

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und  
Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktion und pharmakologische Beeinflussung regulatorischer  
T Zellen bei Allergie und Asthma

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Caroline Lurz

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Stock

2. Priv.-Doz. Dr. med. O. Sommerburg

3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Schaub

Datum der Promotion: 07. September 2012.

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<hr/>		
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<hr/>		
<b>2.1</b>	<b>Das Immunsystem – Grundlagen</b>	<b>7</b>
2.1.1	T Lymphozyten	8
<b>2.2.</b>	<b>Allergie und Asthma</b>	<b>9</b>
2.2.1	Sensibilisierung	11
2.2.2.	Sofortreaktion	12
2.2.3	Spätreaktion	13
<b>2.3</b>	<b>T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Paradigma</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Regulatorische T Zellen</b>	<b>17</b>
2.4.1	Therapieansätze mit regulatorischen T Zellen	21
<b>2.5</b>	<b>Hypothesen</b>	<b>23</b>
<hr/>		
<b>3</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>Tiere</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Material</b>	<b>25</b>
3.2.1	Chemikalien	25
3.2.2.	Geräte	28
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
3.3.1	Etablierung von HKL als Immunadjuvans	30
3.3.1.1	Immunisierung mit dem Immunadjuvans HKL	30
3.3.1.2	Isolierung der Zellen und Restimulation <i>in vitro</i>	30
3.3.1.3	Analyse der Zytokinüberstände mittels ELISA	31

3.3.1.4	Proliferationsassay	32
3.3.2	Generierung und Analyse der Funktionsweise von regulatorischen T Zellen	33
3.3.2.1	Immunisierung	33
3.3.2.2	Isolation von CD8 $\alpha^+$ dendritischen Zellen mittels MACS	33
3.3.2.3	Reinheitskontrolle der CD8 $\alpha^+$ dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie	34
3.3.2.4	Isolation von DO11.10 OVA-TZR-transgenen CD4 $^+$ CD25 $^-$ T Zellen	34
3.3.2.5	Intravenöser Adoptivtransfer von DO11.10 T Zellen und CD8 $\alpha^+$ DCs	35
3.3.2.6	Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	35
3.3.2.7	Reinheitsbestimmung der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark mittels Durchflusszytometrie	36
3.3.2.8	Isolation der adoptiv transferierten DO11.10 T Zellen und Aufnahme in die Co-Kultur mit DCs und naiven DO11.10 T Zellen	36
3.3.2.9	Analyse der Proliferation mittels Durchflusszytometrie	38
3.3.2.10	Analyse der Zytokinüberstände mittels ELISA	39
3.3.3	Einfluss immunmodulatorischer Substanzen auf die Entwicklung regulatorischer T Zellen	39
3.3.3.1	Immunisierung	39
3.3.3.2	Isolation, Restimulierung und Analyse	41
3.3.4	Einfluss von HKL auf Immunzellen des Menschen	41
3.3.4.1	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen	41
3.3.4.2	Vergleich der Proliferationsrate von PBMC von Atopiker versus Non Atopiker	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von HKL auf die Immunantwort</b>	<b>43</b>
4.1.1	HKL als Adjuvans induziert eine T <sub>H</sub> 1 gewichtete Immunantwort <i>in vivo</i>	43

4.1.2	Intraperitoneal verabreichtes HKL induziert ebenfalls eine T <sub>H</sub> 1 gewichtete Immunantwort	45
<b>4.2</b>	<b>Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen</b>	47
4.2.1	Generierung regulatorischer T Zellen <i>in vivo</i>	49
4.2.2	Generierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark	49
4.2.3	Isolierung naiver T Zellen	50
4.2.4	Auswertung der Co-Kultur	50
4.2.4.1	Die Proliferationsrate der Effektor T Zellen wird bei direktem Zellkontakt mit regulatorischen T Zellen gehemmt	51
4.2.4.2	Die Funktionsweise regulatorischer T Zellen ist unabhängig von IFN- $\gamma$ und IL-10	53
4.2.4.3	TGF- $\beta$ und IL-2 haben einen Einfluss auf die Funktionsweise regulatorischer T Zellen	55
<b>4.3</b>	<b>Einfluss immunmodulatorischer Substanzen auf die Toleranzentwicklung</b>	56
4.3.1.	Respiratorische Toleranz wird durch Prednisolon und Methylprednisolon aufgehoben	56
4.3.2.	Tacrolimus und Cyclosporin A blockieren die respiratorische Toleranzentwicklung	59
<b>4.4</b>	<b>Humane Immunzellen reagieren auf HKL <i>in vitro</i> entsprechend muriner Zellen</b>	63
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	65
<b>5.1</b>	<b>Entdeckung der T<sub>H</sub>1 ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen</b>	66
<b>5.2</b>	<b>Funktionsweise T<sub>H</sub>1-ähnlicher T<sub>reg</sub> Zellen – direkter Zellkontakt oder Zytokine?</b>	68
5.2.1	Die Bedeutung der Proliferationsrate der Effektor T Zellen und die Rolle der Zytokine IL-10 und INF- $\gamma$ für die Funktionsweise T <sub>H</sub> 1-ähnlicher T <sub>reg</sub> Zellen	68
5.2.2.	Der Einfluss der Zytokine TGF- $\beta$ und IL-2 auf die Funktionsweise T <sub>H</sub> 1-ähnlicher T <sub>reg</sub> Zellen	69

