen aus. Diese führte zu einer Reduktion der *DMRT1*-Expression um das 12,7-fache auf 7,9 % nach 24 Stunden (vgl. Tabelle 4-3).

	THP-1		U937		HL-60		MM6	
	relative Expression	p-Wert	relative Expression	p-Wert	relative Expression	p-Wert	relative Expression	p-Wert
LPS 500 ng/ml	7,9 %	0,012	20,1 %	0,044	50,3 %	0,086	11,0 %	0,044
Der p 1 3,6 µg/ml	163,3 %	0,064	120,8 %	0,764	102,2 %	0,894	74,3 %	0,359
PHA 5 µg/ml	76,8 %	0,266	78,1 %	0,472	62,3 %	0,044	43,6 %	0,097
Ppg 5 µg/ml	35,1 %	0,035	20,8 %	0,040	39,2 %	0,001	8,7 %	0,044
LpA 1 µg/ml	96,0 %	0,710	120,3 %	0,755	66,7 %	0,065	22,2 %	0,056

Tabelle 4-3: Relatives Expressionsniveau der stimulierten Zelllinien nach 24 Stunden. Angegeben ist der p-Wert für den Test auf Gleichheit zur Kontrolle.

Abb. 4-8 stellt die normalisierten Genexpressionsniveaus aller vier stimulierten Zelllinien graphisch dar. Hier zeigt sich die vergleichsweise stärkste Reduktion der *DMRT1*-Expression nach Stimulation mit LPS (rot markiert) und Ppg (orange markiert). Ein kleinerer Effekt mit grenzwertiger Signifikanz zeigen sich bei PHA auf HL-60-Zellen, dieser stellt sich mit einer 1,6-fachen Expressionsminderung im Vergleich zu den LPS- und Ppg-Effekten (bis zur 12,7-fachen Expressionsminderung) allerdings erheblich geringer dar. Das Hausstaubmilben-Allergen Der p 1 sowie der LPS-Membrananker LpA zeigten auf keine der Zelllinien einen signifikanten Effekt.

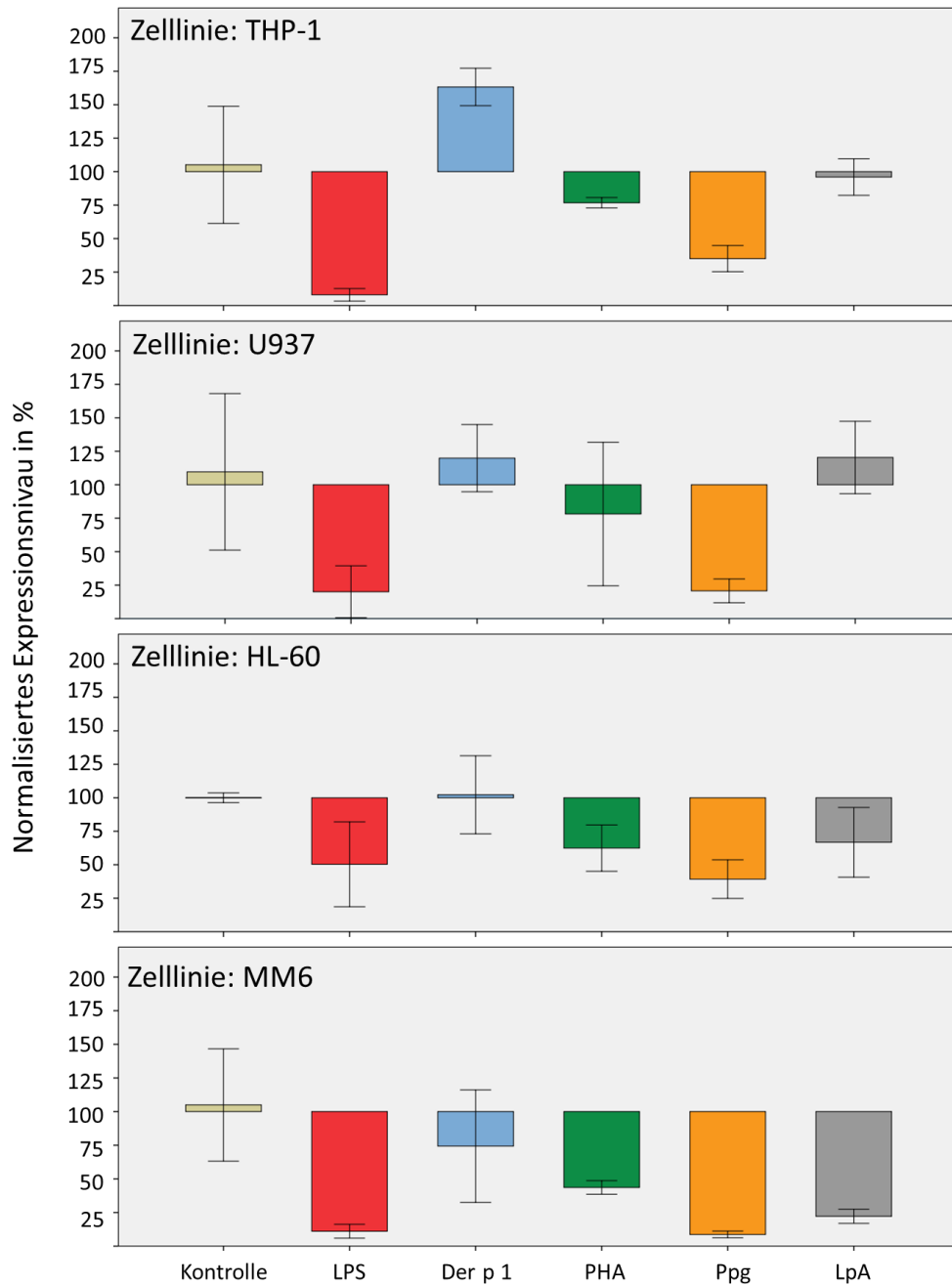
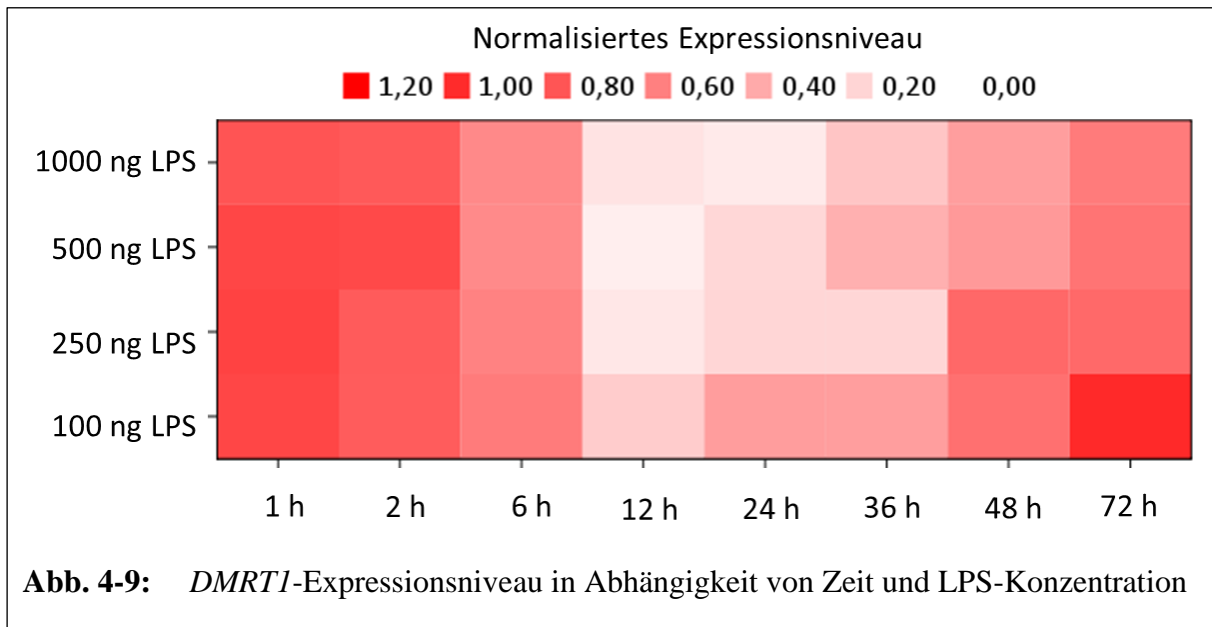


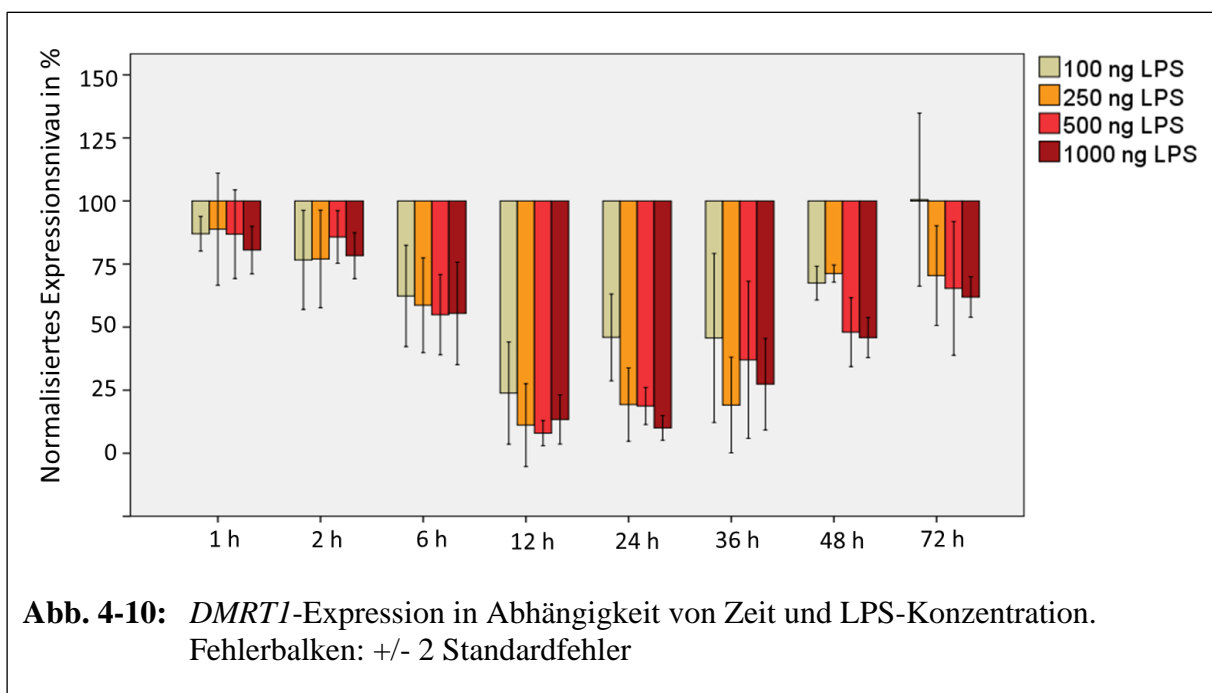
Abb. 4-8: Darstellung der *DMRT1*-Expression 24 Stunden nach Stimulation mit LPS, Der p 1, PHA, Ppg und LpA je Zelllinie. Fehlerbalken: +/- 2 Standardfehler

Um den nachgewiesenen LPS-Effekt auf THP-1-Zellen weiter zu charakterisieren wurden die *DMRT1*-Expression in Abhängigkeit der Zeit (1 bis 72 Stunden, 8 Zeitpunkte) und LPS-Konzentration (100 bis 1000 ng/ml, 4 Konzentrationen) bestimmt. Eine maximale *DMRT1*-Reduktion stellte sich im Zeitfenster von 12 bis 24 Stunden ein (vgl. Abb. 4-9). Der Effekt einer

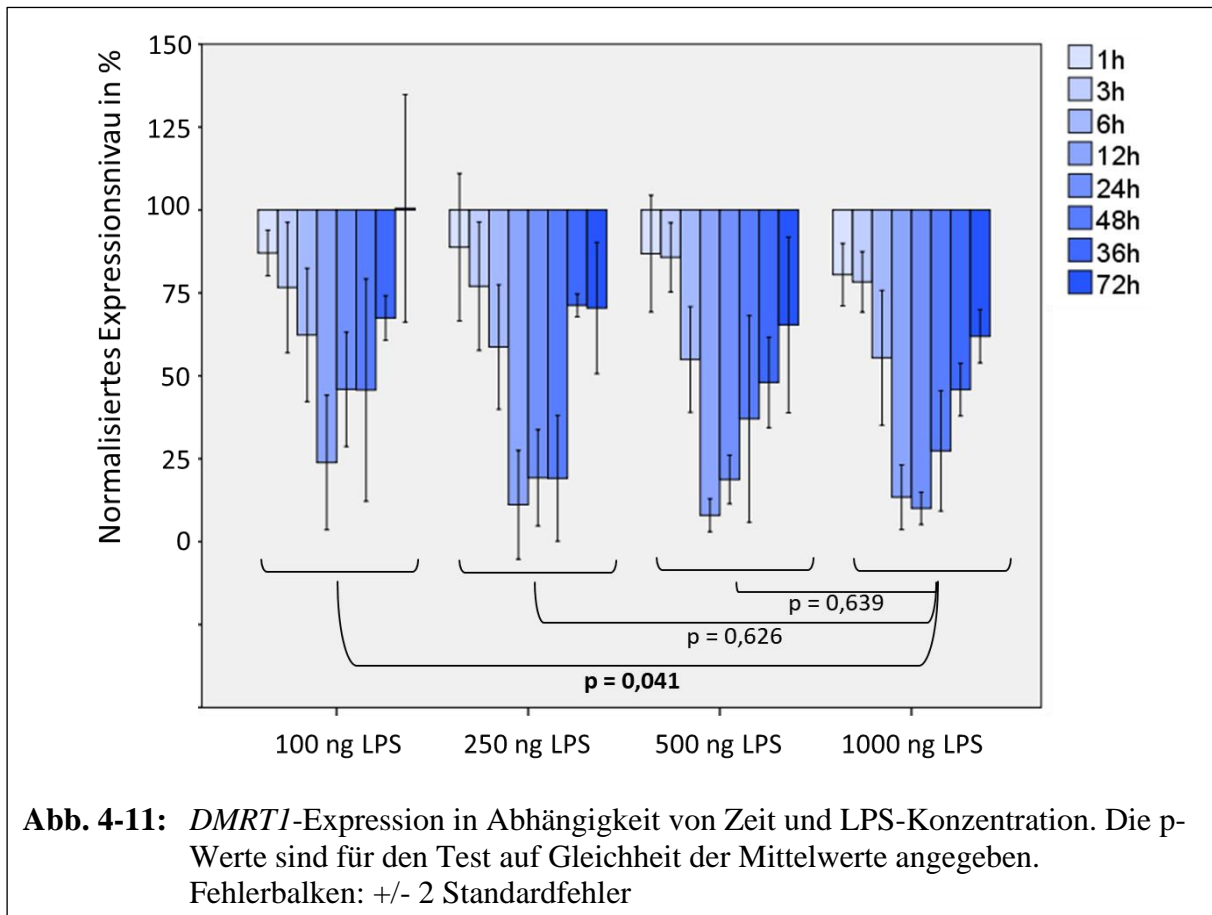
DMRT1-Reduktion trat nach Stimulation mit allen Konzentrationen von 100 ng bis 1000 ng/ml ein, zeigte sich dosisabhängig bei höheren LPS-Konzentrationen mit stärkerer Ausprägung und längerer Dauer (vgl. 48 und 72 Stunden bei 500-1000 ng/ml mit 100-250 ng/ml).



Die Reduktion der DMRT1-Expression erhöht sich nach Durchschreiten des Minimums zwischen 12 und 24 Stunden bei allen Simulationskonzentrationen wieder. Bei der Konzentration von 100 ng/ml LPS kehrt das Expressionsniveau nach 72 Stunden bis auf das Ausgangsniveau von nicht-stimulierten Zellen zurück (vgl. Abb. 4-10).

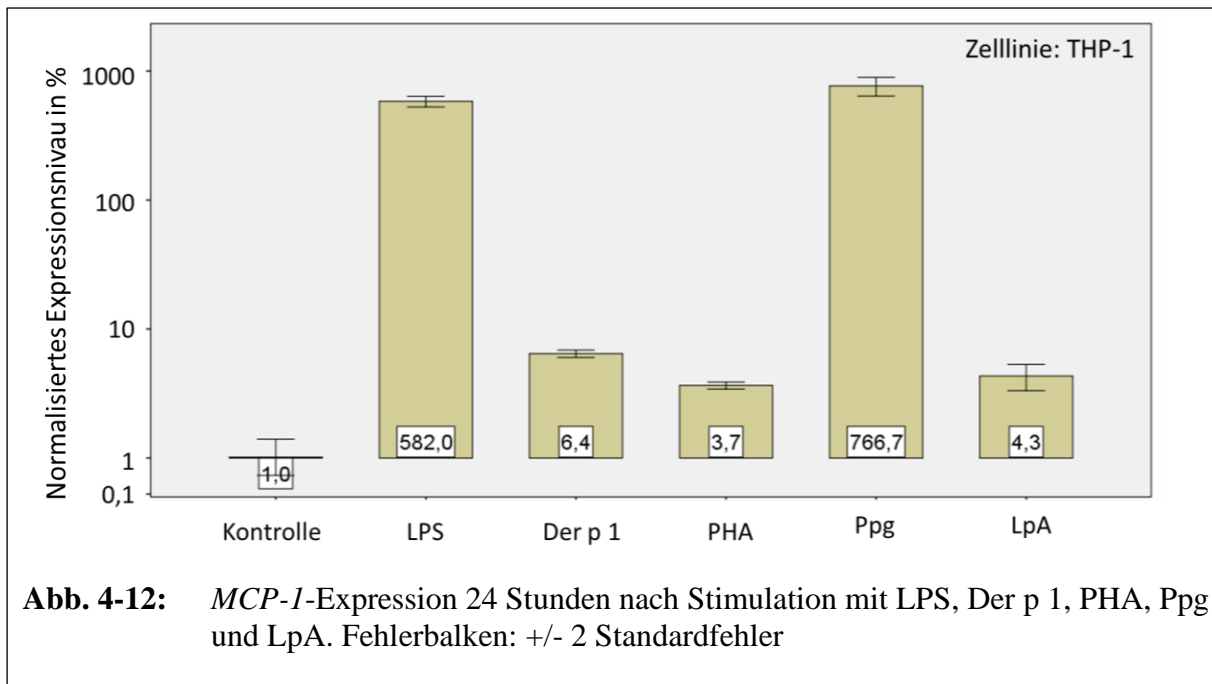


Beim Vergleich der unterschiedlichen LPS-Konzentrationen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der *DMRT1*-Reduktion zwischen 100 und 1000 ng/ml LPS, nicht aber zwischen 250 und 1000 ng/ml LPS (vgl. Abb. 4-11). Die maximale Reduktion der *DMRT1*-Expression scheint bei 250 ng/ml bereits gesättigt, höhere Konzentrationen an LPS führen zwar zu einer prolongierten Minderung der *DMRT1*-Expression, nicht aber zu einer insgesamt signifikant stärker ausgeprägten Verringerung der *DMRT1*-Expressionsreduktion.



4.4 MCP-I-Induktion durch LPS und Ppg

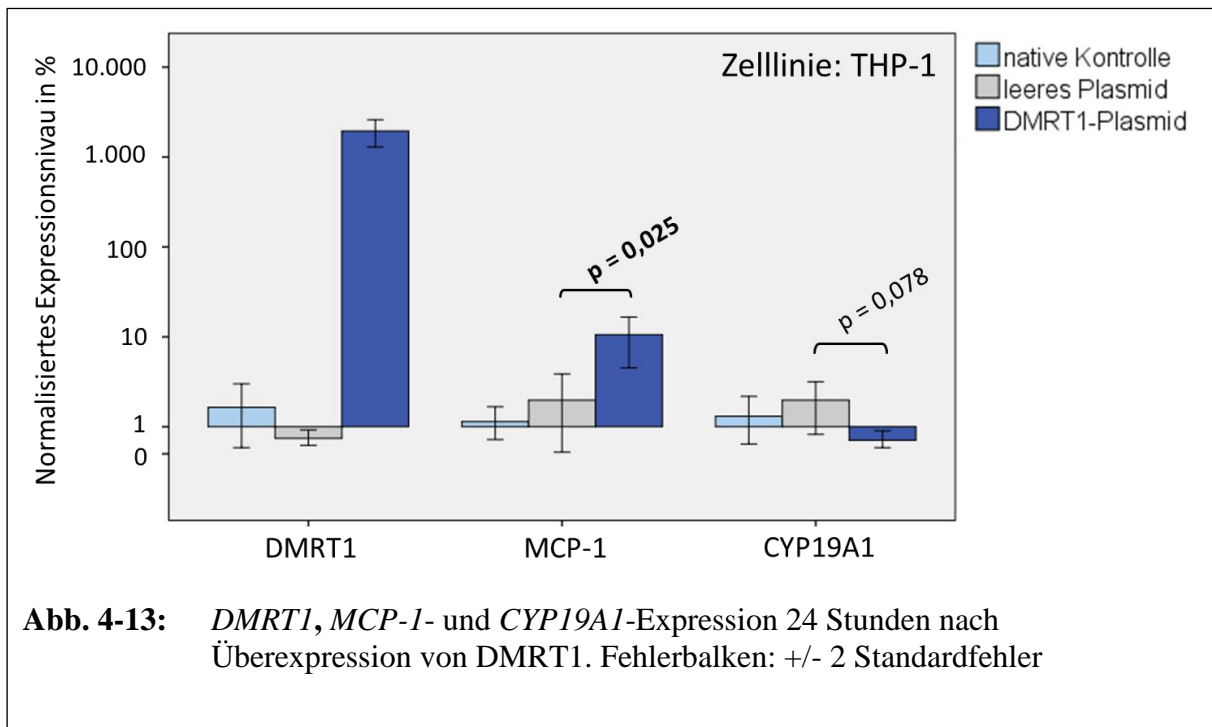
Da Zusammenhänge zwischen *DMRT1*-Varianten und einer veränderten *MCP-I*-Expression in PBMCs beschrieben sind, erfolgte darüber hinaus die Messung der *MCP-I*-Expression in den stimulierten THP-1 Zellen (identische Konzentrationen der Stimulantien).



Es zeigten sich die größten Effekte in den mit LPS oder Ppg stimulierten Zellen (vgl. Abb. 4-12). Interessanterweise sind LPS und Ppg jene Stimulantien, welche eine signifikante Reduktion der *DMRT1*-Expression zur Folge hatten (vgl. Abb. 4-8). Aus diesen Beobachtungen heraus stellte sich die Frage, ob umgekehrt eine Veränderung der *DMRT1*-Expression einen Effekt auf die *MCP-I*-Expression haben kann.

4.5 *DMRT1*-Überexpression erhöht *MCP-1*-Expressionsniveau

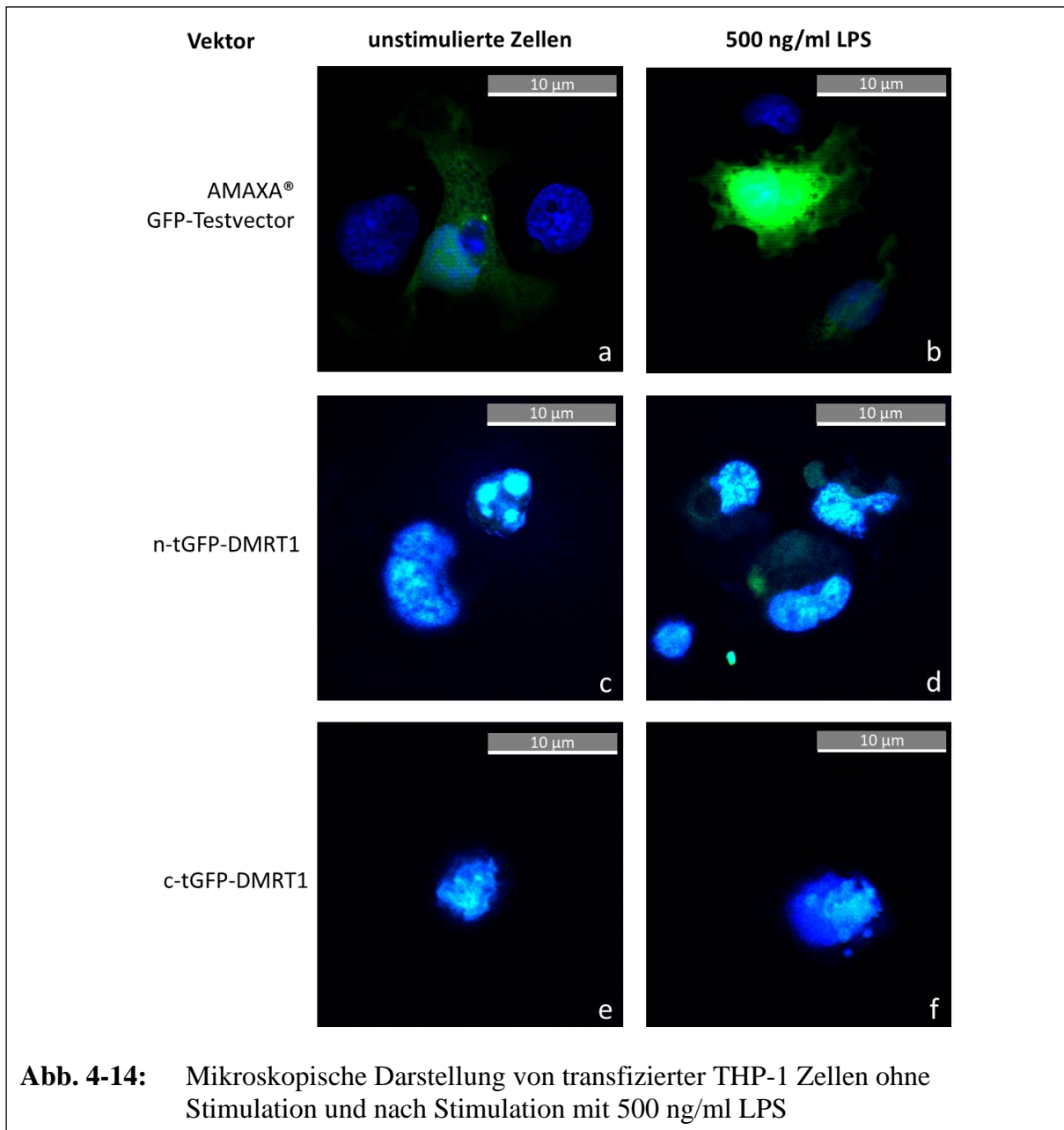
Die Transfektion von THP-1 Zellen mit *DMRT1*-Plasmiden führte zu einer Überexpression von *DMRT1* auf das 1946-fache des Ausgangsniveaus. Die *DMRT1*-Überexpression führte zu einer signifikanten Erhöhung der *MCP-1*-Expression auf das 12-fache des Ausgangsniveaus, gemessen 24 Stunden nach der Transfektion. Auf die Expression der Aromatase (*CYP19A1*) zeigte die *DMRT1*-Überexpression hingegen keinen signifikanten Effekt (vgl. Abb. 4-13).



Der Vergleich von nativen THP-1-Zellen zu einer Kontroll-Transfektion mit leeren Plasmiden ohne *DMRT1* zeigte keine signifikanten Effekte auf die *DMRT1*-, *MCP-1*- oder *CYP19A1*-Expression.

4.6 Lokalisation von tGFP-getaggttem DMRT1

Da sich in Voruntersuchungen DMRT1-Proteine immunhistochemisch vornehmlich im Zytoplasma von Alveolarmakrophagen darstellten und in dieser Arbeit Effekte von LPS auf die *DMRT1*-Expression gezeigt wurden, erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von *DMRT1* vor und nach Stimulation mit LPS. Mit *tGFP* markiertes *DMRT1* wurde im Zellkern der THP-1-Zellen nachgewiesen (Bild c und d, Abb. 4-14). Nach Stimulation mit LPS zeigte sich in vereinzelt Zellen ein grünes Fluoreszenzsignal außerhalb des blau fluoreszierenden Zellkerns (vgl. Bild d und f, Abb. 4-14).



Ein sicherer Nachweis von *t-GFP-DMRT1* im Zytoplasma von THP-1-Zellen konnte jedoch aufgrund der geringen Transfektionseffizienz von 4 - 7 % nicht erfolgen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit den vorgestellten Experimenten in Sputum und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien wurden Funktionen von *DMRT1* in Alveolarmakrophagen, die mit geschlechtsspezifischen Effekten bei Asthma in Verbindung gebracht werden, erstmals funktionell untersucht. Insgesamt zeigte sich eine Expression von *DMRT1* sowohl in Sputum als auch in Makrophagen-ähnlichen Zelllinien, welche sich in Zelllinien nach Stimulation mit den bakteriellen Endotoxinen LPS und Ppg signifikant verminderte (Hypothese 1 und 2). Die Expressionsminderung von *DMRT1* nach Stimulation mit LPS zeigte zwischen 100 und 1000 ng/ml ein dosisabhängiges Verhalten mit Sättigung ab 250 ng/ml LPS und stieg nach Durchschreiten des Expressionsminimums zwischen 12 und 24 Stunden nach 72 Stunden zurück bis auf das Ursprungsniveau an.

Eine Beeinflussung der *DMRT1*-Expression durch Geschlechtshormone, wie sie im Hodengewebe beschrieben ist, ließ sich in Makrophagen-ähnlichen Zelllinien nicht nachweisen (Hypothese 3). Jedoch war eine geringe, signifikante Reduktion der *DMRT1*-Expression in Zellkulturmedium mit aktivkohlegefiltertem FBS zu beobachten, welche sich bei der weiblichen HL-60-Zelllinie zeigte und nicht bei der männlichen THP-1-Zelllinie. Die Frage nach einer Translokation von tGFP markierten *DMRT1*-Proteinen aus dem Zellkern in das Zytoplasma nach Stimulation (Hypothese 5), ließ sich technisch bedingt nicht sicher beantworten. Eine plasmidvermittelte Überexpression von *DMRT1* führte zu einer 12-fach verstärkten Expression des Chemokins *MCP-1*, nicht aber zu einer signifikanten Veränderung der Aromatase-Expression (Hypothese 4).

In der Zusammenschau lassen diese Ergebnisse eine Interaktion von *DMRT1* mit dem Steroidhormonmetabolismus in Makrophagen unwahrscheinlich erscheinen und zeigen vielmehr erstmalig einen funktionellen Zusammenhang von *DMRT1* mit Immunfunktionen in Makrophagen auf.

5.2 *DMRT1*-Expression in Sputum und Makrophagen

Eine Bestimmung der *DMRT1*-Expression in Sputum-Zellen erfolgte bisher nicht und erbrachte in dieser Arbeit erstmals den Nachweis einer geringen *DMRT1*-Expression in Zellen aus induziertem Sputum. Dieses Ergebnis lässt sich mit dem 2016 durch Schieck et al. erfolgten immunhistochemischen Nachweis von *DMRT1*-Proteinen in Alveolarmakrophagen gut in Einklang bringen (56). Bis heute (Stand Mai 2019) existieren keine weiteren Publikationen, die sich mit direkten immunologischen *DMRT1*-Funktionen oder *DMRT1*-Funktionen in Makrophagen oder anderen Zellen des Immunsystems beschäftigen.

Aufgrund der in den letzten Jahren zunehmenden Verwendung von Hochdurchsatzverfahren, bei welchen das gesamte Transkriptom untersucht wird, liegen Expressionsdaten zu *DMRT1* in diversen Geweben und Zellen vor. Der Expressionsatlas des EBI (European Bioinformatics Institute) bündelt die Expressionsdaten publizierter Experimente zusammen mit bereits bestehenden Datenbanken, wie dem HPA (Human Protein Atlas), der HDBR (Human Developmental Biology Resource) oder dem FANTOM5-Projekt. Hier zeigt sich ein geringes Expressionsniveau von *DMRT1* beispielsweise in der fetalen Lunge (0,003 RPKM, Reads per Kilobase Million) und der erwachsenen Trachea (0,009 RPKM) (171,172). Allerdings lässt sich eine *DMRT1*-Expression nicht nur im Hodengewebe (5-65 TPM, Transcripts per Million) und der Lunge nachweisen, sondern auch in Schilddrüse (0,4 TPM) und Nebenschilddrüse (0,1 TPM) (173,174). Im Plexus choroideus des fetalen Gehirns fand sich eine vergleichsweise hohe *DMRT1*-Expression (bis 5 TPM) (175). Eine auf Lungen und Hoden beschränkte Funktion von *DMRT1* ist somit nicht anzunehmen. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da für Transkriptionsfaktoren allgemein zellspezifisch unterschiedliche Funktionen bekannt sind (176,177). Die Datenbank des HPA listet darüber hinaus 64 humane Zelllinien, für welche *DMRT1*-Expressionsdaten vorliegen, neun davon mit einer *DMRT1*-Expression über der Nachweisgrenze. Hier wird für U937-Zellen eine geringe *DMRT1*-Expression (0,3 TPM) angegeben, für THP-1 und HL-60-Zellen zeigte sich keine *DMRT1*-Expression. MM6-Zellen wurden nicht untersucht. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten wird auch für HEK293-Zellen eine sehr geringe *DMRT1*-Expression (0,1 TPM) angegeben. In Antikörperfärbungen aus dem HPA zeigte sich in einem von insgesamt neun Lungenschnitten eine schwache *DMRT1*-Anfärbung in Alveolarmakrophagen. Informationen zu möglicherweise vorliegenden Atemwegserkrankungen der Spender liefert die Datenbank leider nicht, alle neun Spender waren erwachsen. Diese Daten zeigen zusammen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, dass *DMRT1* in Makrophagen-ähnlichen Zelllinien nahe an

der Nachweisgrenze exprimiert wird und darüber hinaus nicht nur in Alveolarmakrophagen eine geringe Expression zeigt, sondern auch in einer Reihe anderer Zellen und Gewebe.

Die beobachteten Expressionsdaten führen zu der berechtigten Frage, ob eine *DMRT1*-Expression nahe der Nachweisgrenze in Makrophagen überhaupt relevante Effekte ausüben kann. Eine verbreitete qPCR-Daumenregel besagt, dass ein Gen mit einer relevanten Funktion ein qPCR-Signal bis zum 35. Zyklus zeigen sollte, schließlich sind rechnerisch bei Signalen nach dem 35. Zyklus – bei regelrechter Assay-Effizienz und nach Ausschluss potenzieller Fehlerquellen – nur vereinzelte Transkripte des Gens im Sample enthalten (178). Ein Nature Review von 2013 beschreibt, dass auch einzelne mRNA-Moleküle ausreichen, um eine Translation korrespondierender Proteine zu ermöglichen (179). Die Wahrscheinlichkeit eines Protein-Nachweises liegt bei 10-20 %, auch wenn nur ein mRNA-Molekül pro Zelle vorliegt. Transkriptionsfaktoren gehören zu den Genen, welche im Vergleich zu anderen Gengruppen das durchschnittlich geringste Expressionsniveau aufweisen. Transkriptionsfaktoren sind vielfach geringer exprimiert als Struktur- oder Membranproteine (180). Durch regulatorische Kaskaden-Effekte kann sich die Wirkung von Transkriptionsfaktoren multiplizieren. Ein niedriges Expressionsniveau ist somit kein Ausschlusskriterium für *DMRT1*-Effekte in Makrophagen.

Darüber hinaus zeigt sich *DMRT1* nicht in allen Sputum-Zellen exprimiert, sondern ausschließlich in Alveolarmakrophagen oder möglicherweise in einem bestimmten Alveolarmakrophagen-Phänotyp. Die Tatsache, dass sich *DMRT1* nur in wenigen Spendern nachweisen lässt, kann auch darin begründet liegen, dass *DMRT1* nur in einer distinkten Gruppe – zum Beispiel in männlichen Stadt-Kindern – ausreichend hoch exprimiert ist und dadurch die Asthma-Pathogenese in Abhängigkeit bestehender SNPs geschlechtsspezifisch beeinflusst.

Um die relevante Probanden- und Zellpopulation zu identifizieren, stellt die Analyse selektierter Alveolarmakrophagen und die Einzelzellanalyse aussichtsreiche Perspektiven dar. In dieser Arbeit erfolgte die Selektion der Sputum-Zellen mittels Adhärenz, die Verifizierung des Alveolarmakrophagen-Anteils mittels Phagozytose-Assay.

5.3 Makrophagen-Anteil in Sputum-Zellen

Bezogen auf die Sputum-Induktionen der Spender 1 bis 3 zeigte sich ein Phagozyten-Anteil von insgesamt 43-58 %, in der adhärenen Zellfraktion von 76-83 %. Eine Selektion von Sputum-Zellen und der Vergleich des Phagozyten-Anteils in beiden Zell-Fraktionen erfolgte in dieser Arbeit zum ersten Mal. Im Jahr 2000 zeigte eine Analyse von Sputum-Zellen 96 gesunder, erwachsener Nichtraucher durch Färbung und manuelle Auszählung unter dem Mikroskop einen Makrophagen-Anteil von insgesamt 58,8/60,8 % (Durchschnitt/Median) in induziertem Sputum (181). Den zweitgrößten Anteil an Sputum-Zellen stellten in dieser Studie neutrophile Granulozyten mit 37,5/36,7 % dar. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2013 mit 69 ebenfalls gesunden, erwachsenen, nichtrauchenden Sputum-Spendern fand 43,0/39,3 % (Durchschnitt/Median) Makrophagen und 50,3/51,9 % neutrophile Granulozyten in induziertem Sputum. In beiden Studien wurde die gleiche Methode zur Sputum-Induktion wie in dieser Arbeit verwendet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit den Daten dieser Studien vereinbar, auch wenn ein Teil der phagozytierenden Zellen nicht den Alveolarmakrophagen zugerechnet werden darf, sondern in die Gruppe der neutrophilen Granulozyten fällt (182). Der Anteil viabler Zellen stellte sich mit 68-83 % nach Induktion auf einem vergleichbaren Niveau mit bereits veröffentlichten Ergebnissen dar. Hier variierte die Viabilität der Sputum-Zellen zwischen 23 und 96 %.

Hinsichtlich des Anteils an Microspheres-phagozytierenden Sputum-Zellen zeigten sich in der adhärenen Zell-Fraktion mehr Phagozyten (76 - 83 %) als bei den nicht-adhärenen Sputum-Zellen in Suspension (12 - 22 %). Da Makrophagen typischerweise ein adhärenes und phagozytierendes Verhalten aufweisen, stellten die adhärenen Zellen wie erwartet die selektierte Zell-Fraktion dar, in welcher eine weitere Charakterisierung der *DMRT1*-Expression erfolgen könnte. Der größte Vorteil einer Makrophagen-Selektion durch Adhärenz ist die simple Umsetzung ohne großen technischen Aufwand. Nachteile stellen die mögliche Aktivierung der Makrophagen und dadurch potenzielle Verfälschung von Messungen dar. Weiter besteht aufgrund der notwendigen Inkubationszeit die Gefahr einer reduzierten Zellviabilität bei suboptimalen Kulturbedingungen. Diese Tatsache hat in der vorliegenden Arbeit dazu geführt, dass geplante Downstream-Experimente nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Daher bedarf es entweder einer weiteren Optimierung der Kulturbedingungen für primäre Sputum-Zellen oder der Verwendung alternativer Methoden zur Anreicherung/Selektion von Alveolarmakrophagen aus induziertem Sputum (vgl. Abschnitt 5.5.2).