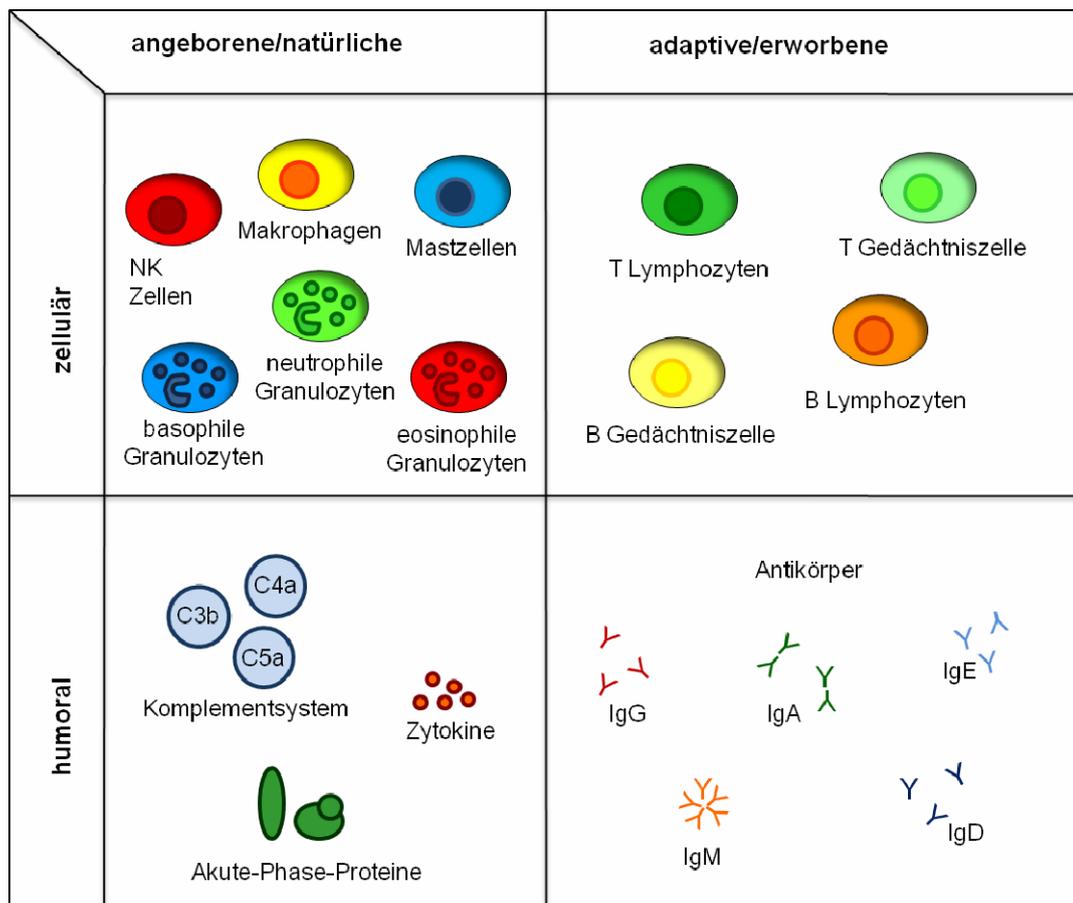
<b>5.3</b>	<b>Pharmakologische Unterdrückung der mukosalen Toleranzentwicklung</b>	73
5.3.1	Prednisolon und Methylprednisolon hemmen die Entwicklung einer T Zell Toleranz	73
5.3.2	Tacrolimus und Cyclosporin A unterdrücken ebenfalls die Entwicklung einer T Zell Toleranz	76
<b>5.4</b>	<b>Der Einfluss von HKL auf das humane Immunsystem</b>	78
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	81
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	83
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	98
8.1	Abbildungsverzeichnis	98
8.2	Abkürzungen	100
8.3	Curriculum vitae	102
8.4	Danksagung	104
8.5	Eidesstattliche Erklärung	105

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Das Immunsystem – Grundlagen

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Abwehr von Infektionserregern, körperfremden Noxen oder entarteten körpereigenen Zellen. Es wird eine angeborene, natürliche von einer adaptiven, erworbenen Immunantwort unterschieden, wie in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt. Die natürliche Immunität dient der ersten unspezifischen Abwehr und ist sehr schnell. Die adaptive Immunantwort richtet sich gezielt gegen Erreger, setzt verzögert ein und arbeitet sehr effizient. Zusätzlich entsteht ein immunologisches Gedächtnis und daher ein spezifischer Schutz gegen eine erneute Infektion (95). Beide Systeme werden in eine zelluläre und eine humorale Komponente unterteilt (Abb. 1). Bei der angeborenen Immunität stellen Makrophagen, Mastzellen, basophile-, neutrophile- und eosinophile Granulozyten sowie natürliche Killer Zellen (NK Zellen) den zellulären Anteil dar. Die humorale angeborene Immunität wird über das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokine vermittelt. Zytokine sind Signalstoffe, die von Zellen sezerniert werden und der Kommunikation dienen. Hierzu gehören unter anderem Interleukine, Interferone und Chemokine. Sie treten auch im erworbenen Immunsystem auf. Die Zellen der adaptiven Immunantwort sind Lymphozyten. Man unterscheidet T- und B Lymphozyten. Beide entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. B Zellen haben die Fähigkeit nach Aktivierung zu Plasmazellen heranzureifen, um dann Antikörper zu produzieren und zu sezernieren. Antikörper sind Teil des humoralen, erworbenen Immunsystems. Es sind fünf verschiedene Klassen von Antikörpern bekannt: Immunglobulin (Ig) A, IgD, IgE, IgG und IgM. Bei dem Immunglobulin G sind verschiedene Unterformen beschrieben worden: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (95).

## Immunität



**Abb. 1: Die angeborene (natürliche) und die adaptive (erworbene) Immunität**

Die Immunantwort wird in eine angeborene und eine adaptive Immunität unterteilt. Die Charakteristika der angeborenen Immunität sind Schnelligkeit und Unspezifität während die adaptive Immunantwort spezifisch, sehr effizient und verzögert ist. Beide Immunantworten bestehen aus einer zellulären und einer humoralen Komponente.

### 2.1.1 T Lymphozyten

Die T Lymphozyten entwickeln sich im Thymus und reifen dort zu verschiedenen T Zell-Populationen heran, die sich durch ihre Oberflächenmoleküle unterscheiden. Cluster of Differentiation (CD) 4 und CD8 stellen zwei dieser Unterscheidungsmerkmale dar. Beide Moleküle sind Teil des T Zell Rezeptors (TZR). CD8<sup>+</sup> T Zellen werden auch zytotoxische T Zellen genannt. Lymphozyten, die CD4 exprimieren, werden als T Helferzellen (T<sub>H</sub> Zellen) bezeichnet. Beiden Zellpopulationen muss das Antigen von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) dargeboten werden. Den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen wird das Antigen über die Major

**H**istocompatibility Complex (MHC)-I-Moleküle präsentiert.  $CD4^+$   $T_H$  Zellen erkennen nur Antigene, die über das MHC-II-Molekül angeboten werden (95).

Die  $CD4^+$   $T_H$  Zellen werden nach ihrem Zytokinmuster in weitere Subpopulationen eingeteilt, die aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der sogenannten naiven  $T_H$  Zelle, entstehen. Die Ausdifferenzierung der einzelnen Populationen wird über verschiedene Interleukine und Interferone gesteuert, die von dendritischen Zellen (DCs) und anderen Quellen stammen (29, 211, 221). Die zwei ersten klassifizierten  $T_H$  Zellen waren die  $T_H1$ - und die  $T_H2$  Zelle (42, 140).

Das Immunsystem ist normalerweise in der Lage zwischen gefährlichen, körperschädigenden und harmlosen Antigenen zu unterscheiden (94, 127). Reagiert ein Organismus auf allgegenwärtige apathogene Antigene, wie Pollen oder Tierhaare, so spricht man von Allergie.

## **2.2. Allergie und Asthma**

Der Begriff „Allergie“ stammt aus dem Griechischen (allos = fremd, ergon = Reaktion). Man bezeichnet damit die erworbene Überempfindlichkeitsreaktion von Individuen gegenüber harmlosen Fremdstoffen bei wiederholter Exposition. Der Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet führte den Begriff Allergie in die medizinische Fachsprache um 1900 ein. Er differenzierte damit die immunologische Reaktion in eine physiologische, schützende Immunität und eine das Individuum schädigende Hypersensitivität (1, 208).

Heute beschreibt der Begriff Allergie unterschiedliche immunologische Erkrankungen, die nach ihren pathophysiologischen Mechanismen in vier Typen eingeteilt werden (Abb.2). Nicht alle Erkrankungen lassen sich eindeutig einem Typ zuordnen.