5.4 Stimulations- und Überexpressionsexperimente

5.4.1 Stimulation mit Geschlechtshormonen

Die Stimulation von Zelllinien mit Geschlechtshormonen führte zu keiner Veränderung der *DMRT1*-Expression. Die Literatur zu *DMRT1*-Genfunktionen beschäftigt sich aktuell vornehmlich mit Zusammenhängen zur Geschlechtsdifferenzierung- und Entwicklung, wobei die Rolle von Geschlechtshormonen mituntersucht wird. Exemplarisch zeigt eine Studie aus dem Jahr 2018, wie Abwasser-Rückstände oraler Kontrazeptiva (Östrogene) die *DMRT1*-Expression in Fisch-Gonaden vermindert, somit die Geschlechtsdifferenzierung der Nachkommen beeinflusst und zu einer Verweiblichung mit konsekutiver Reduzierung der Fischbestände führen kann (183). Zentrales Schaltenzym in diesem Prozess ist die Aromatase, welche die Umwandlung von Androgenen in Östrogene katalysiert (184). Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben zeigen zahlreiche Studien, dass Geschlechtshormone auch die Immunfunktion von Makrophagen beeinflussen. Die Effekte von Geschlechtshormonen auf Makrophagen wurden bereits in Bezug auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei Asthma als relevanter Faktor diskutiert (94). In den Zelllinien-Experimenten dieser Arbeit scheint *DMRT1* in diesen Prozess nicht involviert zu sein. Die *DMRT1*-Überexpressionsexperimente legen nahe, dass eine Interaktion von *DMRT1* und Aromatase in Makrophagen – anders als in gonadalen Zellen – nicht zu bestehen scheint. Die Beeinflussung der *DMRT1*-Expression durch Geschlechtshormone und vice versa in Zellen des reproduktiven Systems, nicht aber in Makrophagen, liefert ein weiteres Beispiel für die zellspezifische Funktion von Transkriptionsfaktoren.

Eine geringer, aber signifikanter Unterschied der *DMRT1*-Expression zeigte sich in HL-60-Zellen beim Vergleich von Zellkulturmedium mit regulärem FBS und aktivkohlegefiltertem FBS. Dieser Effekt war in THP-1-Zellen nicht nachweisbar. Da FBS selbst Steroidhormone enthält, wurde das aktivkohlegefilterte FBS als Kontrolle und für die Hormonstimulationen verwendet. Die Filterung entfernt allerdings nicht nur Geschlechtshormone, sondern alle Steroidhormone (auch Glukokortikoide und Mineralokortikoide) sowie möglicherweise im Serum enthaltene Medikamente, Pestizide, Halogenkohlenwasserstoffe und Schwermetalle (185,186). Es bleibt unklar, welche Substanzen im Serum die erhöhte *DMRT1*-Expression in HL-60-Zellen bedingen. Die Verwendung unterschiedlichen Serums/Zellkulturmediums könnte erklären, warum in manchen Makrophagen-Zelllinien der HPA-Datenbank im Gegensatz zu dieser Arbeit keine *DMRT1*-Expression gefunden wurde. Ein

geschlechtsspezifischer Effekt könnte vermutet werden, da es sich bei HL-60 um eine weibliche und bei THP-1 um eine männliche Zelllinie handelt, jedoch zeigte sich der gemessene Effekt vielfach kleiner als unter Stimulation mit LPS oder Ppg.

5.4.2 Immunstimulation und *DMRT1*-Expression

In Makrophagen-Zelllinien führte die Stimulation mit den bakteriellen Endotoxinen LPS und Ppg zu einer verminderten *DMRT1*-Expression. Dieser Effekt zeigte sich dosisabhängig und reversibel sowie in vier Makrophagen-ähnlichen Zelllinien konsistent. Interessanterweise wurden unter Stimulation mit Lipid A (LpA) keine signifikanten Effekte auf die *DMRT1*-Expression gemessen. LPS besteht als amphiphiles Molekül aus einem hydrophoben Membrananker (LpA), einer Kernregion und einem variablen hydrophilen Polysaccharid-Antigen. LpA wird als eigenständig immunologisch wirksamer, pyogener LPS-Bestandteil beschrieben (187–189), Jedoch erfolgt eine Aktivierung des CD14/TLR-4/MD-2-Rezeptorkomplexes mit Zytokin-Induktion durch LPS, welches an LBP gekoppelt ist (192). Dieser Weg scheint sowohl für die Steigerung der *MCP*- als auch für die Reduktion der *DMRT1*-Expression von Bedeutung zu sein.

LBP gehört wie weitere PGRPs (eng. Peptidoglycan recognition proteins) zu den Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) des angeborenen Immunsystems. Obwohl die Interaktion verschiedener PGRPs mit Peptidoglykanen weniger gut untersucht ist als die Interaktion von LPS mit LBP, scheint auch die Bindung von Ppg an PGRPs zur Induktion von Zytokinen und zu einer TLR-4-Aktivierung zu führen (194,195). Vor diesem Hintergrund erscheint es logisch, dass sowohl die Stimulation mit LPS als auch mit Ppg zu einer deutlichen Erhöhung der *MCP-1*- und Verminderung der *DMRT1*-Expression führte. Dieser vorgestellte Zusammenhang zwischen *DMRT1* und bakteriellen Endotoxinen in Makrophagen ist völlig neu und führt zu der Frage, in welcher Form eine geschlechtsspezifische Beeinflussung der Asthma-Pathogenese hierdurch möglich ist.

Diese Arbeit zeigte, dass eine Plasmid-vermittelte *DMRT1*-Überexpression die *MCP-1*-Expression erhöhte, somit könnte eine geschlechtsspezifische *DMRT1*-Expression bereits ohne den Einfluss von Endotoxinen die Zytokin-Level und dadurch die Immunantwort modulieren. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der LPS-Stimulation könnte spekuliert werden, ob

Endotoxine nicht direkt, sondern durch erhöhte Zytokin-Level im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus zur Reduktion der *DMRT1*-Expression führen (vgl. Abb. 5-1).

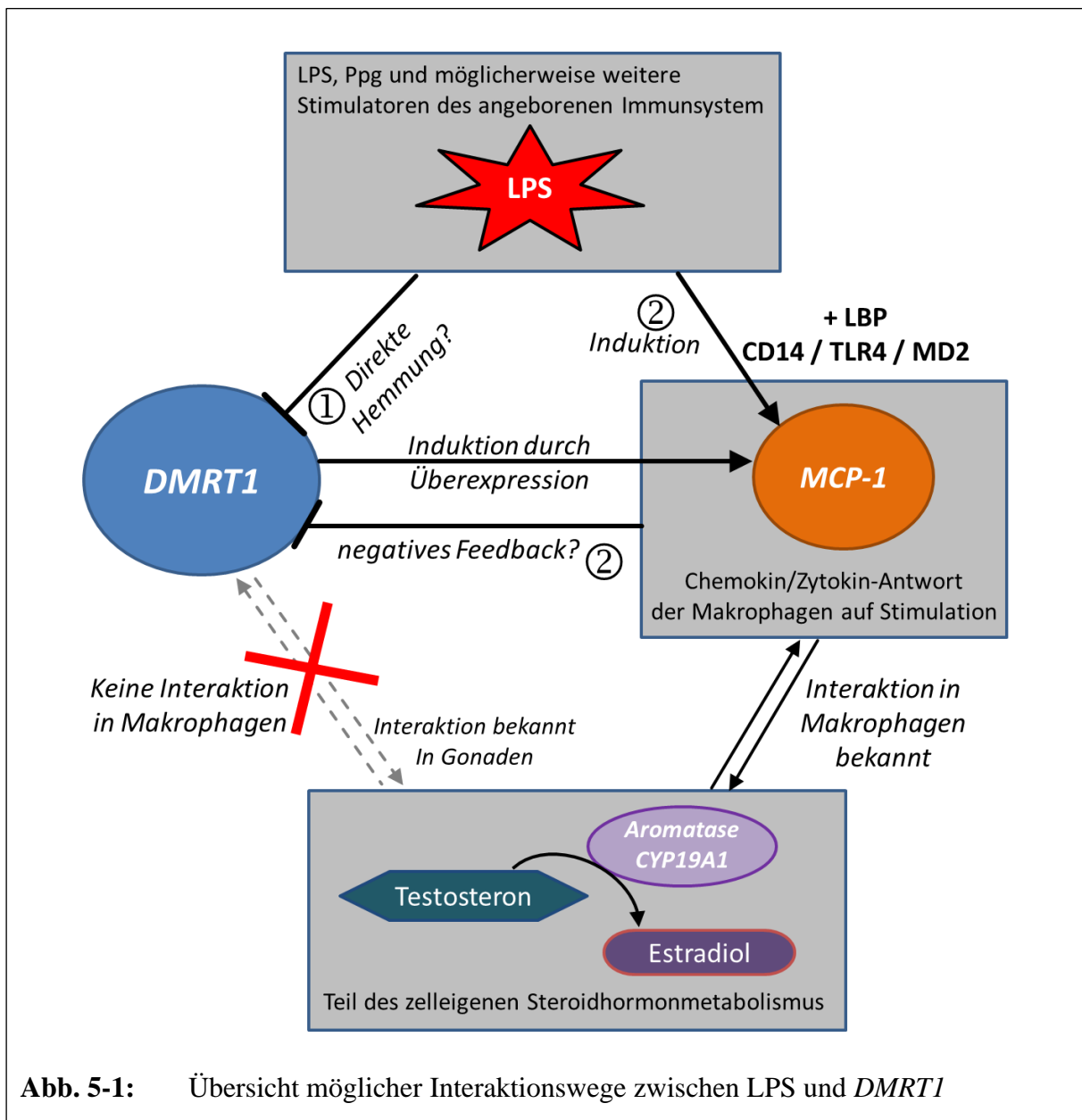


Abb. 5-1: Übersicht möglicher Interaktionswege zwischen LPS und *DMRT1*

Die Beeinflussung der *DMRT1*-Expression durch Endotoxine macht *DMRT1* besonders in Populationen mit geringer und hoher Endotoxin-Exposition zu einem interessanten Kandidaten für geschlechtsspezifische Asthma-Effekte. So könnten sich relevante geschlechtsspezifische *DMRT1*-Effekte auf die Asthmapathogenese bei separater Untersuchung dieser beiden Populationsgruppen demaskieren. Schieck et al. haben die Möglichkeit populationspezifischer Umweltfaktoren (z.B. viele Stadt-Kinder) bereits bei heterogenen Interaktionsergebnissen zwischen verschiedenen Populationen diskutiert. Die Demaskierung Endotoxin-vermittelter

DMRT1-Effekte könnte durch eine genomweite Interaktionsstudie zwischen Geschlecht und Asthma geschehen, bei welcher die Unterscheidung von LPS-exponierten Kindern aus bäuerlichem Umfeld und Stadt-Kindern mit geringer LPS-Exposition erfolgt. Die Untersuchung primärer Alveolarmakrophagen von Kindern aus diesen beiden Gruppen wäre der nächste Schritt, um *DMRT1*-Effekte auf Asthma noch genauer zu charakterisieren.

5.5 Methodische Limitationen und Perspektiven

5.5.1 Induziertes Sputum

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Sputum-Induktion mittels ultraschallvernebelter hypertoner Kochsalzlösung gilt zwar als das aktuell beste nichtinvasive Verfahren, um Sputum-Zellen zu gewinnen (190), dennoch ist diese Methode erheblich von der Mitarbeit des Sputum-Spenders sowie vom durchführenden Untersucher abhängig. Das Ergebnis kann somit hohen Qualitätsschwankungen unterliegen (191). Bereits geringe, für den Spender unwesentlich erscheinende, Abweichungen des 40 Minuten dauernden Protokolls, wie beispielsweise ein inkorrektes Bedienen des Salbutamol-Inhalators, ein zu oberflächliches Husten oder das unzureichende Spülen des Mundraums, führen zu einer verminderten Qualität des Sputums. Dies bewirkt Unterschiede in Zellzahl, Viabilität und Häufigkeit der Zelltypen (z.B. viele Epithelzellen durch hohen Speichelanteil). Ebenso wird bei der Selektion der Sputum-Plugs auf Eis ein erfahrener und zügig arbeitender Untersucher benötigt, da sowohl eine zu geringe Zahl an isolierten Sputum-Plugs als auch eine zu lange Dauer auf Eis die Anzahl und Viabilität der gewonnenen Zellen negativ beeinflussen.

Als nicht-invasive, alternative Methoden zur Sputum-Induktion stehen diverse Massagetechniken des Thorax ohne die Inhalation hypertoner Kochsalzlösung zur Verfügung, welche weniger gute Ergebnisse zu liefern scheinen und gleichzeitig vergleichbare Nachteile wie die hier verwendete Methode aufweisen (190). Im Gegensatz dazu stellt die bronchoalveoläre Lavage (BAL) eine invasive Methode dar, um Tracheobronchialsekret zu gewinnen (193). Bei der Gewinnung von Tracheobronchialsekret besteht keine Gefahr einer Verunreinigung mit Speichel und Zellen des Nasen-Rachen-Mundraumes, da es im Gegensatz zu induziertem Sputum nicht mit Speichel in Kontakt kommt. Zudem ist diese Methode vollkommen unabhängig von der Mitarbeit des Spenders. Nachteile sind allerdings das vergleichsweise höhere Komplikationsrisiko, die höhere Invasivität, der technische, personelle und finanzielle Mehraufwand sowie die erforderliche Sedierung des Spenders. Vor diesem Hintergrund ist es ethisch indiskutabel, ohne klare medizinische Indikation Material mittels invasiver BAL bei Kindern zu reinen Forschungszwecken gewinnen. Aufgrund dieser Nachteile wird in Zukunft am ehesten die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Sputum-Induktion weiter Anwendung finden, jedoch bedarf es einer Ausweitung der Studienteilnehmer. Für diese Arbeit standen zehn freiwillige, volljährige Probanden zur Verfügung. Die Induktion von Sputum erwachsener Probanden, davon zwei Asthmatiker und acht Probanden ohne

Asthma, stellt einen ersten notwendigen Schritt zur Untersuchung potenzieller *DMRT1*-Funktionen in Sputum-Zellen dar. Die genomweite Assoziationsstudie, welche auf geschlechtsspezifische *DMRT1*-Funktionen hinwies, basierte allerdings auf den Daten kindlicher Asthma-Phänotypen. Falls *DMRT1* vornehmlich in Alveolarmakrophagen von Kindern eine relevante Rolle spielt, übersähe die alleinige Testung erwachsenen Sputums mögliche ausgeprägtere *DMRT1*-Effekte. Daher bedarf es einer Ausweitung der Untersuchungen von Sputum-Makrophagen auf Kinder mit und ohne Asthma.

5.5.2 Phagozytose-Assay

Der durchgeführte Phagozytose-Assay diente in dieser Arbeit dazu, in induziertem Sputum den Anteil an phagozytierenden Zellen und somit näherungsweise die Zahl der Makrophagen im Sputum zu messen. Trotz der Gegebenheit, dass Makrophagen hochspezialisierte Phagozyten sind, Zellschrott und Antigene aufnehmen und anschließend Fragmente des phagozytierten Materials anderen Immunzellen präsentieren, kann eine exakte Bestimmung des Makrophagen-Anteils mit der verwendeten Methode (Bestimmung des Adhärenz- und Phagozytose-Verhalten) nur unter gewissen Vorbehalten erfolgen. Dies ist allem voran der Tatsache geschuldet, dass Makrophagen eine heterogene Zellgruppe darstellen (wie in Abschnitt 1.5 vorgestellt). Bestimmte Makrophagen-Phänotypen zeigten unter pathologischen Bedingungen ein verringertes oder völlig fehlendes Phagozytose- oder Adhärenz-Verhalten (169,170,196,197). So sind bei Asthma, COPD oder zystischer Fibrose dysfunktionale Makrophagen beschrieben worden, deren fehlendes Phagozytose-Verhalten mit pathologisch verringerter Expression von Phagozytose-Rezeptoren, extremem oxidativem Stress und spezifisch veränderten Makrophagen-Phänotypen zu erklären versucht wird. Zum anderen wird eine exakte Messung des Makrophagen-Anteils dadurch erschwert, dass es bestimmte Zellen in induziertem Sputum gibt, die zwar zur Phagozytose befähigt sind, nicht aber den Makrophagen zugerechnet werden dürfen. Beispielsweise gehören in diese Gruppe neutrophile Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen, von welchen die neutrophilen Granulozyten mit 10,4-50,3 % der Zellen in induziertem Sputum gesunder, erwachsener, nichtrauchender Probanden die häufigsten Vertreter darstellen (181,198–200). Eine Studie aus 2017 zeigte mittels durchflusszytometrischer Analyse induzierter Sputum-Zellen, dass auch 5-50 % der neutrophilen Granulozyten fluoreszierende Microbeads phagozytieren können (201). Leider wurden in der Studie ausschließlich neutrophile Granulozyten und keine Makrophagen aus

induziertem Sputum untersucht. Ein weiterer Nachteil des Phagozytose-Assays ist die in dieser Arbeit verwendete untersucherabhängige Auswertung durch manuelles Auszählen der fluoreszierenden Zellen unter dem Mikroskop. Besonders bei geringer Zell-Viabilität wurde beobachtet, dass sich die Unterschiede beim Auszählen der Zelle zwischen Untersuchern vergrößern (202). Alternativ stehen automatisierte Zählverfahren zur Verfügung wie beispielsweise der für diese Arbeit verfügbare automatisierte Zellzähler „Countess II“ von Thermofisher. Jedoch konnte der Zellzähler nicht für die Auszählung von Sputum-Zellen verwendet werden, da diese aufgrund ihrer sehr variablen Morphologie trotz angepasster Geräteeinstellungen nicht korrekt erkannt und gezählt wurden. So wurden einzelne Epithelzellen aufgrund ihrer Größe als mehrere eigenständige Zellen identifiziert und verfälschten damit die Messergebnisse in nicht mehr akzeptablem Ausmaß. Eine weitere untersucherabhängige Methode stellt das durchflusszytometrische Messen der fluoreszierenden Zellen dar. Hierbei kann eine Differenzierung verschiedener Zelltypen erfolgen und gleichzeitig durch Immunphänotypisierung das Auftreten bestimmter Zell-Phänotypen einzelnen Patientengruppen zugeordnet werden (203). Allerdings ist diese Methode erheblich aufwendiger und teurer. Zudem kann bei Verwendung fluoreszierender Microspheres auch mit einer Reihe an Vorkehrungen nicht ausgeschlossen werden, dass fälschlicherweise Zellen oder Zellschrott mit anhaftenden fluoreszierenden Partikeln oder aggregierte Partikel mitgezählt werden.

Folglich stellt der verwendete Phagozytose-Assay zur Bestimmung des Makrophagen- bzw. Phagozyten-Anteils in induzierten Sputum-Zellen einen vernünftigen Kompromiss aus Praktikabilität und ausreichender Genauigkeit dar. In Zukunft könnte eine auf den Phagozytose-Assay folgende Bestimmung der *DMRT1*-Expression in den verschiedenen Zell-Fractionen eine interessante Perspektive sein. In dieser Arbeit gelang dies nicht, da sich der Anteil an viablen Zellen nach Durchführung des Phagozytose-Assays mit 45-63 % als gering darstellte und eine PCR-Analyse der phagozytierenden Zell-Fraktion als Downstream-Experiment aufgrund zu niedriger RNA-Erträge keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern würde. Der verhältnismäßig hohe Anteil an nicht mehr viablen Sputum-Zellen könnte einerseits an den temporären zellschädigenden Bedingungen während der Sputum-Induktion liegen und andererseits durch nicht optimale Kulturbedingungen für primäre Makrophagen nach der Sputum-Induktion verursacht worden sein. In einem Methoden-Paper wurde als Kriterium für den Start der Kultivierung von Sputum-Makrophagen ein Anteil an viablen Makrophagen von mindestens 40 % gewählt (204). Dieser niedrige Wert spiegelt den großen Anteil an Zellen

wieder, welcher durch die Prozedur der Induktion und Selektion geschädigt wurde. Es besteht daher bei dieser Methode nicht nur eine hohe Heterogenität der Sputum-Qualität, sondern möglicherweise auch ein noch nicht ausgeschöpftes Optimierungspotential. Dieses Potential zeigt sich auch in der geringen Zahl an Publikationen, die sich der Kultivierung primärer Sputum-Zellen widmet. Der größte Teil der Literatur zu induziertem Sputum befasst sich mit der Kultivierung von Krankheitserregern daraus. Diese stellen häufig auch erheblich geringere Anforderungen an die Kulturbedingungen als humane Sputum-Zellen. Darüber hinaus werden in den hierzu vorliegenden Publikationen unterschiedliche Herangehensweisen in Bezug auf das verwendete Serum (human oder bovin), das verwendete Nährmedium (Glukosegehalt) und die verwendeten Antibiotika verfolgt (204–206). In dieser Arbeit wurde humanes Serum zusammen mit der Nährlösung RPMI 1640 GlutaMAX verwendet, welches sich gemäß den Herstellerangaben für die Kultivierung primärer humaner Makrophagen eignet (207). Obwohl bekannt ist, dass induziertes Sputum mit Keimen und potentiellen Pathogenen aus dem Oropharyngealraum kontaminiert ist (208), wurde auf die Zugabe eines Antibiotikums aufgrund der kurzen Inkubationszeit von 4 Stunden verzichtet.

Es bedarf also in Zukunft entweder verbesserter Kulturbedingungen während der Inkubationszeit des Phagozytose-Assays sowie schonenderer Gewinnungsverfahren der Alveolarmakrophagen, um verlässliche Aussagen aus Downstream-Experimenten treffen zu können, oder eine andere methodische Herangehensweise ist gefragt. Vertreter alternativer Methoden zur Selektion bzw. Identifizierung von Sputum-Makrophagen stellen die Einzelzellanalyse (engl. single cell analysis) oder antikörperbasierte Selektionsverfahren wie das MACS (eng. magnetic activated cell sorting) oder Immunodensity-Verfahren dar.

Bei den beiden erstgenannten Verfahren würde sich eine Negativselektion mit Antikörpern gegen Epithelzellen (Anti-CD326, EpCAM, engl. epithelial cell adhesion molecule), Lymphozyten (Anti-CD45, LCA, engl. leukocyte common antigen), eosinophile Granulozyten (Anti-EPO, eosinophil peroxidase) und neutrophile Granulozyten (Anti-CD15, Sialyl-Lewis X) anbieten, welche diese unerwünschten Zellen aus der Sputum-Zellsuspension entfernen. Als Folge blieben die Makrophagen ohne direkte Manipulation („untouched“) übrig. Beim MACS werden antikörpergekoppelte magnetische Partikel (Beads) mitsamt gekoppelten Zellen in einer starken Magnetfeld-Matrix mit mehreren Tausend Tesla gebunden, während die Makrophagen ohne Bindung durch das Magnetfeld laufen. Beim Immunodensity-Verfahren (z.B. RosetteSep (209)) wären Erythrozyten mit den zuvor genannten Antikörpern versehen in einer Gel-Matrix fixiert. Die Sputum-Zellsuspension wird bei 800 g für 30 Minuten durch das Gel zentrifugiert

und die nicht erwünschten Zellen verbleiben an die Antikörper/Erythrozyten gekoppelt im Gel zurück, während die Sputum-Makrophagen ohne Interaktion mit Antikörpern das Gel durchlaufen (206). Ein wesentlicher Nachteil dieser antikörperbasierten Verfahren ist, dass eine Bindung bestimmter Makrophagen-Phänotypen an die Antikörper nicht auszuschließen ist und damit Makrophagen-Subpopulationen fehlen können, ohne dass dies bemerkt werden würde.

Eine vielversprechende und vergleichsweise neue Methode ist die Einzelzellanalyse. So wurde die RNA-Analyse einzelner Zellen vom Nature Methods-Journal zur Methode des Jahres 2013 gekürt (210). Hierbei können einzelne oder wenige Zellen nach wählbaren Kriterien (wie z.B. Morphologie, Adhärenz oder Phagozytose) ausgesucht und einer Analyse zugeführt werden. Ebenso können Sputum-Zellen mit Biomarkern in verschiedene Phänotypen eingeteilt werden (Chipzytometrie) und die identifizierten Phänotypen in einem zweiten Schritt separat auf eine *DMRT1*-Expression hin untersucht werden. Auf diesem Weg könnten nicht nur neue, möglicherweise geschlechtsspezifische Biomarker für distinkte Asthma-Phänotypen identifiziert werden, sondern auch die geschlechtsspezifische Rolle von *DMRT1* in Makrophagen beziehungsweise in bestimmten Makrophagen-Subpopulationen weiter untersucht werden.

5.5.3 Zellkultur

Zellkultur-Experimente nehmen eine zentrale Stellung bei der Beantwortung von Fragestellungen in der medizinischen Grundlagenforschung ein und erfreuen sich seit ihrer Entdeckung einer sehr breiten Anwendung. Die Verwendung von immortalisierten, homogenen Zelllinien reicht über 50 Jahre zurück und bietet heute ein standardisiertes, gut untersuchtes und reproduzierbares Testsystem. In der vorliegenden Arbeit fanden vier Zelllinien Anwendung, welche alle dem Makrophagen-Monozyten-System zugeordnet werden können. Das DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) ist der größte deutsche Anbieter von Zelllinien. Aktuell (Stand: Februar 2019) enthält die Sammlung des DSMZ 826 Zelllinien, von welchen 631 humanen Ursprungs sind (211). Acht von diesen 631 humanen Zelllinien finden in der Literatur als etabliertes humanes Makrophagen-Modell Verwendung (212–218). Neben den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien THP-1, U937, HL-60 und MM6, sind dies JOSK-I und JOSK-M (beides U937-Derivate) sowie AML-193 und Kasumi-3, welche

aufgrund ihrer Verwendung in einer nur geringen Zahl an Veröffentlichungen (jeweils kleiner 100) für diese Arbeit nicht herangezogen wurden.

Die Vorteile der Zellkultur gegenüber der Verwendung primärer Zellen kommen in dieser Arbeit gut zur Geltung. So ermöglichte die Verwendung von Zelllinien durch Schaffung stabiler Untersuchungsbedingungen, das Verhalten der *DMRT1*-Expression nach Stimulation zu charakterisieren und Effekte der plasmidvermittelten *DMRT1*-Überexpression zu messen. Nichtsdestotrotz haben die verwendeten Zelllinien eine Vielzahl ihrer ursprünglichen Eigenschaften als primäre Zellen verloren, sind als Tumor-Zellen nur unter Vorbehalt mit Alveolarmakrophagen vergleichbar und durch die Herauslösung aus ihrem hochkomplexen physiologischen Kontext klar als *in-vitro*-Modell zu betrachten. Daher verbleibt zur Kontrolle der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse als notwendiger Folgeschritt die Untersuchung und Stimulation primärer Makrophagen aus der Lunge.

5.5.4 Real-time quantitative PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Weiterentwicklung der von Kary Mullis erfundenen Polymerase-Kettenreaktion, welche 1986 die Molekularbiologie revolutionierte (219). Diese quantitative Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren stellt ein hochempfindliches sowie spezifisches Nachweisverfahren für die Expression von Genen dar, das sich durch einen großen dynamischen Messbereich und eine hohe Genauigkeit auszeichnet. Diese Vorteile der qPCR sind allerdings nur vollständig gegeben, sofern die die Einstellung der PCR-Parameter als auch die Vorbereitung der Samples (Prä-PCR genannt) korrekt durchgeführt werden. Zur Prä-PCR gehört, dass die aus der Zelle isolierte RNA zuvor unter Einsatz reverser Transkriptase in stabile cDNA übersetzt wird. In dieser Arbeit wurden für beide Arbeitsschritte der Prä-PCR (RNA-Isolation und cDNA-Synthese) kommerziell verfügbare Produkte von QIAGEN genutzt, welche den Vorteil einer vielfach getesteten und optimierten Arbeitsplattform bieten. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Gene außer *18S rRNA* wurden kommerzielle TaqMan-Assays erworben.

Die Hersteller legen allerdings die exakte Funktionsweise sowie die Inhaltsstoffe ihrer Produkte nicht vollumfänglich offen. Dies kann unter bestimmten nicht vorgesehenen Bedingungen zu unerwünschten Ergebnissen führen. Beispielsweise stellt sich die Frage nach den Ursachen der zum Teil hohen Varianzen der Housekeeping-Gene. Ein deutliches Beispiel hierfür zeigt sich

in Abb. 7-5 mit der beobachteten hohen Varianz der *18S rRNA* Signale der Zeitpunkte 24, 36 und 48 Stunden, während sich *GAPDH* über alle Zeitpunkte hinweg stabil exprimiert zeigt. Eine entscheidende potenzielle Quelle globaler, aber besonders genspezifischer methodischer Fehler stellt die reverse Transkription dar (220,221). So können von Gen zu Gen, insbesondere bei dem neben *GAPDH* häufig verwendeten „zellbiologischen Goldstandard der Referenzgene“, *18S rRNA*, Fluktuationen der RT-Effizienz bis zum Faktor 35.000 auftreten (222). Die Ursachen hierfür liegen wesentlich bei genspezifischen Unterschieden der RNA-Sekundärstruktur, welche in Abhängigkeit einer Vielzahl von Parametern wie Temperatur, RNA- und Primer-Konzentration, Anwesenheit von genomischer DNA oder dNTPs-Konzentration variabel konfiguriert ist. Ebenso betrifft eine verringerte Konzentration der Reversen Transkriptase verschiedene Gene unterschiedlich stark. Die Wiederholung einiger Samples der betroffenen Zeitpunkte aus Abschnitt 4.2 zeigte jedoch eine normale Expression von *18S rRNA*. Daher ist davon auszugehen, dass am ehesten ein nicht korrekt laufender *18S rRNA*-Mastermix für die Abweichungen in Abb. 7-5 verantwortlich gemacht werden muss.

Aufgrund von methodenabhängigen und -unabhängigen Expressionsschwankungen der Referenzgene sollten für qPCR-Experimente grundsätzlich mehrere Referenzgene bestimmt und verglichen werden, denn „die Qualität des normalisierten Expressionsniveaus ist nur so hoch wie die Qualität des Referenzgens“ (223). Methodenunabhängige Effekte der Experimentalparameter auf das Expressionsniveau klassischer Referenzgene treten häufig auf und werden unterschätzt (224). Bereits 1975, lange vor der Erfindung der PCR, war bekannt, dass beispielsweise eine Infektion mit Cytomegalieviren zu einer Steigerung der *18S rRNA*-Expression führt (225). Als Konsequenz muss für jedes einzelne Experiment die Eignung eines Referenzgens erneut validiert werden, indem eine stabile Transkription des Referenzgens unter den Bedingungen des jeweiligen Experiments (z.B. Stimulation mit Hormonen oder Allergenen) geprüft wird beziehungsweise sichergestellt wird, dass die Experimentalparameter keine relevanten Effekte auf das ausgewählte Referenzgen zeigen (226). In der Literatur werden zahlreiche Referenzgene unter den verschiedensten Bedingungen verglichen. Diese Informationen können lediglich die Vorauswahl der Referenzgene erleichtern, eine eigene Prüfung der Stabilität ersetzen sie nicht. Beispielsweise wurden in der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 unter LPS-Stimulation acht Referenzgene getestet und *GAPDH* als das instabilste und damit untauglichste Gen für eine Normalisierung identifiziert (227). Andersherum wurde *GAPDH* als das stabilste von elf Referenzgenen in murinen Knochenmarks-Makrophagen unter LPS-Stimulation identifiziert (228). Aufgrund dieser

Unsicherheiten empfehlen manche Autoren die Verwendung von mindestens zwei Referenzgenen, zu deren geometrischem Mittel normalisiert werden soll, um Schwankungen der Referenzgenexpression auszugleichen und kleinere Veränderungen des Zielgens detektieren zu können (229,230). Ein Nature-Review von 2005 argumentiert, dass ein validiertes Referenzgen ausreicht, sofern es stabiler exprimiert ist als das Zielgen: „Ein Referenzgen mit einem Fehler von einer Zehnerpotenz scheint nicht ideal, ist aber ausreichend um eine Veränderung von zwei Zehnerpotenzen des Zielgens zu messen“ (231). Erstaunlicherweise zeigte ein systematisches Review, dass zwischen 2010 und 2015 in qPCR-Studien durchschnittlich 1,2 Referenzgene Anwendung fanden und dass in nur 15 % der Fälle eine Testung mehrerer Referenzgene durchgeführt wurde (232). Vor diesem Hintergrund stellen die in dieser Arbeit verwendete Validierung zweier der sehr häufig gebrauchten Referenzgene – *18S rRNA* und *GAPDH* – und die anschließende Normalisierung zum stabiler exprimierten Gen eine Vorgehensweise dar, die einen Großteil der Studien hinsichtlich dieses Aspekts in ihrer Qualität überragt.

Bei geringen RNA-Konzentrationen sowie schwach exprimierten Zielgenen, wie es bei den Sputum-Experimenten in Abschnitt 4.1 der Fall ist, würde die Möglichkeit einer gezielten Präamplifikation der cDNA bestehen, um die Sensitivität der nachfolgenden qPCR-Experimente für *DMRT1* zu erhöhen (233,234). Entsprechende Präamplifikations-Kits werden von kommerziellen Anbietern beworben. Dennoch wäre eine auf jedes Gen abgestimmte Optimierung notwendig (235). Es wird aber auch argumentiert, dass die qPCR eine ausreichend hohe Sensibilität aufweist, sofern ein robustes Zusammenspiel der PCR-Parameter gewährleistet ist (236). Die Notwendigkeit einer Präamplifikation erschien daher für diese Arbeit von zweifelhaftem Nutzen. Im Hinblick auf zukünftige Experimente sollten dagegen weitere Methoden zur Expressionsanalyse in Betracht gezogen werden.

Aktuell steht zur Messung der Genexpression neben der quantitativen Echtzeit-PCR ein großes Arsenal alternativer Methoden zur Disposition: Angefangen von der in-situ-Hybridisierung oder dem Northern Blot über diverse PCR-Abwandlungen (z.B. Digital-, Multiplex- oder Touchdown-PCR), Microarray-Systeme und serielle Genexpressionsanalysen (SAGE) bis hin zu neueren Verfahren wie der Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung, auch RNA-Seq genannt. Manche dieser Methoden eignen sich besonders für spezielle Fragestellungen, wie zum Beispiel nach der Vollständigkeit eines Gens (Multiplex-PCR), nach dem lokalen Genexpressionsmuster in einer Zelle (in-situ-Hybridisierung) oder nach unbekanntem Splicing-Varianten (SAGE). RNA-Seq stellt von allen verfügbaren Methoden die aktuell präziseste dar,

welche zugleich das umfangreichste Funktionsspektrum bietet (237,238). Darüber hinaus ist RNA-Seq bezüglich der Kosten bei geringer Probenzahl und hoher Zahl der analysierten Gene der qPCR deutlich überlegen (239). Aufgrund der rasch sinkenden Sequenzierungskosten scheint die langfristige Speicherung der enormen anfallenden Datenmengen der teuerste Aspekt von RNA-Seq zu werden (240). Mittels Hochdurchsatzverfahren wird bei RNA-Seq das gesamte zelluläre Transkriptom quantitativ abgebildet. Damit könnten Effekte der *DMRT1*-Überexpression und des *DMRT1*-Knockdowns auf das gesamte Transkriptom untersucht und neue Zielgene (neben *MCP-1* und *CYP19A1*) für weiterführende Untersuchungen identifiziert werden. Ferner kann RNA-Seq nicht nur vorhandene SNPs und Splicing-Varianten aufzeigen, sondern ist auch mit Einzelzellanalysen kompatibel, was im Besonderen für die Untersuchung von induziertem Sputum eine hochinteressante Perspektive für weiterführende Experimente darstellt (241,242). Einen zusätzlichen vielversprechenden Ansatz könnte der direkte Nachweis von DMRT1-Proteinen in Sputum-Makrophagen darstellen, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

5.5.5 Zelltransfektion und Mikroskopie

Ziel der Transfektion von Zelllinien mit *tGFP* markiertem *DMRT1* war es, eine vermutete Translokation von DMRT1-Proteinen nach Stimulation aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu testen. Dieses Ziel scheiterte primär an der geringen Effizienz der Transfektion mit *tGFP-DMRT1*-Vektoren. Die höchste Rate an transfizierten Zellen knapp unter 10 % ließ sich mit dem NucleofectorTM-System von Lonza erreichen. Optimierungsversuche mittels Variierung der Zellzahl, der pDNA-Konzentrationen, des Schock-Modus als auch der Testung aller vier Zelllinien führten zu keiner Steigerung der Transfektionseffizienz über 10 %. Dies ließ sich auch nicht durch Verwendung anderer Transfektionssysteme beheben, darunter Viromer®, Roti®-Fect oder Lipofectamin®. Der NucleofectorTM von Lonza erreichte mit dem AMAXA-*GFP*-Testvektor in THP-1-Zellen eine Transfektionseffizienz von 50 %, während unter sonst identischen Bedingungen eine Transfektion mit *tGFP-DMRT1*-Plasmiden in weniger als 10 % der Zellen Erfolg zeigte. Auch die Zellviabilität zeigte sich in den mit *DMRT1* transfizierten Zellen geringer als in den mit Testvektoren transfizierten Zellen. Dies könnte beispielsweise an der Größe der Plasmide (Testvektor mit 3486 vs. *tGFP-DMRT1*-Vektor mit 7682 Basenpaaren), an potenziellen Kontaminationen der DNA-Transfektionslösung (Endotoxine, Salze) oder an zytotoxischen Effekten einer *DMRT1*-Überexpression liegen.

Eine ergiebige Transfektion benötigt zuerst den Transfer extrazellulärer DNA über die Zellmembran, dann erfolgt der Transport durch das Zytoplasma bis in den Zellkern, hier erfolgt die Transkription in RNA, welche zur Translation zurück ins Zytoplasma exportiert wird. Zuletzt muss das tGFP-DMRT1-Fusionsprotein zurück in den Zellkern (243). Ein Grund für die geringe Transfektionseffizienz könnte der notwendige Transport der tGFP-DMRT1-Fusionsproteine aus dem Zytoplasma zurück in den Zellkern sein. Dies könnte auch den beobachteten Unterschied der Transfektionseffizienz zum Testvektor erklären, da für diesen dieser letzte Schritt entfällt. Der Kerntransport kann für Proteine bis 40 Kilodalton (kDa) passiv über Kernporen erfolgen, größere Proteine werden über eine definierte Aminosäuren-Sequenz (NLS, nuclear localisation sequence) erkannt und aktiv durch den Kernporenkomplex über die Zellkerndoppelmembran transportiert (244). DMRT1 wiegt 39,5 kDa, ein tGFP-DMRT1-Fusionsprotein bringt 65,5 kDa auf die Waage. So könnte tGFP die Erkennung der NLS von DMRT1 stören, welche 2007 identifiziert wurde (245). Diese Überlegung kann allerdings nicht erklären, warum die Transfektion in einigen Zellen trotzdem gut zu funktionieren schien. Ein zweiter Erklärungsansatz liegt in der Theorie, dass die transfizierten *tGFP-DMRT1*-Plasmide – anders als vom Hersteller versprochen – nicht bis in den Zellkern gelangen, sondern lediglich bis ins Zytoplasma. Als Folge wären nur jene Zellen erfolgreich transfiziert, welche sich zum Zeitpunkt der Transfektion in eine Mitosephase befinden, bei welcher die Zellkernhülle durchlässig ist (246). Letztlich stellen Transfektionen unerheblich vom verwendeten Transportsystems für die DNA einen erheblichen Eingriff in die Integrität einer Zelle dar, welcher unspezifische off-target Effekte zur Folge hat (247,248). Es stellt sich somit die Frage nach alternativen Herangehensweisen an die gestellte Hypothese, ohne die Nachteile einer Transfektion in Kauf nehmen zu müssen.