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ VI		
Immun-kompo-nenten	IgE	IgG	IgG	T <sub>H</sub> 1 Zellen	T <sub>H</sub> 2 Zellen	zytotoxische T Zellen
Antigene	lösliches Antigen	zell- oder matrix-assoziertes Antigen	lösliches Antigen	lösliches Antigen	lösliches Antigen	zell-assoziertes Antigen
Effektor-mechanis-mus	Mastzell-aktivierung	FcR <sup>+</sup> Zellen (Phagozyten NK Zellen)	FcR <sup>+</sup> Zellen Komplement-system	Makro-phagen-aktivierung	Aktivierung von eosinophilen Zellen	Zytotoxizität
Beispiele für Überempfind-lichkeits Reaktionen	allergische Rhinitis, Asthma, systemische Anaphylaxie	Medika-menten-allergien (Penicillin etc.)	Serum-krankheit, Arthus-reaktion	Kontakt-dermatitis, Tuberkulin-reaktion	chronisches Asthma, chronische allergische Rhinitis	Kontakt-dermatitis

**Abb. 2: Die vier Typen der Hypersensitivitätsreaktion nach Coombs und Gell**

Die Typ-I-Reaktion (Soforttyp) ist IgE-vermittelt. Der Typ II wird auch als zytotoxischer Typ bezeichnet und ist antikörpervermittelt. Typ III wird auch als Immunkomplexvermittelte Hypersensitivität bezeichnet und Typ IV (verzögerter Typ) ist zellvermittelt (modifiziert nach Janeway et al., 2004, Immunobiology) (95).

Die häufigste Form ist die oft auch als IgE-vermittelte Hypersensitivität bezeichnete Typ-I-Reaktion. Sie lässt sich in eine Sofortreaktion und eine Spätreaktion unterteilen (112).

Allen Typen gemeinsam ist eine übersteigerte Reaktion des Immunsystems, die sich unterschiedlich äußern kann: An den Schleimhäuten mit den Symptomen der allergischen Rhinitis und Konjunktivitis; an der Haut als atopische Dermatitis, Kontaktekzem oder Urtikaria; am Gastrointestinaltrakt mit Durchfall und Erbrechen, als systemische Maximalform ein anaphylaktischer Schock oder an den Atemwegen mit allergischem Asthma bronchiale (65).

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch variable Atemwegsobstruktionen und einer unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität. Es kommt zum Spasmus der glatten Muskulatur der Bronchien, Ödembildung an der Bronchialschleimhaut und einer Dyskrie (52). Das Asthma wird zum Typ I der Hypersensitivitätsreaktionen gezählt.

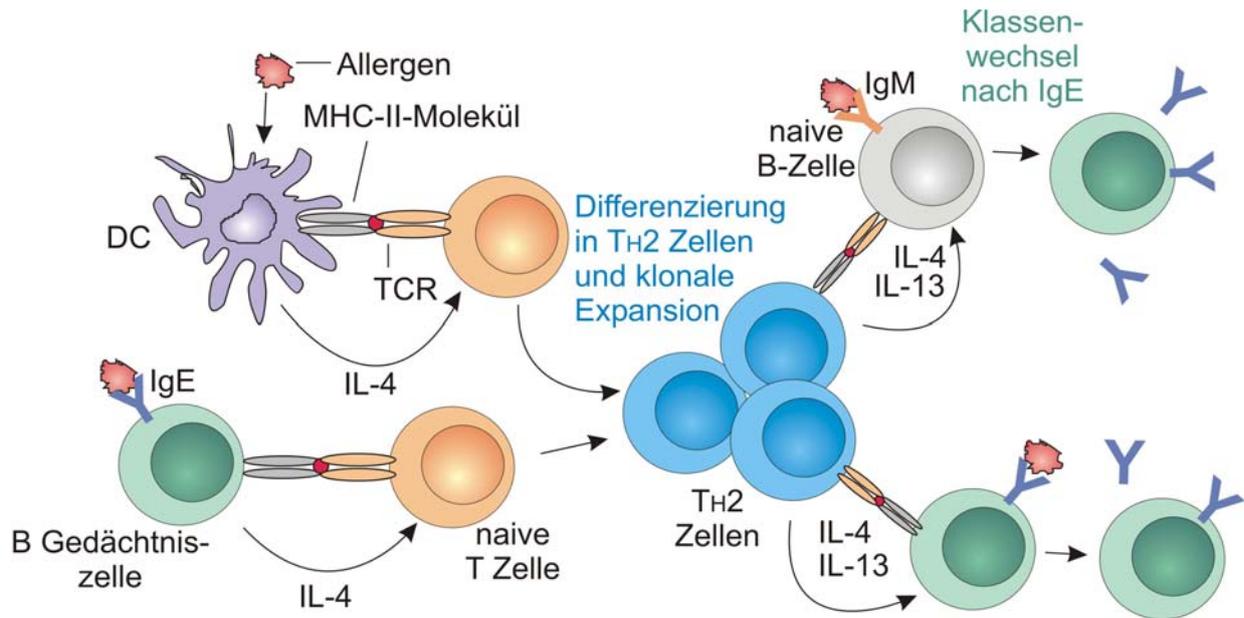
Die Prävalenz von allergischen Erkrankungen ist in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten weltweit gestiegen (206, 207). Besonders betroffen sind Kinder und Erwachsene in den

westlichen Industrienationen mit etwa 10% aller Individuen (2, 22). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Anstieg um eine echte Zunahme allergischer Erkrankungen handelt und nicht etwa um eine Folge besserer diagnostischer Möglichkeiten oder erhöhter Aufmerksamkeit (129). In den westlichen Industriestaaten ist das Asthma bronchiale mittlerweile die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter. Der weiter ansteigenden Prävalenz der allergischen Erkrankungen stehen geringe Fortschritte bei der Entwicklung kurativer Therapieoptionen gegenüber.

Aus dem besseren Verständnis der immunologischen Mechanismen, die bei allergischen Erkrankungen und Asthma bronchiale ablaufen, können sich neue Präventions- und Therapieansätze ergeben.

### **2.2.1 Sensibilisierung**

Eine allergische Reaktion tritt typischerweise nicht bei Erstkontakt mit dem Allergen auf. Erst nach der Sensibilisierung und bei erneutem Kontakt kommt es zur Ausbildung allergischer Symptome. In den Körper gelangte Allergene werden in der Sensibilisierungsphase von professionellen APCs, den DCs, aufgenommen, prozessiert und über MHC II den naiven  $CD4^+$   $T_H$  Zellen präsentiert. Diese werden durch costimulative Faktoren und Zytokine aktiviert und treffen als allergen-spezifische  $T_H$  Zellen auf B Zellen (102). Es kommt zu einer Interaktion zwischen den beiden Zellpopulationen. Die B Zelle wandelt sich zur Plasmazelle, durchläuft einen Klassenwechsel der Immunglobuline und sezerniert allergen-spezifisches IgE (Abb. 3) (92, 96).