Eine mögliche Herangehensweise stellt die Separation von Zellkernen und Zytoplasma mittels Differentialzentrifugation dar, bei welcher anschließend ein Vergleich der DMRT1-Proteinmengen in beiden Fraktionen erfolgt. Aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsraten trennen sich Zellkerne und der Rest der zuvor permeabilisierten Zelle beim Zentrifugieren auf (249). Die Permeabilisierung kann chemisch oder mechanisch mit einer 27 Gauge-Kanüle (z.B. Subkutannadel) erfolgen. Beim Zentrifugieren (700 g für 5 Minuten) setzen sich hauptsächlich die Zellkerne ab, während sich die übrigen Bestandteile der Zellen im Überstand sammeln. Durch Abpipettieren des Überstands und Messung der DMRT1-Mengen mittels Western-Blot oder ELISA könnte die Hypothese einer Translokation von DMRT1 in das Zytoplasma nach Stimulation geprüft werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung in Kindesalter, bei der Jungen häufiger betroffen sind als Mädchen. Dieser geschlechtsspezifische Prävalenzunterschied kehrt sich im Verlauf des Erwachsenwerdens um und Frauen leiden häufiger als Männer an Asthma. Da aktuelle Forschungsergebnisse auf eine Relevanz des Gens *DMRT1* für diesen geschlechtsspezifischen Effekt hindeuteten und potenzielle immunologische Funktionen von *DMRT1* in Alveolarmakrophagen nahelegten, wurden in dieser Arbeit die Expression von *DMRT1* in Makrophagen untersucht und Effekte einer Immunstimulation auf *DMRT1* charakterisiert.

Hierfür wurde humanes Sputum induziert, der Anteil an phagozytierenden Zellen bestimmt und die Expression von *DMRT1* im Sputum mittels quantitativer PCR gemessen. In Makrophagen-ähnlichen Zelllinien wurde die Veränderung der *DMRT1*-Expression nach direkter Stimulation mit Allergie-assoziierten Substanzen und Geschlechtshormonen quantifiziert. Klonierte *DMRT1*-Vektoren wurden eingesetzt, um den Effekt einer *DMRT1*-Überexpression auf das Chemokin *MCP-1* und die Aromatase (*CYP19A1*) zu bestimmen. Eine fluoreszenz-mikroskopische Lokalisationsbestimmung von tGFP markiertem *DMRT1* erfolgte vor und nach Stimulation mit LPS in transfizierten Zelllinien.

In induziertem Sputum zeigte sich eine PCR-technisch gerade noch nachweisbare Expression von *DMRT1*. In Zelllinienexperimenten stellte sich nach Stimulation mit den bakteriellen Endotoxinen Peptidoglykan und Lipopolysacharid nach 24 Stunden eine bis auf 7,9 % verringerte Expression von *DMRT1* ein, welche zwischen 100 und 1000 ng/ml LPS dosisabhängig und nach 72 Stunden wieder auf das ursprüngliche Expressionsniveau anstieg. Eine Stimulation mit Hausstaubmilbenantigenen und Geschlechtshormonen erbrachte keine signifikanten Veränderungen der *DMRT1*-Expression. Eine *DMRT1*-Überexpression führte zu einer MCP1-Expressionssteigerung. Zwar gelang eine Darstellung tGFP-markierter *DMRT1*-Proteine im Zellkern von Makrophagen-ähnlichen Zelllinien, ein sicherer Nachweis oder Ausschluss einer Translokation von *DMRT1*-Proteinen nach Stimulation war technisch bedingt nicht möglich.

In dieser Arbeit wurde eine *DMRT1*-Expression in Sputum und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien mittels qPCR nachgewiesen. Zum ersten Mal wurde eine Interaktion von *DMRT1* in Makrophagen mit bakteriellen Endotoxinen belegt und eine Steigerung der Zytokin-Produktion

nach *DMRT1*-Überexpression gezeigt. Gonadale Interaktionen von *DMRT1* mit dem Steroidhormonmetabolismus scheinen in Makrophagen nicht relevant zu sein.

Zur weiteren Charakterisierung geschlechtsspezifischer *DMRT1*-Funktionen in Makrophagen auf die Asthma-Pathogenese sind Interaktionsstudien mit Subgruppenanalyse der Kinder aus bäuerlichem Umfeld notwendig sowie Untersuchungen mit selektierten primären Alveolarmakrophagen vielversprechend. Auf diesem Weg könnten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse vertieft werden, wie *DMRT1* seinen Beitrag zu beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Asthma leistet.

7 Darstellung der qPCR-Rohdaten

Für die Stimulationsexperimente zeigen Abb. 7-1 bis Abb. 7-4 die gemessenen Ct-Werte und die Varianz der Ct-Werte pro Gen. Aufgrund der höheren Stabilität von *18S rRNA* wurde dieses Referenzgen für die Normalisierung von *DMRT1* bei THP-1-Zellen verwendet.

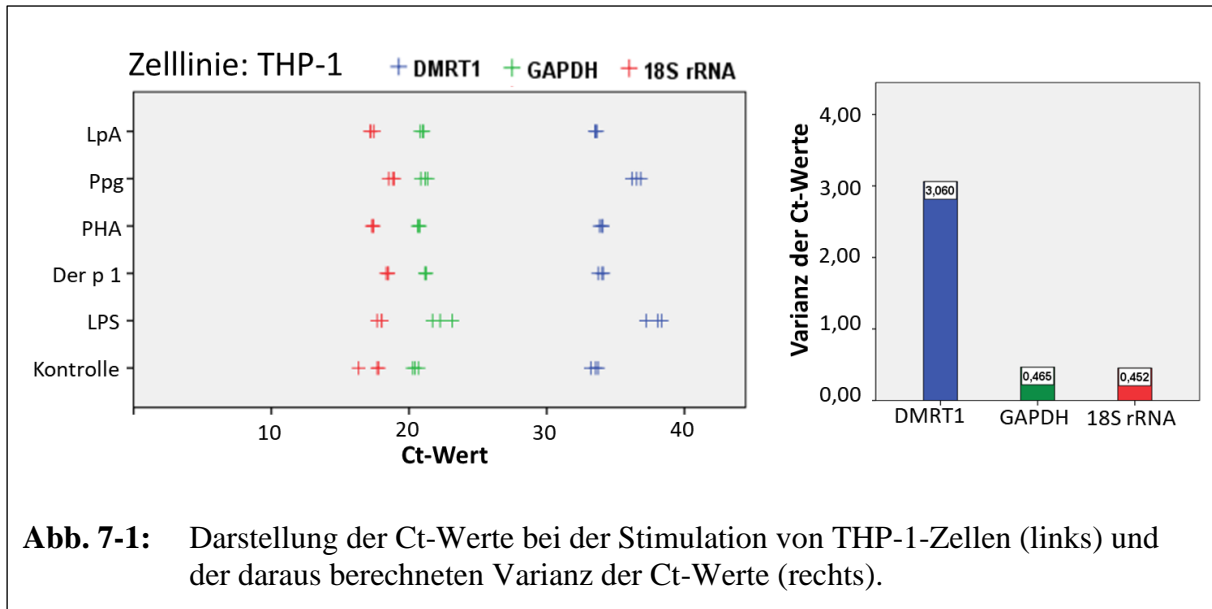
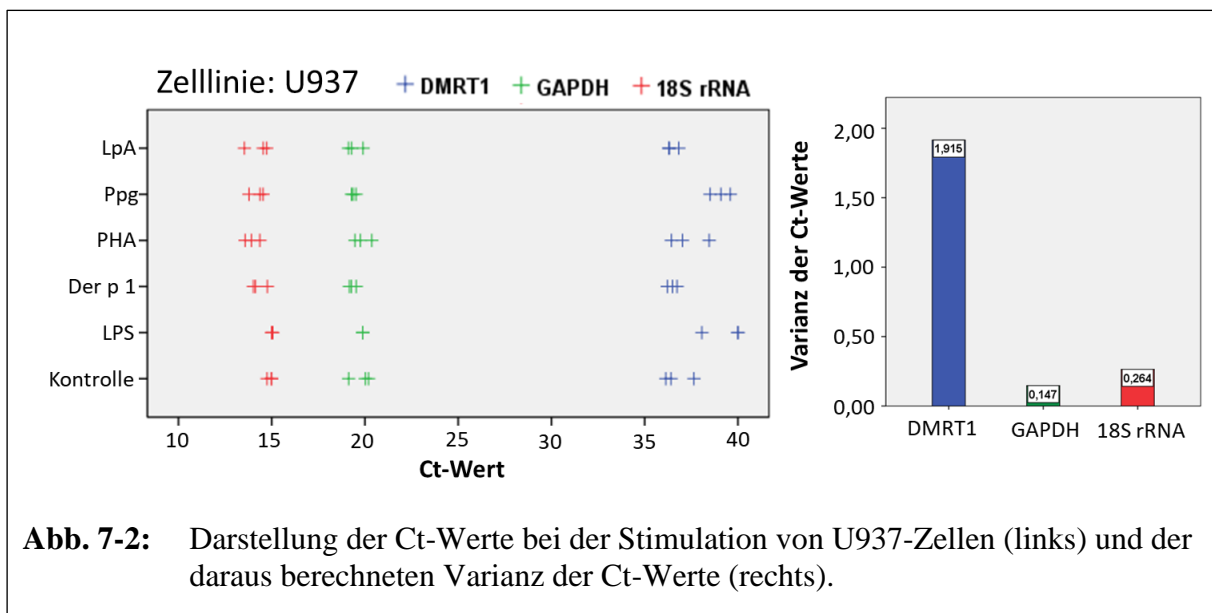
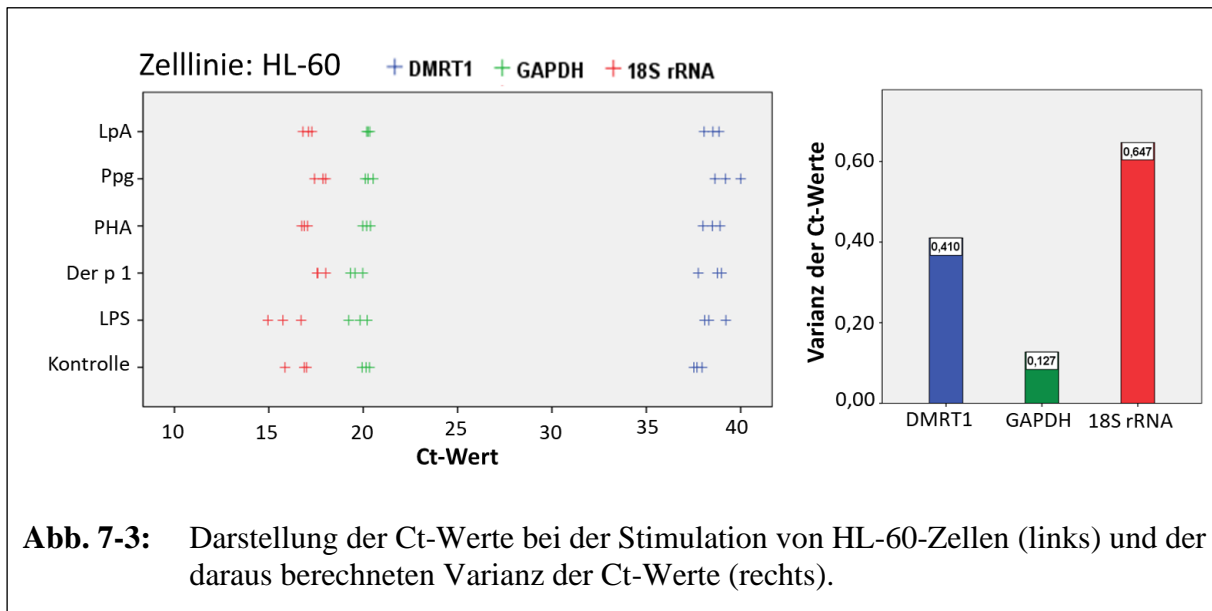


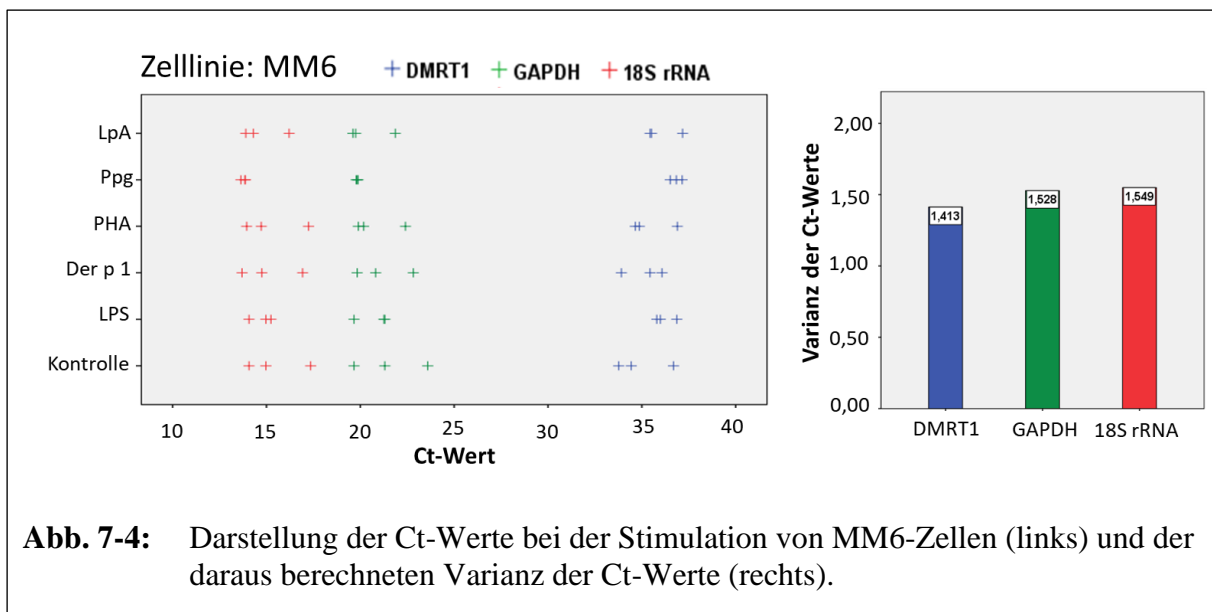
Abb. 7-2 zeigt eine deutlich höhere Stabilität von *GAPDH* gegenüber *18S rRNA* bei U937-Zellen. Daher wurde dieses Referenzgen für die Normalisierung von *DMRT1* in diesem Experiment herangezogen.



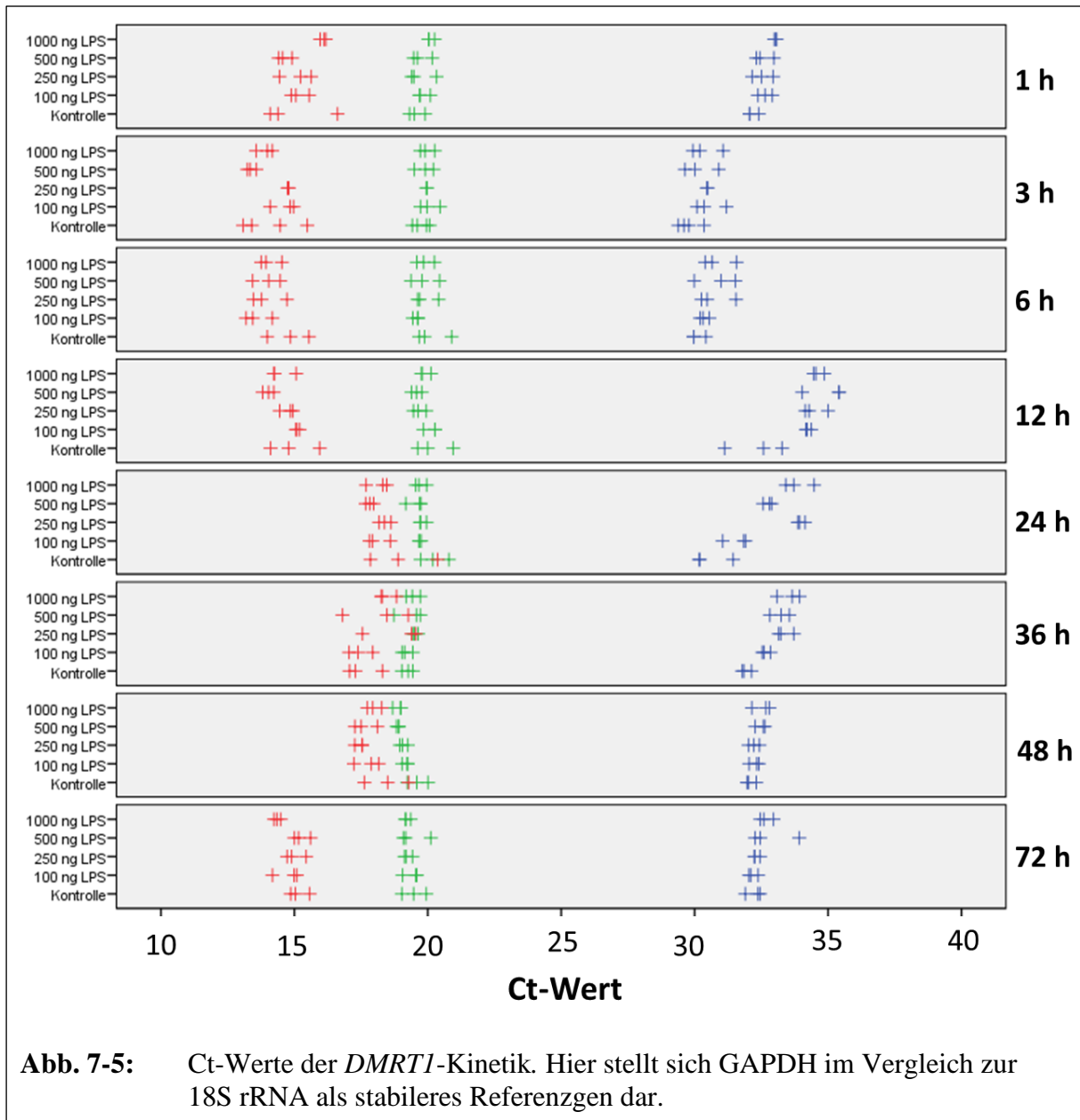
Bei HL-60-Zellen zeigt Abb. 7-3 eine deutlich höhere Stabilität von *GPADH*. Aufgrund dessen wurde dieses Referenzgen für die Normalisierung von *DMRT1* in diesem Experiment verwendet.



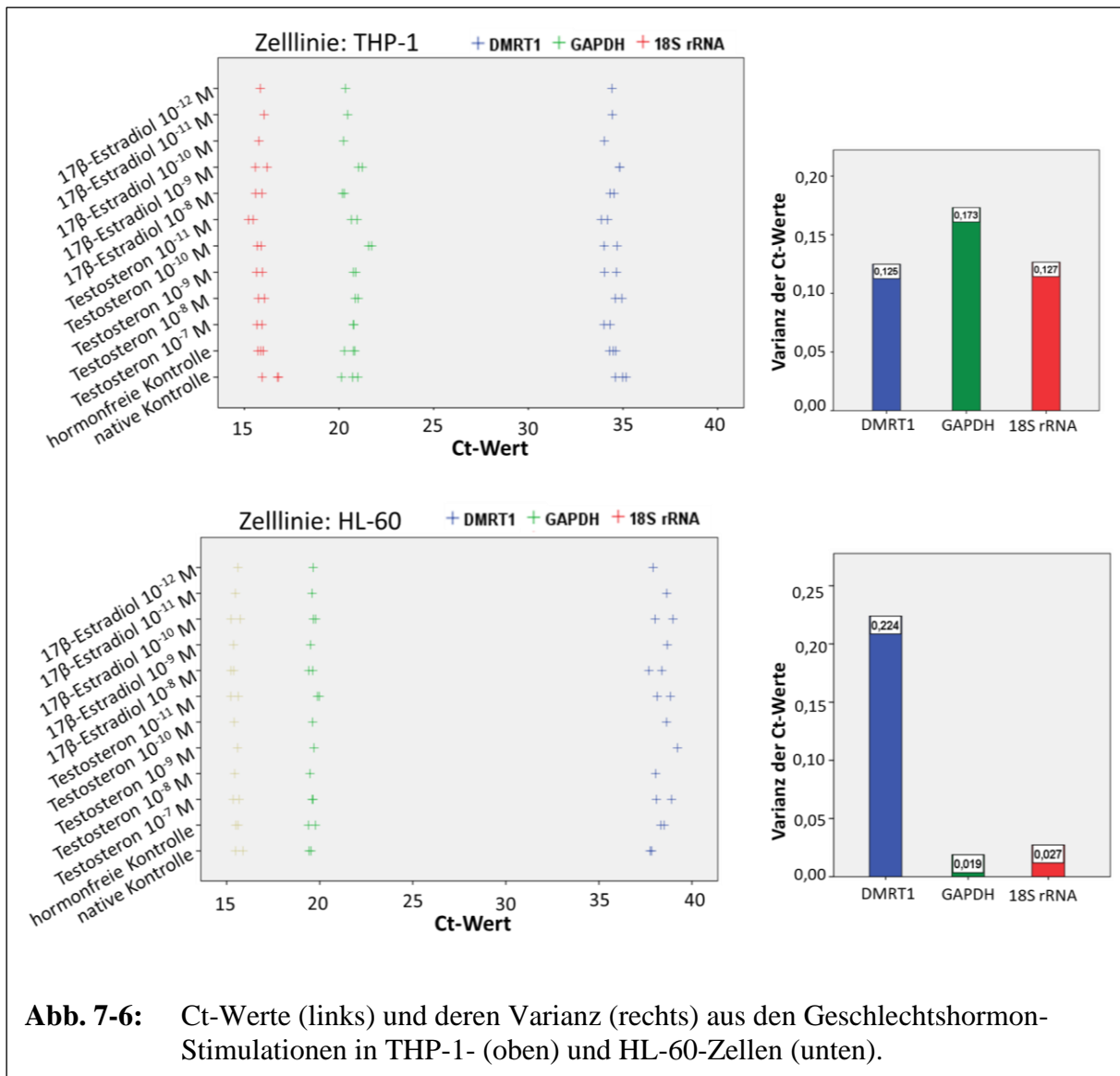
Für die Stimulation von MM6-Zellen zeigt Abb. 7-4 vergleichbare Varianzen der Ct-Werte der Referenzgene. Aufgrund der geringfügig höheren Stabilität von *GAPDH* wurde dieses Referenzgen für die Normalisierung von *DMRT1* in diesem Experiment herangezogen.



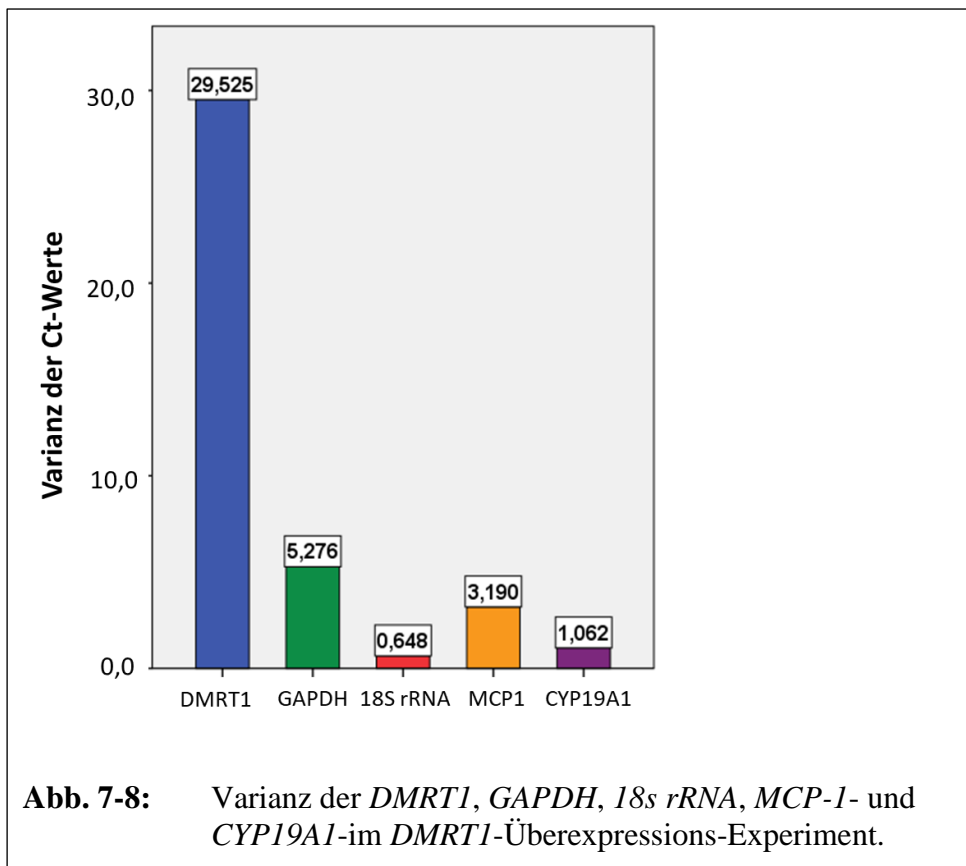
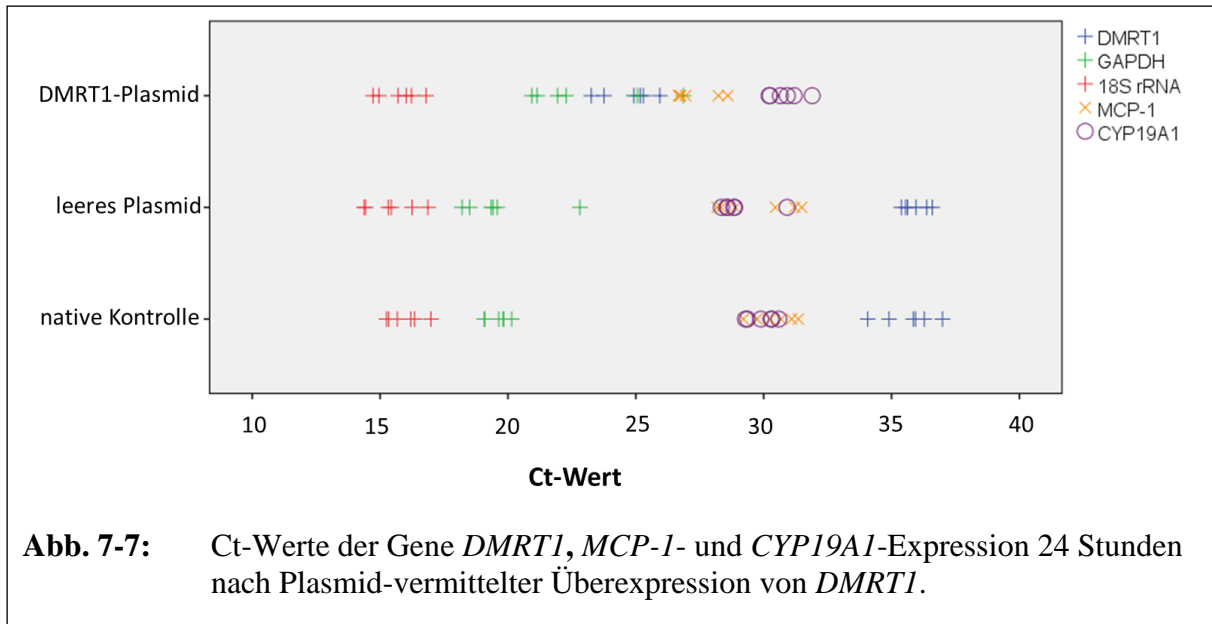
Bei Betrachtung der Ct-Werte der qPCR-Daten des Kinetik-Experimentes stellte sich eine hohe Instabilität von *18S rRNA* zwischen 24 48 Stunden dar, welche am ehesten auf technische Ursachen zurückgeführt werden muss. Aufgrund dessen wurde zur Normalisierung von *DMRT1* das stabiler exprimierte Referenzgen *GAPDH* herangezogen.



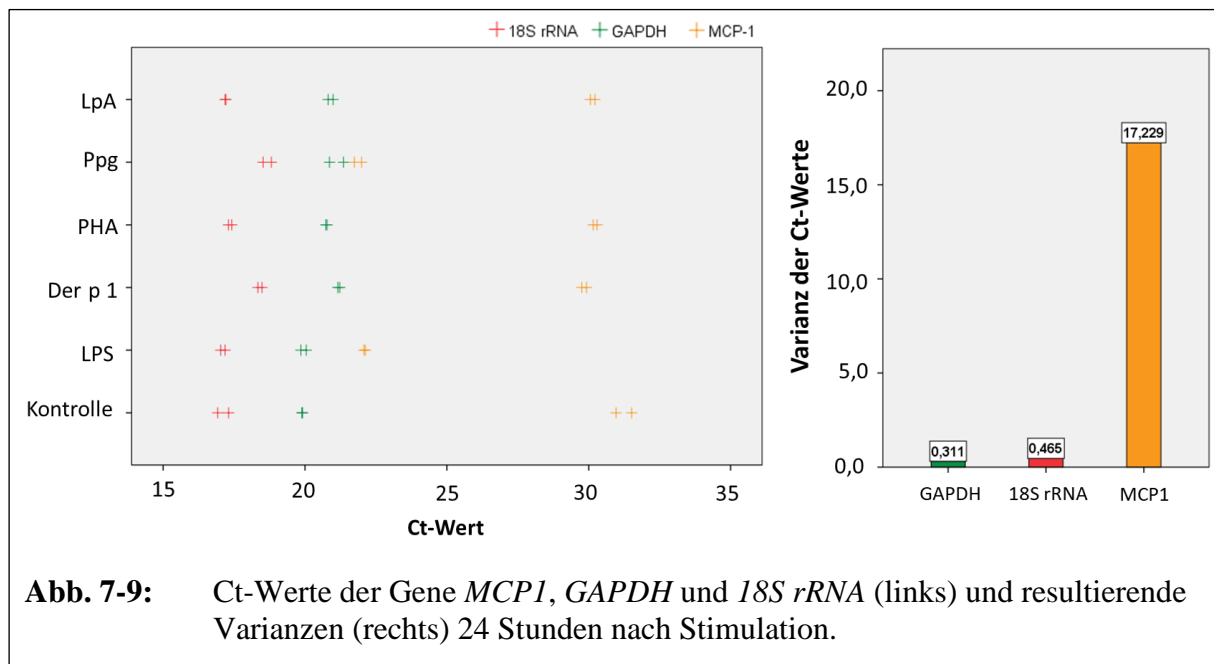
Normalisiert wurde das Hormonstimulations-Experiment bei HL-60-Zellen gegen das stabiler exprimierte *GAPDH* und bei THP-1-Zellen gegen *18S rRNA*.



Normalisiert wurden die Ct-Werte des Überexpressionsexperiments zum Referenzgen *18S rRNA*, da sich dieses besonders in jener Gruppe der Zellen stabiler als *GAPDH* zeigte, die mit *DMRT1*-Plasmiden transfiziert wurde (vgl. Abb. 7-7). Diese Beobachtung spiegelt sich in der Darstellung der Varianzen in Abb. 7-8 wider.



Normalisiert wurde die *MCP1*-Expression zum Referenzgen *GAPDH* (vgl. Abb. 7-9), da es sich in dem Stimulationsexperiment stabiler verhielt als *18S rRNA*.



8 Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	18S ribosomal RNA
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL2	Chemokine C-C motive ligand 2 (auch MCP-1)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementärer DNA-Strang, häufig nach RT-Reaktion
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<i>CYP19A1</i>	Cytochrome P450 19A1 (Aromatase)
DAPI	Diamidinophenylindol, Fluorochrom um DNA anzufärben
Der p 1	Peptidase 1 der europäischen Hausstaubmilbe Dermatophagoides Pteronyssinus
DMRT1	Das Protein (Transkriptionsfaktor) des Gens <i>DMRT1</i>
<i>DMRT1</i>	Doublesex and mab-3 related transkriptionfactor 1
DMSO	Dimehthylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothritol
EBI	European Bioinformatics Institute
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EPO	Eosinophile Peroxidase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FANTOM5	Functional Annotation of Mammalian Genome 5, Projekt zum besseren Verständnis von Expressionsdaten
FBS	Fetal Bovines Serum

FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HDBR	Human Developmental Biology Resource
HEK293	Embryonale Nierenzelllinie
HL-60	Humane promyelozytische Leukämie Zelllinie (36 Jahre, weiblich, AML M2)
HPA	Human Protein Atlas
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
Jurkat	T-Zell Leukämie Zelllinie
kDa	Kilodalton, Gewichtseinheit
LBP	LPS bindendes Protein
LBP	Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
LCA	Leukocyte Common Antigen
LpA	Lipoprotein A
LPS	Lipopolysaccharid – hier von E.coli O111:B4
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
<i>MCP-1</i>	Monocyte chemotactic protein 1 (auch CLL2)
MDM	Monocyte Derived Macrophage
MM6	Mono-Mac-6 Zelllinie (64 Jahre, männlich, AML M5)
NGS	Next Generation Sequenzing
NLS	Nuclear Localisation Sequence
PBMCs	Periphere Blut Monozyten, periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGRP	Peptidoglycan recognition protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PHA	Phytohaemagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PpG	Peptidoglycan von Porphyromonas gingivalis
PRP	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPKM	Reads per Kilobase Million
rpm	Rounds Per Minute, Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase (Enzym, um aus RNA cDNA zu synthetisieren)
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression
SCLC-21H	Small Cell Lung Cancer 21H-Zelllinie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, DNA-Variante, im weiteren Sinn Mutation
Taq	Thermus aquatius (thermophiles Bakterium, lebt in heißen Quellen und Geysiren, Ursprung der Taq-Polymerase, essentiell für PCR)
tGFP	turbo Green Fluorescent Protein, grün fluoreszierendes Protein für Lokalisationsexperimente
THP-1	Humane Monozyten/Makrophagen-Zelllinie (1 Jahr, männlich, AML M5)
TPM	Transcripts per million Kilobase
TR-AM	Tissue Resident Alveolar Macrophage
U937	Humane Monozyten-Zelllinie (37 Jahre, männlich, histiozytäres Lymphom)
YT	Natürliche Killerzellen Leukämie Zelllinie

9 Literaturverzeichnis

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018. Available from www.ginasthma.org.
2. Bousquet J, Bousquet Philippe, Godard P, Daures J-P. The public health implications of asthma. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; 83:548-554.
3. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, Boulet L-P. Global asthma prevalence in adults: Findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12204. doi:10.1186/1471-2458-12-204
4. Asher I, Pearce N. Global burden of asthma among children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(11):1269–78. doi:10.5588/ijtld.14.0170
5. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62(9):758–66. doi:10.1136/thx.2006.070169
6. Zöllner IK, Weiland SK, Piechotowski I, Gabrio T, Mutius E v., Link B, Pfaff G, Kouros B, Wuthe J. No increase in the prevalence of asthma, allergies, and atopic sensitisation among children in Germany: 1992-2001. *Thorax*. 2005;60(7):545–8. doi:10.1136/thx.2004.029561
7. Akinbami LJ, Simon AE, Rossen LM. Changing Trends in Asthma Prevalence Among Children. *Pediatrics*. 2016;137(1). doi:10.1542/peds.2015-2354
8. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351(9111):1225–32.
9. Wennergren G. The prevalence of asthma has reached a plateau. *Acta Paediatr*. 2011;100(7):938–9. doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02307.x
10. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733–43. doi:10.1016/S0140-6736(06)69283-0

11. Beasley R. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. 1998;351(9111):1225–32. doi:10.1016/S0140-6736(97)07302-9
12. Bousquet J, editor. *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach*. Geneva: WHO; 2007. 146 p. eng.
13. *Global_Asthma_Report_2014*.
14. Braman SS. The global burden of asthma. *Chest*. 2006;130(1 Suppl):4S-12S. doi:10.1378/chest.130.1_suppl.4S
15. WHO. Bronchial asthma Fact sheet N°206 [Internet]. 2018 [updated 2018 Apr 10; cited 2018 Apr 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en/>
16. Gibson GJ, Loddenkemper R, Sibille Y, Lundback B. *The European Lung White Book: Respiratory Health and Disease in Europe*. 2nd ed. Sheffield: European Respiratory Society; 2013. 486 p. eng.
17. Loddenkemper R, editor. *European lung white book: The first comprehensive survey on respiratory health in Europe*. Lausanne: ERSJ Ltd; 2003. 182 p. ger.
18. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie in Anlage 4: Therapiehinweis zu Omalizumab Vom 20. Dezember 2007. *Dtsch Arztebl International*. 2008;105(20):A-1084.
19. Mary D. Klinnert, Harold S. Nelson, Marcella R. Price, Allen D. Adinoff, Donald Y. M. Leung, David A. Mrazek. Onset and Persistence of Childhood Asthma: Predictors From Infancy;2001.
20. Yao T-C, Ou L-S, Yeh K-W, Lee W-I, Chen L-C, Huang J-L. Associations of Age, Gender, and BMI with Prevalence of Allergic Diseases in Children: PATCH Study. *Journal of Asthma*. 2011;48(5):503–10. doi:10.3109/02770903.2011.576743
21. Iordanidou M, Loukides S, Paraskakis E. Asthma phenotypes in children and stratified pharmacological treatment regimens. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017;10(3):293–303. doi:10.1080/17512433.2017.1271322
22. Oksel C, Haider S, Fontanella S, Frainay C, Custovic A. Classification of Pediatric Asthma: From Phenotype Discovery to Clinical Practice. *Front Pediatr*. 2018;6:258. doi:10.3389/fped.2018.00258
23. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002;360(9342):1313–22.

24. Fanta CH. Asthma. *N Engl J Med*. 2009;360(10):1002–14.
doi:10.1056/NEJMra0804579
25. Wenzel SE. Asthma: Defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368(9537):804–13. doi:10.1016/S0140-6736(06)69290-8
26. Hekking P-PW, Bel EH. Developing and emerging clinical asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2(6):671-80; quiz 681.
doi:10.1016/j.jaip.2014.09.007
27. Fajt ML, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):299-310; quiz 311. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1871
28. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly*. 2014;144w14036. doi:10.4414/smw.2014.14036
29. Noutsios G, Floros J. Childhood asthma: Causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly*. 2014. doi:10.4414/smw.2014.14036
30. Simon H-U. Asthma: Ursachen und Therapien. München: Beck; 1998. 103 p.
(Beck'sche Reihe C. H. Beck Wissen; vol. 2095). ger.
31. G. John Gibson, Robert Loddenkemper, Yves Sibille, Bo Lundback. The European Lung White Book: Respiratory Health and Disease in Europe; 2014. (vol. The economic burden of lung disease).
32. Castro-Rodriguez JA, Forno E, Rodriguez-Martinez CE, Celedón JC. Risk and Protective Factors for Childhood Asthma: What Is the Evidence? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(6):1111–22. doi:10.1016/j.jaip.2016.05.003
33. Seyedrezazadeh E, Moghaddam MP, Ansarin K, Vafa MR, Sharma S, Kolahdooz F. Fruit and vegetable intake and risk of wheezing and asthma: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2014;72(7):411–28. doi:10.1111/nure.12121
34. Genuneit J. Exposure to farming environments in childhood and asthma and wheeze in rural populations: A systematic review with meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(6):509–18. doi:10.1111/j.1399-3038.2012.01312.x
35. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259–60.
36. Sironi M, Clerici M. The hygiene hypothesis: An evolutionary perspective. *Microbes Infect*. 2010;12(6):421–7. doi:10.1016/j.micinf.2010.02.002