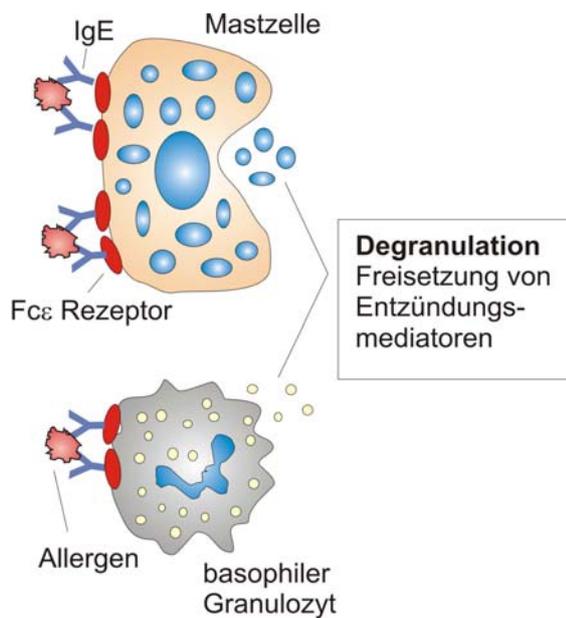
**Abb. 3: Sensibilisierungsphase und Gedächtniszellinduktion**

In der Sensibilisierungsphase werden Allergene von DCs und Gedächtniszellen an naive T Zellen präsentiert. Diese differenzieren zu  $T_H2$  Zellen, expandieren klonal und induzieren über die Sekretion von IL-4 und IL-13 einen Klassenwechsel der Immunglobuline nach IgE bei naiven B Zellen und B Gedächtniszellen (modifiziert nach Larché et al. Nat.Rev.Immunol. 2006) (112).

IgE ist ein Antikörper, der im Körper sowohl an den  $Fc\epsilon$  Rezeptor I (hoch-affin) oder  $Fc\epsilon$  Rezeptor II (niedrig-affin) gebunden als auch löslich vorliegt (107). Die Mehrzahl der IgE Antikörper binden an den hoch-affinen  $Fc\epsilon$  Rezeptor I, der sich auf den Oberflächen von Mastzellen, basophilen Granulozyten und APCs befindet.

### 2.2.2. Sofortreaktion

Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Allergen kommt es zur Kreuzvernetzung der zellgebundenen IgE Antikörper auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, was wiederum zur Freisetzung der Entzündungsmediatoren führt (Abb. 4). Zu den bekanntesten gehören Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Leukotriene, verschiedene Proteasen und Zytokine (112).



**Abb. 4: Sofortreaktion der Typ-I-Reaktion**

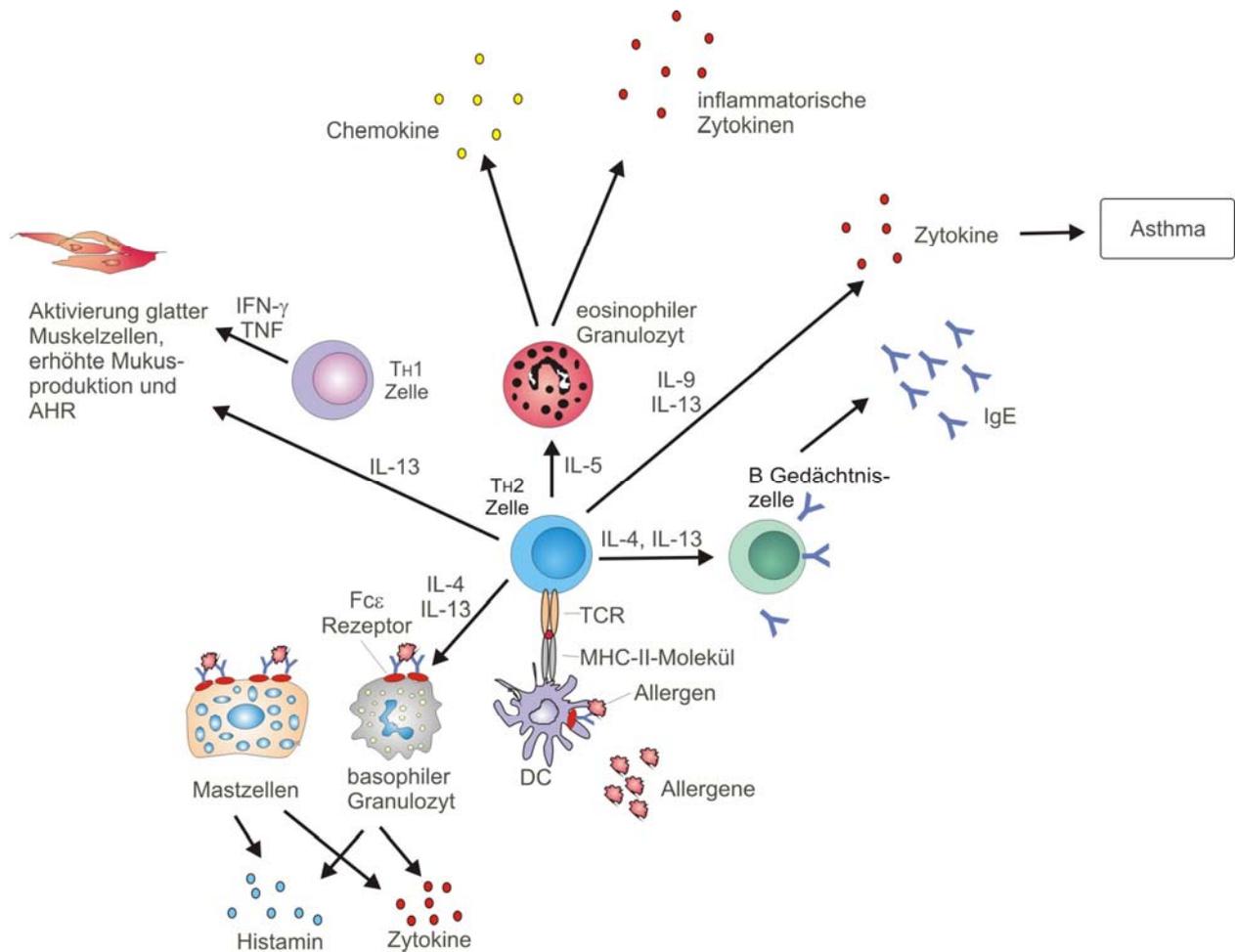
Über die Kreuzvernetzung von IgE durch Allergene auf basophilen Granulozyten und Mastzellen kommt es zur Degranulation von vasoaktiven Substanzen (modifiziert nach Larché et al. Nat.Rev.Immunol. 2006) (112).

Zusammen verursachen sie die bekannten Symptome einer Entzündungsreaktion. Durch die Erhöhung der vaskulären Permeabilität und die Vasodilatation kommt es zur Schwellung, Rötung und Überwärmung. Die Stimulation der kutanen Nervenendigungen führt zum Juckreiz und in den Atemwegen kommt es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur. Dies stellt die Sofortreaktion dar. Sie setzt bei wiederholtem Kontakt mit dem Allergen innerhalb von Sekunden ein (72).

### 2.2.3 Spätreaktion

Nach circa acht bis zwölf Stunden kommt es zur verzögerten Immunreaktion. Die aktivierten Mastzellen sezernieren Zytokine, die zu einer Induktion allergen-spezifischer T<sub>H</sub>2 Zellen führen (65). Die Pathogenese des Asthma bronchiale, und von Allergien allgemein, wird entscheidend von der inadäquaten Überproduktion von T<sub>H</sub>2 Zytokinen bestimmt: Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-9 und IL-13 gehören zu den wichtigsten. IL-4 bedingt eine erneute Synthese von IgE durch antigenspezifische B Zellen (Abb. 5). Das IL-5 ist verantwortlich für die Differenzierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, die maßgeblich an der allergischen Inflammation beteiligt sind. Durch Degranulation werden basische toxische Proteine aus Vesikeln der eosinophilen Granulozyten freigesetzt, die zu einer Epithelschädigung der Atemwege führen. Über das Zytokin IL-9 kommt es zu einer gesteigerten Differenzierung von Mastzellen. IL-13 erhöht die Mukusproduktion im Respirationstrakt und führt zu einer Atemwegshyperreaktivität

(AHR) (197, 217, 103). Die AHR ist ein Hauptmerkmal des bronchialen Asthmas. Es ist eine Überempfindlichkeit der glatten Atemwegsmuskulatur auf unspezifische Reize (196). Letztendlich mündet die Spätreaktion in eine chronische Entzündung der Atemwege durch die Akkumulation von  $T_H2$  Zellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Es kommt zur Zerstörung und zum fibrotischen Umbau des Atemwegsepithels, dem Remodeling.



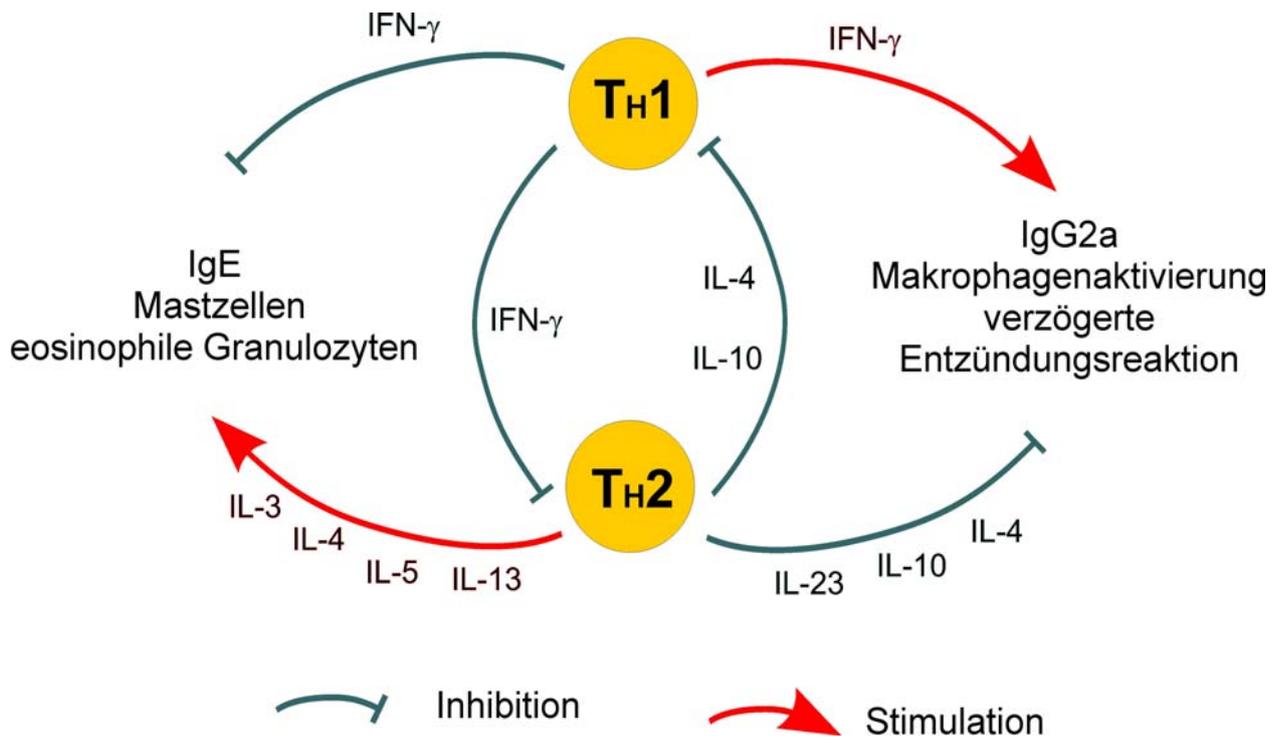
**Abb. 5: Spätreaktion der allergischen Entzündungsreaktion**

Im Zentrum der Spätreaktion steht die  $T_H2$  Zelle, die über die DCs aktiviert wird. Die inadäquat hohe Ausschüttung der  $T_H2$  Zytokine führt zur Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, basophilen Granulozyten und B Gedächtniszellen. Beim Asthma bronchiale endet diese Überreaktion in einer AHR und dem Remodeling (modifiziert nach Larché et al. Nat.Rev.Immunol. 2006) (112).

### 2.3 T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Paradigma

Die T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Zell-Dichotomie wurde von T. R. Mosmann und R. L. Coffman Ende der Achtziger Jahre beschrieben (139). Dieses Paradigma hat wesentlich zur Aufschlüsselung der T Zell-Funktionen beigetragen, stellt jedoch eine starke Vereinfachung des komplexen Systems der T<sub>H</sub> Zellen dar (42, 43, 141). T<sub>H</sub>1 Zellen produzieren überwiegend Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und IL-2 (140) und sind wesentlicher Bestandteil bei der Bekämpfung von intrazellulären Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Hefen (179). Aus undifferenzierten naiven T<sub>H</sub> Zellen entstehen durch den Einfluss von IL-12 und den Transkriptionsfaktoren T-box transcription factor (T-bet) und Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) -4 aktive T<sub>H</sub>1 Zellen (29, 93, 191). Bei der Ausdifferenzierung von T<sub>H</sub>2 Zellen sind neben IL-4 die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und STAT-6 beteiligt (98, 221). T<sub>H</sub>2 Zellen produzieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 sowie IL-2 und spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Parasiten (156, 178). Über diese Interleukine induzieren T<sub>H</sub>2 Zellen eosinophile Granulozyten, die Produktion von IgE (46), die Differenzierung von Mastzellen, eine Steigerung der Mukusproduktion und die AHR (197, 167). Eine Überproduktion von T<sub>H</sub>1 assoziierten Zytokinen wird bei Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ 1, Rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose (73, 118, 146, 160) und Abstoßungsreaktionen nach Transplantation beobachtet, während die T<sub>H</sub>2 assoziierten Zytokine bei allergischen Reaktionen wie dem Asthma bronchiale und parasitärem Befall sehr hoch sind (166, 81, 147).