37. "single-nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable" [Internet] [cited 2018 Dec 16]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/definition/single-nucleotide-polymorphism-snp-295>
38. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, Mutius E v., Farrall M, Lathrop M, Cookson WOCM. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010;363(13):1211–21. doi:10.1056/NEJMoa0906312
39. Demenais F, Margaritte-Jeannin P, Barnes KC, Cookson WOC, Altmüller J, Ang W, Barr RG, Beaty TH, Becker AB, Beilby J, Bisgaard H, Bjornsdottir US, Bleecker E, Bønnelykke K, Boomsma DI, Bouzigon E, Brightling CE, Brossard M, Brusselle GG, Burchard E, Burkart KM, Bush A, Chan-Yeung M, Chung KF, Couto Alves A, Curtin JA, Custovic A, Daley D, Jongste JC de, Del-Rio-Navarro BE, Donohue KM, Duijts L, Eng C, Eriksson JG, Farrall M, Fedorova Y, Feenstra B, Ferreira MA, Freidin MB, Gajdos Z, Gauderman J, Gehring U, Geller F, Genuneit J, Gharib SA, Gilliland F, Granell R, Graves PE, Gudbjartsson DF, Haahtela T, Heckbert SR, Heederik D, Heinrich J, Heliövaara M, Henderson J, Himes BE, Hirose H, Hirschhorn JN, Hofman A, Holt P, Hottenga J, Hudson TJ, Hui J, Imboden M, Ivanov V, Jaddoe VWV, James A, Janson C, Jarvelin M-R, Jarvis D, Jones G, Jonsdottir I, Jousilahti P, Kabesch M, Kähönen M, Kantor DB, Karunas AS, Khusnutdinova E, Koppelman GH, Kozyrskyj AL, Kreiner E, Kubo M, Kumar R, Kumar A, Kuokkanen M, Lahousse L, Laitinen T, Laprise C, Lathrop M, Lau S, Lee Y-A, Lehtimäki T, Letort S, Levin AM, Li G, Liang L, Loehr LR, London SJ, Loth DW, Manichaikul A, Marenholz I, Martinez FJ, Matheson MC, Mathias RA, Matsumoto K, Mbarek H, McArdle WL, Melbye M, Melén E, Meyers D, Michel S, Mohamdi H, Musk AW, Myers RA, Nieuwenhuis MAE, Noguchi E, O'Connor GT, Ogorodova LM, Palmer CD, Palotie A, Park JE, Pennell CE, Pershagen G, Polonikov A, Postma DS, Probst-Hensch N, Puzyrev VP, Raby BA, Raitakari OT, Ramasamy A, Rich SS, Robertson CF, Romieu I, Salam MT, Salomaa V, Schlünssen V, Scott R, Selivanova PA, Sigsgaard T, Simpson A, Siroux V, Smith LJ, Solodilova M, Standl M, Stefansson K, Strachan DP, Stricker BH, Takahashi A, Thompson PJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tiesler CMT, Torgerson DG, Tsunoda T, Uitterlinden AG, van der Valk RJP, Vaysse A, Vedantam S, Berg A v., Mutius E v., Vonk JM, Waage J, Wareham NJ, Weiss ST, White WB, Wickman M, Widén E, Willemsen G, Williams LK, Wouters IM, Yang JJ, Zhao JH, Moffatt MF,

- Ober C, Nicolae DL. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet.* 2018;50(1):42–53. doi:10.1038/s41588-017-0014-7
40. Schieck M, Sharma V, Michel S, Toncheva AA, Worth L, Potaczek DP, Genuneit J, Kretschmer A, Depner M, Dalphin J-C, Riedler J, Frei R, Pekkanen J, Tost J, Kabesch M. A polymorphism in the TH 2 locus control region is associated with changes in DNA methylation and gene expression. *Allergy.* 2014;69(9):1171–80. doi:10.1111/all.12450
 41. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, Mutius E v., Martinez FD. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(3):506–13. doi:10.1067/mai.2000.104940
 42. Sharma V, Michel S, Gaertner V, Franke A, Vogelberg C, Berg A v., Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Zeilinger S, Illig T, Schedel M, Potaczek DP, Kabesch M. Fine-mapping of IgE-associated loci 1q23, 5q31, and 12q13 using 1000 Genomes Project data. *Allergy.* 2014;69(8):1077–84. doi:10.1111/all.12431
 43. Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(4 Suppl):S68-75. doi:10.2223/JPED.1781
 44. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, Berg A v., Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SAG, Wong KCC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, Mutius E v., Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WOC. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007;448(7152):470–3. doi:10.1038/nature06014
 45. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, Roduit C, Kabesch M, Lauener R, Pfefferle PI, Pekkanen J, Dalphin J-C, Riedler J, Braun-Fahrländer C, Mutius E v., Ege MJ. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(8):889–97. doi:10.1164/rccm.201507-1493OC
 46. Bieli C, Eder W, Frei R, Braun-Fahrländer C, Klimecki W, Waser M, Riedler J, Mutius E v., Scheynius A, Pershagen G, Doekes G, Lauener R, Martinez FD. A polymorphism

- in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(6):1308–15.
doi:10.1016/j.jaci.2007.07.034
47. Leynaert B, Guillaud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guénéguou A, Pin I, Neukirch F. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(3):658–65.
doi:10.1016/j.jaci.2006.06.015
 48. Minelli C, Granell R, Newson R, Rose-Zerilli MJ, Torrent M, Ring SM, Holloway JW, Shaheen SO, Henderson JA. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: A Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data. *Int J Epidemiol.* 2010;39(2):539–62. doi:10.1093/ije/dyp337
 49. Piacentini S, Polimanti R, Simonelli I, Donno S, Pasqualetti P, Manfellotto D, Fuciarelli M. Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(4):3299–313. doi:10.1007/s11033-012-2405-2
 50. Kabesch M. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax.* 2004;59(7):569–73. doi:10.1136/thx.2003.016667
 51. Accordini S, Calciano L, Johannessen A, Portas L, Benediktsdóttir B, Bertelsen RJ, Bråbäck L, Carsin A-E, Dharmage SC, Dratva J, Forsberg B, Gomez Real F, Heinrich J, Holloway JW, Holm M, Janson C, Jögi R, Leynaert B, Malinowski A, Marcon A, Martínez-Moratalla Rovira J, Raheison C, Sánchez-Ramos JL, Schlünssen V, Bono R, Corsico AG, Demoly P, Dorado Arenas S, Nowak D, Pin I, Weyler J, Jarvis D, Svanes C. A three-generation study on the association of tobacco smoking with asthma. *Int J Epidemiol.* 2018;47(4):1106–17. doi:10.1093/ije/dyy031
 52. Bråbäck L, Lodge CJ, Lowe AJ, Dharmage SC, Olsson D, Forsberg B. Childhood asthma and smoking exposures before conception—A three-generational cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2018;29(4):361–8. doi:10.1111/pai.12883
 53. Leslie FM. Multigenerational epigenetic effects of nicotine on lung function. *BMC Med.* 2013;1127. doi:10.1186/1741-7015-11-27
 54. Schatz M, Camargo CA. The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in a large managed care organization. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 2003;91(6):553–8. doi:10.1016/S1081-1206(10)61533-5

55. Almqvist C, Worm M, Leynaert B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: A GA 2 LEN review. *Allergy*. 2008;(63):47–57. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01524.x
56. Schieck M, Schouten JP, Michel S, Suttner K, Toncheva AA, Gaertner VD, Illig T, Lipinski S, Franke A, Klintschar M, Kalayci O, Sahiner UM, Birben E, Melen E, Pershagen G, Freidin MB, Ogorodova LM, Granell R, Henderson J, Brunekreef B, Smit HA, Vogelberg C, Berg A v., Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Genuneit J, Jonigk D, Postma DS, Koppelman GH, Vonk JM, Timens W, Boezen HM, Kabesch M. Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1) is a sex-specific genetic determinant of childhood-onset asthma and is expressed in testis and macrophages. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):421–31. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1305
57. Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy*. 2008;63(11):1418–27. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01880.x
58. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl*. 2013;56(5-6):698–706. doi:10.1007/s00103-012-1652-7
59. Liebhart J, Dobek R, Małolepszy J, Wojtyniak B, Pisiewicz K, Płusa T, Gładysz U. The Prevalence of Allergic Diseases in Poland – the Results of the PMSEAD Study in Relation to Gender Differences. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23(5):757–62. doi:10.17219/acem/37238
60. Schmitz R, Thamm M, Ellert U, Kalcklösch M, Schlaud M. Verbreitung häufiger Allergien bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl*. 2014;57(7):771–8. doi:10.1007/s00103-014-1975-7
61. Maximilian Schieck. Genetic determinants of symptom severity and symptom variability in the course of childhood asthma: A cumulative thesis submitted for the degree of Doctor of Natural Sciences (Dr. rer. nat.) in the subject of Genetics and Molecular Biology.
62. Matson CK, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet*. 2012. doi:10.1038/nrg3161
63. Kopp A. Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet*. 2012;28(4):175–84. doi:10.1016/j.tig.2012.02.002

64. Nguyen P-V, Srihari S, Leong HW. Identifying conserved protein complexes between species by constructing interolog networks. *BMC Bioinformatics*. 2013;14 Suppl 16S8. doi:10.1186/1471-2105-14-S16-S8
65. Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, Loeuille G-A, Bashamboo A, McElreavey K, Zarkower D, Aihara H, Bardwell VJ. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(6):442–51. doi:10.1038/nsmb.3032
66. Onesimo R, Orteschi D, Scalzone M, Rossodivita A, Nanni L, Zannoni GF, Marrocco G, Battaglia D, Fundaro C, Neri G. Chromosome 9p deletion syndrome and sex reversal: novel findings and redefinition of the critically deleted regions. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(9):2266–71. doi:10.1002/ajmg.a.35489
67. Matson CK, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet*. 2012;13(3):163–74. doi:10.1038/nrg3161
68. Onesimo R, Orteschi D, Scalzone M, Rossodivita A, Nanni L, Zannoni GF, Marrocco G, Battaglia D, Fundarò C, Neri G. Chromosome 9p deletion syndrome and sex reversal: Novel findings and redefinition of the critically deleted regions. *Am. J. Med. Genet*. 2012;158A(9):2266–71. doi:10.1002/ajmg.a.35489
69. Conti P, DiGiacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*. 2001;22(3):133–7.
70. Gotera J, Giuffrida M, Mavarez A, Pons H, Bermudez J, Maldonado M, Espina LM, Mosquera J, Valero N. Respiratory syncytial virus infection increases regulated on activation normal T cell expressed and secreted and monocyte chemoattractant protein 1 levels in serum of patients with asthma and in human monocyte cultures. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(5):316–20. doi:10.1016/j.anai.2012.03.006
71. Keränen T, Hömmö T, Moilanen E, Korhonen R. β 2-receptor agonists salbutamol and terbutaline attenuated cytokine production by suppressing ERK pathway through cAMP in macrophages. *Cytokine*. 2017;94:1–7. doi:10.1016/j.cyto.2016.07.016
72. Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, Berdyshev E, Chung S, Ranjan R, Karpurapu M, Deng J, Qian F, Kelly EAB, Jarjour NN, Ackerman SJ, Natarajan V, Christman JW, Park GY. Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl₂, regulate airway inflammation and remodeling in

- allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;52(6):772–84.
doi:10.1165/rcmb.2014-0255OC
73. Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(3):295–303. doi:10.1517/13543770902755129
74. Chao J, Donham P, van Rooijen N, Wood JG, Gonzalez NC. Monocyte chemoattractant protein-1 released from alveolar macrophages mediates the systemic inflammation of acute alveolar hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(1):53–61.
doi:10.1165/rcmb.2010-0264OC
75. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;178(3):439–48. doi:10.1016/j.resp.2011.03.008
76. Schneider D, Hong JY, Bowman ER, Chung Y, Nagarkar DR, McHenry CL, Goldsmith AM, Bentley JK, Lewis TC, Hershenson MB. Macrophage/epithelial cell CCL2 contributes to rhinovirus-induced hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of allergic airways disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(3):L162-9. doi:10.1152/ajplung.00182.2012
77. Marchini T, Wolf D, Michel NA, Mauler M, Dufner B, Hoppe N, Beckert J, Jäckel M, Magnani N, Duerschmied D, Tasat D, Alvarez S, Reinöhl J, Zur Muhlen C v., Idzko M, Bode C, Hilgendorf I, Evelson P, Zirlik A. Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(4):44.
doi:10.1007/s00395-016-0562-5
78. Jandl K, Stacher E, Bálint Z, Sturm EM, Maric J, Peinhaupt M, Luschnig P, Aringer I, Fauland A, Konya V, Dahlen S-E, Wheelock CE, Kratky D, Olschewski A, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. Activated prostaglandin D2 receptors on macrophages enhance neutrophil recruitment into the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(3):833–43. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.012
79. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol*. 2011;265.
doi:10.3389/fimmu.2011.00065
80. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res*. 2005;661. doi:10.1186/1465-9921-6-61

81. Lumeng CN. Lung Macrophage Diversity and Asthma. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13 Suppl 1S31-4. doi:10.1513/AnnalsATS.201506-384MG
82. Girodet P-O, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E, Cernadas M. Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(4):467–75. doi:10.1165/rcmb.2015-0295OC
83. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):218–30. doi:10.1038/nri2262
84. Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages as cause or effect in airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(1):1–4. doi:10.1165/rcmb.2009-0407ED
85. Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2741–8. doi:10.1172/JCI60325
86. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(2):331–6. doi:10.1016/j.jaci.2006.03.041
87. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P, Leval L de, van Rooijen N, Le Moine A, Vanderplasschen A, Cataldo D, Drion P-V, Moser M, Lekeux P, Bureau F. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3723–38. doi:10.1172/JCI39717
88. Draijer C, Peters-Golden M. Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: The Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(2):12. doi:10.1007/s11882-017-0681-6
89. Fricker M, Gibson PG. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. *Eur Respir J.* 2017;50(3). doi:10.1183/13993003.00196-2017
90. Jiang Z, Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy.* 2016;9101–7. doi:10.2147/JAA.S104508
91. Staples KJ, Hinks TSC, Ward JA, Gunn V, Smith C, Djukanović R. Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: Overexpression of CCL17. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(6):1404-12.e7. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.023

92. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res.* 2018;1911–14. doi:10.1016/j.trsl.2017.09.002
93. Melgert BN, Oriss TB, Qi Z, Dixon-McCarthy B, Geerlings M, Hylkema MN, Ray A. Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(5):595–603. doi:10.1165/rcmb.2009-0016OC
94. Keselman A, Fang X, White PB, Heller NM. Estrogen Signaling Contributes to Sex Differences in Macrophage Polarization during Asthma. *J Immunol.* 2017;199(5):1573–83. doi:10.4049/jimmunol.1601975
95. Periyalil HA, Wood LG, Scott HA, Jensen ME, Gibson PG. Macrophage activation, age and sex effects of immunometabolism in obese asthma. *Eur Respir J.* 2015;45(2):388–95. doi:10.1183/09031936.00080514
96. Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):84–96. doi:10.1016/j.mce.2013.09.015
97. Liang Y-Q, Huang G-Y, Liu S-S, Zhao J-L, Yang Y-Y, Chen X-W, Tian F, Jiang Y-X, Ying G-G. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2015;160172–9. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.006
98. Murdock C, Wibbels T. *Dmrt1* expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2006;306(2):134–9. doi:10.1002/jez.b.21076
99. Fernandino JI, Hattori RS, Shinoda T, Kimura H, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA, Somoza GM. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev.* 2008;2(6):316–24. doi:10.1159/000195681
100. Leet JK, Gall HE, Sepulveda MS. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *J Appl Toxicol.* 2011;31(5):379–98. doi:10.1002/jat.1682
101. Hirst CE, Major AT, Smith CA. Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. *Int J Dev Biol.* 2018;62(1-2-3):153–66. doi:10.1387/ijdb.170319cs

102. Li M-H, Yang H-H, Li M-R, Sun Y-L, Jiang X-L, Xie Q-P, Wang T-R, Shi H-J, Sun L-N, Zhou L-Y, Wang D-S. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. *Endocrinology*. 2013;154(12):4814–25. doi:10.1210/en.2013-1451
103. Zhang X, Li M, Ma H, Liu X, Shi H, Li M, Wang D. Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* Results in Female to Male Sex Reversal in XX Nile Tilapia. *Endocrinology*. 2017;158(8):2634–47. doi:10.1210/en.2017-00127
104. Keselman A, Heller N. Estrogen Signaling Modulates Allergic Inflammation and Contributes to Sex Differences in Asthma. *Front Immunol*. 2015;6:568. doi:10.3389/fimmu.2015.00568
105. van den Berge M, Heijink HI, van Oosterhout AJM, Postma DS. The role of female sex hormones in the development and severity of allergic and non-allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1477–81. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03354.x
106. Capellino S, Straub RH, Cutolo M. Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1317:24–31. doi:10.1111/nyas.12398
107. Pelekanou V, Kampa M, Kiagiadaki F, Deli A, Theodoropoulos P, Agrogiannis G, Patsouris E, Tsapis A, Castanas E, Notas G. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER α 36 and GPR30/GPER1. *J Leukoc Biol*. 2016;99(2):333–47. doi:10.1189/jlb.3A0914-430RR
108. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD. Increased incidence of asthmalike symptoms in girls who become overweight or obese during the school years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(6):1344–9. doi:10.1164/ajrccm.163.6.2006140
109. Bel EH. Another piece to the puzzle of the "obese female asthma" phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(3):263–4. doi:10.1164/rccm.201306-1066ED
110. Sood A. Sex differences: Implications for the obesity-asthma association. *Exerc Sport Sci Rev*. 2011;39(1):48–56. doi:10.1097/JES.0b013e318201f0c4
111. Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, Mendelson CR. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res*. 1997;52:185-213; discussion 213-4.

112. Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER. Aromatase gene expression in adipose tissue: Relationship to breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1994;49(4-6):319–26. doi:10.1016/0960-0760(94)90274-7
113. Troisi RJ, Speizer FE, Willett WC, Trichopoulos D, Rosner B. Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(4 Pt 1):1183–8. doi:10.1164/ajrccm.152.4.7551368
114. Rubinow KB. An intracrine view of sex steroids, immunity, and metabolic regulation. *Mol Metab*. 2018. doi:10.1016/j.molmet.2018.03.001
115. Konings GFJ, Reynaert NL, Delvoux B, Verhamme FM, Bracke KR, Brusselle GG, Romano A, Vernooij JHJ. Increased levels of enzymes involved in local estradiol synthesis in chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;44323–31. doi:10.1016/j.mce.2016.12.001
116. Cutolo M, Sulli A, Straub RH. Estrogen metabolism and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6-7):A460-4. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.014
117. Villaggio B, Soldano S, Cutolo M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(6):934–8.
118. Campesi I, Marino M, Montella A, Pais S, Franconi F. Sex Differences in Estrogen Receptor α and β Levels and Activation Status in LPS-Stimulated Human Macrophages. *J Cell Physiol*. 2017;232(2):340–5. doi:10.1002/jcp.25425
119. Beck G, Habicht GS. Immunity and the Invertebrates. *Sci Am*. 1996;275(5):60–6. doi:10.1038/scientificamerican1196-60
120. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):418–28. doi:10.1038/nri2566
121. Roy SR, Schiltz AM, Marotta A, Shen Y, Liu AH. Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(3):571–8.
122. Schuijjs MJ, Willart MA, Vergote K, Gras D, Deswarte K, Ege MJ, Madeira FB, Beyaert R, van Loo G, Bracher F, Mutius E v., Chanez P, Lambrecht BN, Hammad H. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015;349(6252):1106–10. doi:10.1126/science.aac6623

123. Kilburg-Basnyat B, Peters TM, Perry SS, Thorne PS. Electrostatic dust collectors compared to inhalable samplers for measuring endotoxin concentrations in farm homes. *Indoor Air*. 2016;26(5):724–33. doi:10.1111/ina.12243
124. Leavy O. Asthma and allergy: Old McDonald had a farm (but no asthma)! *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):535. doi:10.1038/nri.2016.97
125. Müller-Rompa SEK, Markevych I, Hose AJ, Loss G, Wouters IM, Genuneit J, Braun-Fahrländer C, Horak E, Boznanski A, Heederik D, Mutius E v., Heinrich J, Ege MJ. An approach to the asthma-protective farm effect by geocoding: Good farms and better farms. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018. doi:10.1111/pai.12861
126. Seppälä IJ, Mäkelä O. Adjuvant effect of bacterial LPS and/or alum precipitation in responses to polysaccharide and protein antigens. *Immunology*. 1984;53(4):827–36.
127. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(6):779–85. doi:10.1016/j.mib.2013.09.007
128. Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ Health*. 2006;57. doi:10.1186/1476-069X-5-7
129. Zhu Z, Oh SY, Zheng T, Kim Y-K. Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):536–46. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03477.x
130. Michel O. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions. *J Endotoxin Res*. 2003;9(5):293–300. doi:10.1179/096805103225002539
131. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: Reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(3):379–92. doi:10.1067/mai.2002.122157
132. Murakami D, Yamada H, Yajima T, Masuda A, Komune S, Yoshikai Y. Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(3):339–47. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02633.x
133. Michel O, Duchateau J, Sergysels R. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J Appl Physiol*. 1989;66(3):1059–64. doi:10.1152/jappl.1989.66.3.1059
134. Matsuguchi T. Mast cells as critical effectors of host immune defense against Gram-negative bacteria. *Curr Med Chem*. 2012;19(10):1432–42.