Das T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Paradigma betrachtet die T<sub>H</sub>1 Zellen und die T<sub>H</sub>2 Zellen als direkte Gegenspieler (Abb. 6). Die durch Zytokine vermittelte gegenseitige Beeinflussung ist ein wichtiges Prinzip der Immunregulation (149).



**Abb. 6: Das  $T_H1$  /  $T_H2$  Paradigma**

$T_H1$ - und  $T_H2$  Zellen waren die beiden ersten  $T_H$  Zell-Subtypen, die beschrieben wurden, wobei eine gegenseitige Beeinflussung postuliert wurde. Bis heute ist die Vorstellung, dass beide Zellen Gegenspieler sind, nicht widerlegt, gilt jedoch als sehr vereinfacht und das  $T_H1$  /  $T_H2$  Paradigma gibt nur einen Ausschnitt von vielen  $T_H$  Zellen wieder (modifiziert nach Coffman, R. L. Nat. Immunol. 2006) (43).

Die IL-4 vermittelte Herunterregulierung des Rezeptors für IL-12 (190) oder umgekehrt die hemmende Wirkung des  $T_H1$  Zytokins IFN- $\gamma$  auf die Entwicklung der  $T_H2$  Antwort (56) sind nur zwei Beispiele für eine Vielzahl von Interaktionen, die das Immunsystem immer wieder neu einstellen.

Die Beobachtung, dass  $T_H1$  Zellen in manchen Systemen  $T_H2$  Zellen gegenregulieren können, hat zu der Annahme geführt, dass allergenspezifische  $T_H1$  Zellen das Auftreten allergischer Erkrankungen und Asthma in gesunden Individuen verhindern (177). Neuere Studien zeigen jedoch, dass dies nicht zutrifft. Es konnte gezeigt werden, dass  $T_H1$  Zellen sich proinflammatorisch auswirken und diese  $T_H1$  assoziierte Immunantwort allergische Erkrankungen und Asthma nicht positiv beeinflussen (76, 162). Die Arbeitsgruppe um D. T. Umetsu und andere Autoren haben gezeigt, dass der adoptive Transfer von  $T_H1$  Zellen im Mausmodell  $T_H2$  Effektorzellen nicht etwa blockiert, sondern die Atemwegsentzündung noch verstärkt (76).

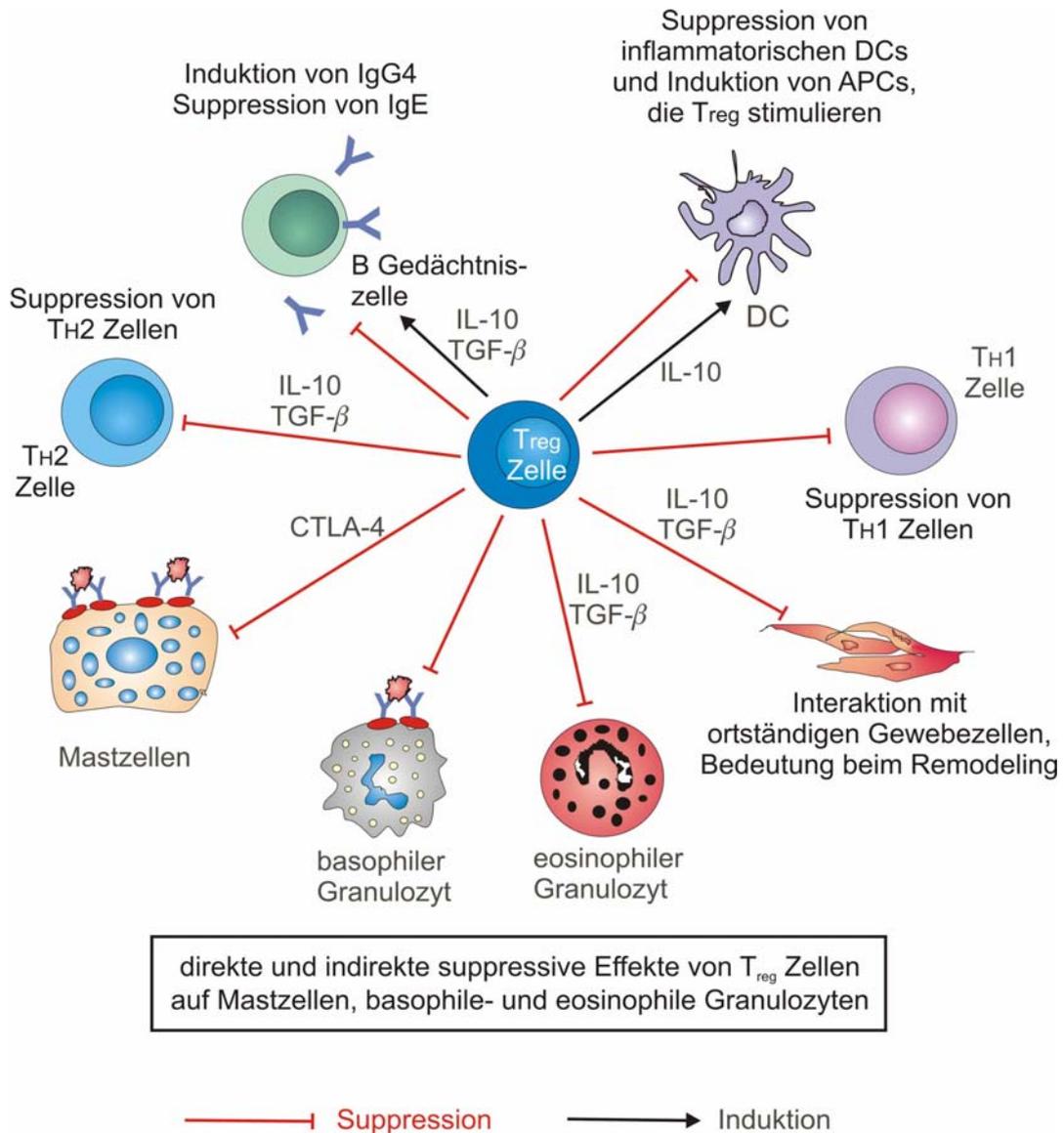
Zusätzlich sind in den Lungen nichtallergischer Individuen keine allergenspezifischen T Zellen nachweisbar, auch keine  $T_{H1}$  Zellen. Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Regulationsmechanismen existieren, die vor der Entwicklung allergischer Erkrankungen und Asthma schützen, ohne dass es zu einer Infiltration von  $T_{H1}$  Zellen kommt (198).

Bach et al. konnten zeigen, dass in den letzten Jahrzehnten sowohl die Inzidenz von  $T_{H1}$ - als auch  $T_{H2}$ - assoziierten Krankheiten gestiegen ist. Autoimmunerkrankungen ebenso wie die allergischen Erkrankungen nehmen in der Bevölkerung zu. Wären  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  direkte Gegenspieler, so müsste, wenn eine Krankheitsgruppe zunimmt, die andere Seite abnehmen (17). Dies ist jedoch nicht der Fall. Es muss weitere Mechanismen für die Homöostase des Immunsystems geben, neben der gegenseitigen Regulierung von  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  (33). Man geht heute von einer Vielzahl verschiedener T Zellen mit variierenden Zytokinprofilen aus. Schon 1989 postulierten T. R. Mosmann und R. L. Coffman, dass ihr Paradigma erweiterbar sei (140). Seitdem sind weitere Subpopulationen charakterisiert worden. Zu ihnen gehören „tolerante“ T Zellen, die eine regulatorische Rolle spielen. Diese protektiven Regulationsmechanismen gesunder Individuen scheinen eine allergenspezifische Toleranz zu sein, sehr wahrscheinlich bedingt durch aktive regulatorische T Zellen ( $T_{reg}$  Zelle).

## 2.4 Regulatorische T Zellen

Eine der grundlegenden Fragen in der Immunologie ist, wie es zur Ausbildung einer immunologischen Toleranz kommt und wie sie aufrechterhalten wird. Das Immunsystem höherer Organismen steht vor der Aufgabe, ein Gleichgewicht zu schaffen zwischen effektiver Immunabwehr gegen potentiell gefährliche Mikroorganismen einerseits und Immuntoleranz gegen ungefährliche Antigene andererseits.

Neben der klonalen Deletion und der Anergie, die eine Selbsttoleranz über Elimination oder die funktionelle Inaktivierung von Lymphozyten induzieren (6, 127, 155), ist in einer Vielzahl von Untersuchungen die Existenz von  $T_{reg}$  Zellen eindeutig belegt worden (14, 122, 173). Diese können aktiv eine Induktion und Expansion von Effektor T Zellen unterdrücken.  $T_{reg}$  Zellen nehmen eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems ein. Sie bewirken eine Toleranz gegenüber Auto- und Fremddantigenen (Abb. 7).



**Abb. 7: Effekte regulatorischer T Zellen**

T<sub>reg</sub> Zellen üben ihre regulatorische Funktion unter anderem über die Zytokine IL-10 und TGF-β aus. Sie wirken überwiegend suppressiv auf verschiedene Zellen des Immunsystems (modifiziert nach Akdis M. Curr.Opin.Immunol. 2009) (11).

Diese wichtige regulatorische Rolle kann über Ausschüttung inhibitorischer Zytokine, direkte Inhibition von T Zellen oder direkten Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen erklärt werden. Die Signale, welche die Differenzierung von T Zellen in eine aktivierende oder in eine regulatorische Funktion polarisieren, sind noch ungeklärt. Es ist bisher nicht bekannt, ob T<sub>reg</sub> Zellen einen grundsätzlich eigenständigen Zelltyp darstellen, oder ob herkömmliche T Zellen je nach Stärke und Qualität bestimmter Signale sich entweder zu aktiven Effektoren oder Regulatoren des Immunsystems differenzieren.

Nachdem ihre Existenz lange Zeit angezweifelt wurde, sind inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Typen von  $T_{\text{reg}}$  Zellen beschrieben worden. Zu ihnen gehören  $CD4^+CD25^+$  T Zellen,  $T_{\text{H}3}$ ,  $T_{\text{R}1}$ , natürliche Killer T Zellen (76),  $T_{\text{H}1}$ -ähnliche und  $T_{\text{H}2}$ -ähnliche regulatorische Zellen (Abb. 8).

Am besten untersucht sind die  $CD4^+CD25^+$  T Zellen, die sich im Thymus gesunder Mäuse entwickeln (173, 174). Sie machen etwa 5 - 10% aller  $CD4^+$  T Zellen naiver Mäuse aus und hemmen autoreaktive T Zellen. Von besonderer Bedeutung ist der Transkriptionsfaktor Forkhead box p3 (Foxp3), der spezifisch für diese Zellen zu sein scheint (53, 57, 58, 88). Die Depletion der  $CD4^+CD25^+$  T Zellen bewirkt die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Thyreoiditis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder den Typ 1 Diabetes. Klinisch zeigt sich dies als immune Dysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-gekoppeltes Syndrom (**I**mmune **D**ysregulation, **P**olyendocrinopathy **E**nteropathy **X**-linked syndrome = IPEX) bei Menschen oder in so genannten Scurfy Mäusen (37, 39). Zellen mit diesen Eigenschaften werden auch natürliche  $T_{\text{reg}}$  Zellen genannt.

Den natürlichen  $T_{\text{reg}}$  Zellen werden die adaptiven  $T_{\text{reg}}$  Zellen gegenübergestellt (31). Als adaptive  $T_{\text{reg}}$  Zellen werden antigen-spezifische  $T_{\text{reg}}$  Zellen bezeichnet, die sich in der Peripherie aus naiven  $T_{\text{H}}$  Zellen differenzieren. Hierzu gehören die antigenspezifischen  $T_{\text{R}1}$  Zellen, die *in vitro* unter IL-10 Gabe entstehen, selbst IL-10 produzieren und die Entwicklung einer experimentell induzierten Colitis ulcerosa in **S**evere **C**ombined **I**mmunodeficiency (SCID) -Mäusen verhindern (73).

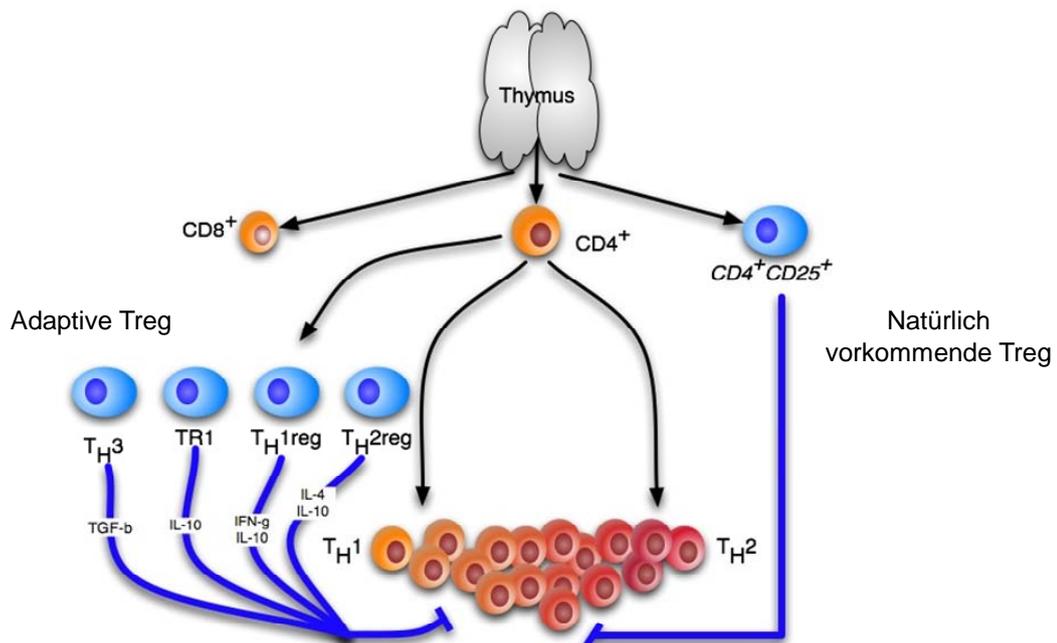
Orale Antigenexposition führt zur Ausbildung von  $T_{\text{H}3}$  Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Sie produzieren IL-10, Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und IL-4. Sie wirken der Entstehung einer experimentellen autoimmunen **E**nzephalomyelitis (EAE) entgegen und können sie sogar unterdrücken. Die EAE stellt ein Tiermodell für die Multiple Sklerose des Menschen dar (41).