135. Froidure A, Pilette C. From the hygiene hypothesis to A20: The protective effect of endotoxins against asthma development. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(2):192–3. doi:10.1111/cea.12651
136. Everhardt Queen A, Moerdyk-Schauwecker M, McKee LM, Leamy LJ, Huet YM. Differential Expression of Inflammatory Cytokines and Stress Genes in Male and Female Mice in Response to a Lipopolysaccharide Challenge. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0152289. doi:10.1371/journal.pone.0152289
137. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(2 Pt 1):308–17. doi:10.1164/ajrccm.154.2.8756799
138. Araújo L, Moreira A, Palmares C, Beltrão M, Fonseca J, Delgado L. Induced sputum in children: Success determinants, safety, and cell profiles. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):216–21.
139. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992;47(1):25–9.
140. Zissler U, ZAUM. SOP: Sputumaufarbeitung Asthma Stand: 23.04.2014.
141. DeVrieze BW, Bhimji SS. *StatPearls: Peak Flow Rate Measurement*. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL); 2018.
142. Boise E, Rotella M. ABCs of asthma inhaler and device training. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5 Suppl 1S71-5. doi:10.1002/alr.21605
143. Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, Carnevali S, Bancalari L, Dente FL, Di Franco A, Giannini D, Vagaggini B, Giuntini C. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(12):1395–400.
144. Spanevello A, Beghé B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, Ind PW. Comparison of two methods of processing induced sputum: Selected versus entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):665–8. doi:10.1164/ajrccm.157.2.9705095
145. Jubrail J, Kurian N, Niedergang F. Macrophage phagocytosis cracking the defect code in COPD. *Biomed J*. 2017;40(6):305–12. doi:10.1016/j.bj.2017.09.004

146. Harmsen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science*. 1985;230(4731):1277–80.
147. Lea SR, Reynolds SL, Kaur M, Simpson KD, Hall SR, Hessel EM, Singh D. The effects of repeated Toll-like receptors 2 and 4 stimulation in COPD alveolar macrophages. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13771–80. doi:10.2147/COPD.S97071
148. Mazzio EA, Li N, Bauer D, Mendonca P, Taka E, Darb M, Thomas L, Williams H, Soliman KFA. Natural product HTP screening for antibacterial (*E.coli* O157:H7) and anti-inflammatory agents in (LPS from *E. coli* O111:B4) activated macrophages and microglial cells; focus on sepsis. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):467. doi:10.1186/s12906-016-1429-x
149. Lugogo NL, Hollingsworth JW, Howell DL, Que LG, Francisco D, Church TD, Potts-Kant EN, Ingram JL, Wang Y, Jung S-H, Kraft M. Alveolar macrophages from overweight/obese subjects with asthma demonstrate a proinflammatory phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(5):404–11. doi:10.1164/rccm.201109-1671OC
150. Jeljeli M, Guérin-El Khourouj V, Lauzanne A de, Armand M, Chhor V, Pédrón B, Dauter S, Viala J, Gressens P, Faye A, Sterkers G. Altered cytokine profiles in children with indeterminate quantiferon results and common infections. *J Infect*. 2015;71(2):250–7. doi:10.1016/j.jinf.2015.03.014
151. Qian F, Wang W, Qiu Z, Shen Y, He J, Li D, Zhong J, Dai L. Evaluation of a new tuberculosis-related interferon gamma release assay for tuberculosis infection diagnosis in Huzhou, eastern China. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013;56(2):125–8. doi:10.4103/0377-4929.118694
152. Deb R, Shakib F, Reid K, Clark H. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J Biol Chem*. 2007;282(51):36808–19. doi:10.1074/jbc.M702336200
153. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JAB, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy*. 2006;45. doi:10.1186/1476-7961-4-5
154. Bessot JC, Pauli G. Mite allergens: An overview. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2011;43(5):141–56.

155. Fuiano N, Incorvaia C. Dissecting the causes of atopic dermatitis in children: Less foods, more mites. *Allergol Int.* 2012;61(2):231–43. doi:10.2332/allergolint.11-RA-0371
156. Ruggieri S, Drago G, Longo V, Colombo P, Balzan M, Bilocca D, Zammit C, Montefort S, Scaccianoce G, Cuttitta G, Viegi G, Cibella F. Sensitization to dust mite defines different phenotypes of asthma: A multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017;28(7):675–82. doi:10.1111/pai.12768
157. Davies P, Page RC, Allison AC. Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolases in macrophages exposed to group A streptococcal cell wall substance. *J Exp Med.* 1974;139(5):1262–82.
158. Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, Illi S, Mutius E v. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1491-9, 1499.e1-13. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.010
159. Williamson SI, Wannemuehler MJ, Jirillo E, Pritchard DG, Michalek SM, McGhee JR. LPS regulation of the immune response: Separate mechanisms for murine B cell activation by lipid A (direct) and polysaccharide (macrophage-dependent) derived from *Bacteroides* LPS. *J Immunol.* 1984;133(5):2294–300.
160. Li Y, Wang Z, Chen J, Ernst RK, Wang X. Influence of lipid A acylation pattern on membrane permeability and innate immune stimulation. *Mar Drugs.* 2013;11(9):3197–208. doi:10.3390/md11093197
161. Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):329–32. doi:10.5681/apb.2013.053
162. Esfahani A, Kendall CWC, Bashyam B, Archer MC, Jenkins DJA. The effect of physiological concentrations of sex hormones, insulin, and glucagon on growth of breast and prostate cells supplemented with unmodified human serum. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(10):856–62. doi:10.1007/s11626-010-9351-x
163. Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: A collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(3):170–83. doi:10.1093/jnci/djm323

164. Kerns RT, Miles MF. Microarray analysis of ethanol-induced changes in gene expression. *Methods Mol Biol.* 2008;447395–410. doi:10.1007/978-1-59745-242-7_26
165. Ahmad J, Baig MA, Ali AA, Al-Huqail A, Ibrahim MM, Qureshi MI. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. *3 Biotech.* 2017;7(6):373. doi:10.1007/s13205-017-1003-3
166. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
167. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8. doi:10.1038/nprot.2008.73
168. ThermoFisher Scientific Inc. [Internet]. 2019 [updated 2019 Jan 17]. Available from: https://www.thermofisher.com/taqman-gene-expression/product/Hs01015859_m1?CID=&ICID=&subtype=
169. Rasp FL, Clawson CC, Hoidal JR, Repine JE. Reversible impairment of the adherence of alveolar macrophages from cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1978;118(6):979–86. doi:10.1164/arrd.1978.118.6.979
170. Sköld CM, Barck C, Lundahl J, Johansson A. Different functional and morphological characteristics in a nonadherent subpopulation of human macrophages recovered by bronchoalveolar lavage. *European Respiratory Journal.* 1995;8(10):1719–24. doi:10.1183/09031936.95.08101719
171. Duff MO, Olson S, Wei X, Garrett SC, Osman A, Bolisetty M, Plocik A, Celniker SE, Graveley BR. Genome-wide identification of zero nucleotide recursive splicing in *Drosophila*. *Nature.* 2015;521(7552):376–9. doi:10.1038/nature14475
172. Szabo L, Morey R, Palpant NJ, Wang PL, Afari N, Jiang C, Parast MM, Murry CE, Laurent LC, Salzman J. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol.* 2015;16126. doi:10.1186/s13059-015-0690-5
173. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics.* 2009;10252 EP -. doi:10.1038/nrg2538

174. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, Feilitzén K v., Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, Heijne G v., Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419
175. Lindsay SJ, Xu Y, Lisgo SN, Harkin LF, Copp AJ, Gerrelli D, Clowry GJ, Talbot A, Keogh MJ, Coxhead J, Santibanez-Koref M, Chinnery PF. HDBR Expression: A Unique Resource for Global and Individual Gene Expression Studies during Early Human Brain Development. *Front Neuroanat*. 2016;1086. doi:10.3389/fnana.2016.00086
176. Asthma and COPD: Chapter 31 - Transcription Factors: Elsevier; 2009.
177. Latchman DS. Transcription factors: An overview. *Int J Exp Pathol*. 1993;74(5):417–22.
178. John Hildyard. Is there a method for detecting very low transcripts for qRT-PCR? [Internet]: Royal Veterinary College [cited 2019 Mar 5]. Available from: https://www.researchgate.net/post/Is_there_a_method_for_detecting_very_low_transcripts_for_qRT-PCR
179. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227–32. doi:10.1038/nrg3185
180. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 2011;7548. doi:10.1038/msb.2011.81
181. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):475–8. doi:10.1164/ajrccm.161.2.9903097
182. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(6):463–88.
183. Hou L-P, Chen H, Tian C-E, Shi W-J, Liang Y, Wu R-R, Fang X-W, Zhang C-P, Liang Y-Q, Xie L. The progestin norethindrone affects sex differentiation and alters

- transcriptional profiles of genes along the hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in juvenile zebrafish *Danio rerio*. *Aquat Toxicol*. 2018;20131–9. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.019
184. Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev*. 2009;30(4):343–75. doi:10.1210/er.2008-0016
185. Dang ZC, Lowik CWGM. Removal of serum factors by charcoal treatment promotes adipogenesis via a MAPK-dependent pathway. *Mol Cell Biochem*. 2005;268(1-2):159–67.
186. Tu C, Fiandalo MV, Pop E, Stocking JJ, Azabdaftari G, Li J, Wei H, Ma D, Qu J, Mohler JL, Tang L, Wu Y. Proteomic Analysis of Charcoal-Stripped Fetal Bovine Serum Reveals Changes in the Insulin-like Growth Factor Signaling Pathway. *J Proteome Res*. 2018;17(9):2963–77. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00135
187. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zähringer U, Brade H, Rietschel ET, Dougan G, Charles IG, Maskell DJ. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol*. 1998;29(2):571–9.
188. Rietschel ET, Kim YB, Watson DW, Galanos C, Lüderitz O, Westphal O. Pyrogenicity and immunogenicity of lipid A complexed with bovine serum albumin or human serum albumin. *Infection and Immunity*. 1973;8(2):173–7.
189. Fang W-F, Cho JH, He Q, Lin M-C, Wu C-C, Voelkel NF, Douglas IS. Lipid A fraction of LPS induces a discrete MAPK activation in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(2):L336-44. doi:10.1152/ajplung.00011.2007
190. Grant LR, Hammitt LL, Murdoch DR, O'Brien KL, Scott JA. Procedures for collection of induced sputum specimens from children. *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 2S140-5. doi:10.1093/cid/cir1069
191. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1146–9. doi:10.1164/ajrccm.164.7.2103015
192. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K-i, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther*. 2003;100(2):171–94.

193. Radha S, Afroz T, Prasad S, Ravindra N. Diagnostic utility of bronchoalveolar lavage. *J Cytol.* 2014;31(3):136–8. doi:10.4103/0970-9371.145636
194. Zhang Z, Long Q, Xie J. Roles of peptidoglycan recognition protein (PGRP) in immunity and implications for novel anti-infective measures. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2012;22(3):259–68.
195. Choe K-M, Werner T, Stöven S, Hultmark D, Anderson KV. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science.* 2002;296(5566):359–62. doi:10.1126/science.1070216
196. Belchamber KBR, Donnelly LE. Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62299–313. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_12
197. Ween MP, Whittall JJ, Hamon R, Reynolds PN, Hodge SJ. Phagocytosis and Inflammation: Exploring the effects of the components of E-cigarette vapor on macrophages. *Physiol Rep.* 2017;5(16). doi:10.14814/phy2.13370
198. Koh YI, Lee J-B, Lee S-R, Ji S-G, Choi I-S. Relationship between dendritic cells and activated eosinophils in induced sputum of asthmatics. *J Korean Med Sci.* 2005;20(3):384–9. doi:10.3346/jkms.2005.20.3.384
199. Davidson WJ, The S, Leigh R. Establishing a normal range for induced sputum cell counts in Western Canada. *Can Respir J.* 2013;20(6):424–5. doi:10.1155/2013/547309
200. Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: Their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J.* 2000;16(1):150–8.
201. Brooks CR, van Dalen CJ, Harding E, Hermans IF, Douwes J. Effects of treatment changes on asthma phenotype prevalence and airway neutrophil function. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):169. doi:10.1186/s12890-017-0511-6
202. Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(2):248–52.
203. Freeman CM, Crudgington S, Stolberg VR, Brown JP, Sonstein J, Alexis NE, Doerschuk CM, Basta PV, Carretta EE, Couper DJ, Hastie AT, Kaner RJ, O'Neal WK, Paine R, Rennard SI, Shimbo D, Woodruff PG, Zeidler M, Curtis JL. Design of a multi-center immunophenotyping analysis of peripheral blood, sputum and bronchoalveolar

- lavage fluid in the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study (SPIROMICS). *J Transl Med.* 2015;1319. doi:10.1186/s12967-014-0374-z
204. Bølling AK, Steensen TB, Alexis NE, Sikkeland LIB. Isolating and culturing of sputum macrophages: A potential ex vivo/in vitro model. *Exp Lung Res.* 2018;44(6):312–22. doi:10.1080/01902148.2018.1539788
205. Scheicher ME, Teixeira MM, Cunha FQ, Teixeira AL, Filho JT, Vianna EO. Eotaxin-2 in sputum cell culture to evaluate asthma inflammation. *Eur Respir J.* 2007;29(3):489–95. doi:10.1183/09031936.00060205
206. Frankenberger M, Menzel M, Betz R, Kassner G, Weber N, Kohlhäufel M, Häussinger K, Ziegler-Heitbrock L. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(3):507–16. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02637.x
207. Thermofisher Scientific. RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement [Internet] [cited 2019 Feb 12]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/61870044>
208. Courcol RJ, Damien JM, Ramon P, Voisin C, Martin GR. Presence of alveolar macrophages as a criterion for determining the suitability of sputum specimens for bacterial culture. *Eur J Clin Microbiol.* 1984;3(2):122–5.
209. Sikkeland LIB, Kongerud J, Stangeland AM, Haug T, Alexis NE. Macrophage enrichment from induced sputum. *Thorax.* 2007;62(6):558–9. doi:10.1136/thx.2006.073544
210. Method of the Year 2013. *Nat Methods.* 2014;11(1):1. doi:10.1038/nmeth.2801
211. DSMZ. Catalogue of human and animal cell lines [Internet]. DSMZ [cited 2019 Feb 13]. Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html#searchResult>
212. Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):1018–30. doi:10.1189/jlb.0306150
213. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 1977;270(5635):347–9.

214. Frankenberger M, Pforte A, Sternsdorf T, Passlick B, Baeuerle PA, Ziegler-Heitbrock HW. Constitutive nuclear NF-kappa B in cells of the monocyte lineage. *Biochem J.* 1994;304 (Pt 1):87–94.
215. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979;54(3):713–33.
216. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17(5):565–77.
217. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171–6.
218. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988;41(3):456–61.
219. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487–91.
220. O'Driscoll L, Daly C, Saleh M, Clynes M. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology.* 1993;12(1-3):289–314.
221. Ståhlberg A, Kubista M, Pfaffl M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem.* 2004;50(9):1678–80.
doi:10.1373/clinchem.2004.035469
222. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169–93.
223. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013;54(4):391–406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
224. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(4):856–62. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177

225. Tanaka S, Furukawa T, Plotkin SA. Human cytomegalovirus stimulates host cell RNA synthesis. *J Virol.* 1975;15(2):297–304.
226. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman B de, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol.* 1999;75(2-3):291–5.
227. Kalagara R, Gao W, Glenn HL, Ziegler C, Belmont L, Meldrum DR. Identification of stable reference genes for lipopolysaccharide-stimulated macrophage gene expression studies. *Biol Method Protoc.* 2016;1(1):bpw005. doi:10.1093/biomethods/bpw005
228. Tanaka A, To J, O'Brien B, Donnelly S, Lund M. Selection of reliable reference genes for the normalisation of gene expression levels following time course LPS stimulation of murine bone marrow derived macrophages. *BMC Immunol.* 2017;18(1):43. doi:10.1186/s12865-017-0223-y
229. Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
230. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
231. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6(4):279–84. doi:10.1038/sj.gene.6364190
232. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS ONE.* 2015;10(11):e0141853. doi:10.1371/journal.pone.0141853
233. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol.* 2008;93. doi:10.1186/1471-2199-9-3
234. Andersson D, Akrap N, Svec D, Godfrey TE, Kubista M, Landberg G, Ståhlberg A. Properties of targeted pre-amplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(8):1085–100. doi:10.1586/14737159.2015.1057124
235. Kroneis T, Jonasson E, Andersson D, Dolatabadi S, Ståhlberg A. Global pre-amplification simplifies targeted mRNA quantification. *Sci Rep.* 2017;7:45219. doi:10.1038/srep45219

236. Marx V. PCR: Paths to sensitivity. *Nat Methods*. 2014;11:241 EP -. doi:10.1038/nmeth.2849
237. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57–63. doi:10.1038/nrg2484
238. Zhang ZH, Jhaveri DJ, Marshall VM, Bauer DC, Edson J, Narayanan RK, Robinson GJ, Lundberg AE, Bartlett PF, Wray NR, Zhao Q-Y. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e103207. doi:10.1371/journal.pone.0103207
239. Nonis A, Nardi B de, Nonis A. Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: A back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(15):3533–6. doi:10.1007/s00216-014-7687-x
240. Wang Z, Weissman T, Milenkovic O. smallWig: Parallel compression of RNA-seq WIG files. *Bioinformatics*. 2016;32(2):173–80. doi:10.1093/bioinformatics/btv561
241. Gierahn TM, Wadsworth MH, Hughes TK, Bryson BD, Butler A, Satija R, Fortune S, Love JC, Shalek AK. Seq-Well: Portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods*. 2017;14(4):395–8. doi:10.1038/nmeth.4179
242. Mai Z, Xiao C, Jin J, Zhang G. Low-cost, Low-bias and Low-input RNA-seq with High Experimental Verifiability based on Semiconductor Sequencing. *Sci Rep*. 2017;7(1):1053. doi:10.1038/s41598-017-01165-w
243. Bai H, Lester GMS, Petishnok LC, Dean DA. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Biosci Rep*. 2017;37(6). doi:10.1042/BSR20160616
244. Görlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:607–60. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.607
245. Ying M, Chen B, Tian Y, Hou Y, Li Q, Shang X, Sun J, Cheng H, Zhou R. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin-beta. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(6):804–13. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.006
246. Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1445(1):53–64.
247. Jacobsen L, Calvin S, Lobenhofer E. Transcriptional effects of transfection: The potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *BioTechniques*. 2009;47(1):617–24. doi:10.2144/000113132

248. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat Res.* 2017;77391–103. doi:10.1016/j.mrrev.2017.05.002
249. Liu X, Fagotto F. A method to separate nuclear, cytosolic, and membrane-associated signaling molecules in cultured cells. *Sci Signal.* 2011;4(203):p12. doi:10.1126/scisignal.2002373

10 Anhang

10.1 Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. univ. Kabesch für seine Betreuung bedanken. Durch gute Zusammenarbeit und konstruktives Feedback wurde ich beim Verfassen dieser Doktorarbeit tatkräftig unterstützt.

Für die praktische Durchführung im Labor gilt mein Dank Herrn Dr. Maximilian Schieck und Frau Dr. Antoaneta Toncheva, die mir bei der Planung und bei der Durchführung der Experimente stets mit gutem Rat zur Seite standen. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Marta Torregrossa, die mir besonders bei den Sputum-Experimenten sehr oft als Freiwillige zur Verfügung stand und zur Etablierung dieser Methode maßgeblich beigetragen hat. Die Zusammenarbeit hat mir stets große Freude bereitet.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Domitille, die mich in allen Situationen unterstützte, ermutigte und mir mit ihren Ideen und Anregungen beim Schreiben der Arbeit und darüber hinaus sehr geholfen hat.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung von klein auf meine Ausbildung, mein Studium und das Verfassen dieser Arbeit ermöglicht hat.

10.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich habe nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.