Bei den  $T_{\text{H}1}$ -ähnlichen  $T_{\text{reg}}$  Zellen handelt es sich um eine Population von adaptiven  $T_{\text{reg}}$  Zellen, die sich *in vivo* aus naiven  $CD4^+CD25^-$  T Zellen während einer  $T_{\text{H}1}$  gewichteten Immunantwort entwickeln. Die  $T_{\text{H}1}$ -ähnlichen regulatorischen Zellen sind die regulatorischen T Zellen, deren funktionelle Eigenschaften in dieser Arbeit näher untersucht wurden.  $CD8\alpha^+$ DCs induzieren die Entstehung dieser  $T_{\text{reg}}$  Zellen *in vivo*. Ausgereifte  $CD8\alpha^+$ DCs produzieren IL-10 und IL-12 und exprimieren den **I**nducible **C**ostimulator-**L**igand (ICOSL). Blockiert man eines der Zytokine oder den **I**nducible **C**ostimulator (ICOS)-ICOSL-Weg, ist der inhibitorische Effekt der  $T_{\text{H}1}$ -

ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen aufgehoben. Alle drei Induktionswege scheinen für die Ausreifung der T<sub>reg</sub> Zellen von zentraler Bedeutung zu sein (184).

Diese Subpopulationen von T Zellen besitzen klassische Eigenschaften von T<sub>H1</sub> Zellen wie die Expression von T-bet, die Produktion von IFN- $\gamma$  und die Induktion über CD8 $\alpha^+$  DCs. Sie zeigen jedoch auch charakteristische Merkmale einer regulatorischen T Zelle wie die Expression von ICOS und Foxp3 und die Fähigkeit IL-10 zu exprimieren. Trotz ihrer engen Beziehung zu T<sub>H1</sub> Zellen lassen sich diese T<sub>reg</sub> Zellen klar abgrenzen (184).

Diese, für das Antigen Ovalbumin (OVA) spezifischen T<sub>H1</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen (T<sub>H1reg</sub> Zellen), stellen in gewisser Hinsicht das Gegenstück zu den T<sub>H2</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> dar. T<sub>H2</sub>-ähnliche T<sub>reg</sub> werden über CD8 $\alpha^-$  DCs induziert, exprimieren den T<sub>H2</sub>-Haupttranskriptionsfaktor GATA3 und, ebenso wie die T<sub>H1</sub>-ähnlichen regulatorischen Zellen, Foxp3 und IL-10. In einem Zwischenstadium produzieren sie IL-4 (5). Beide Zellpopulationen sind in der Lage eine bestehende AHR zur unterdrücken.



**Abb. 8: Schematische Darstellung verschiedener regulatorischer T Zellen**

Aus dem Thymus entwickeln sich direkt natürlich vorkommende T<sub>reg</sub> Zellen und naive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T Zellen. Naive CD4<sup>+</sup> T Zellen entwickeln sich weiter zu T<sub>H1</sub>-, T<sub>H2</sub>- und verschiedenen adaptiven T<sub>reg</sub> Zellen. Beide Arten von T<sub>reg</sub> Zellen wirken hemmend auf die T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub> Zellen. (Prof. Dr. Philippe Stock)

Das Ausbleiben dieser Toleranzentwicklung scheint ein wichtiger ätiologischer Faktor für allergische Erkrankungen zu sein und bietet daher einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie (87).

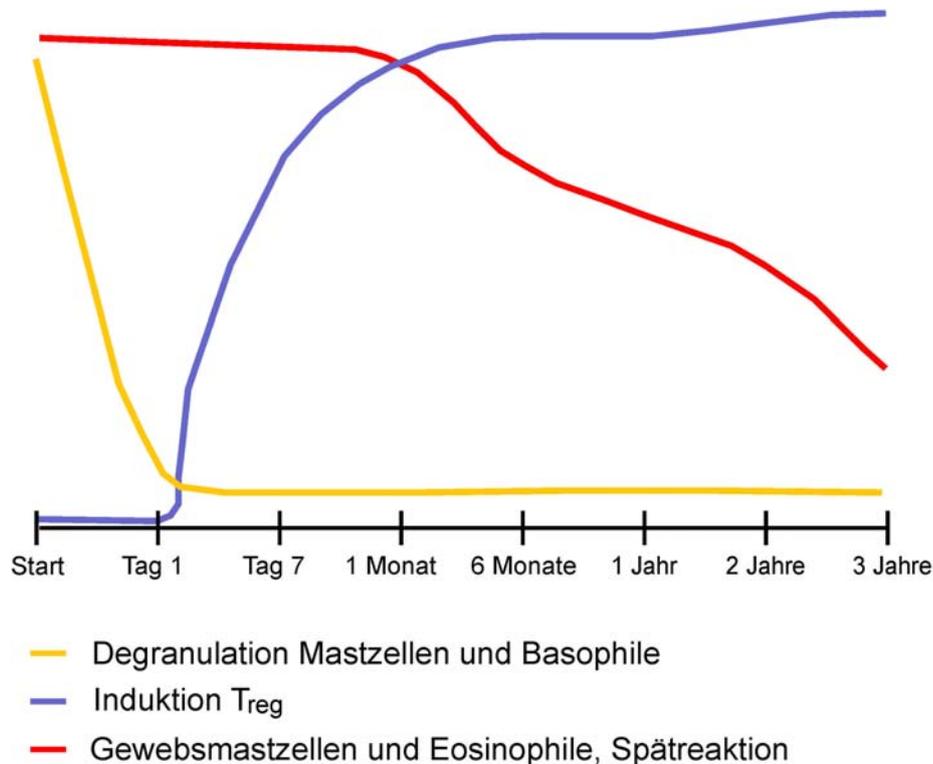
#### **2.4.1 Therapieansätze mit regulatorischen T Zellen**

Auch wenn die Symptome von allergischen Erkrankungen und Asthma häufig effektiv pharmakologisch unterdrückt werden können, zum Beispiel mit Corticosteroiden, Beta-Mimetika, Leukotrien-Rezeptor Antagonisten, Antihistaminika oder anderen Immunsuppressiva, so stellen diese Therapieoptionen keine kurative Lösung dar und bedeuten für den Patienten meist eine lebenslange Einnahme der Medikamente (86).

Wenn man die Schutzmechanismen gesunder Individuen betrachtet, so deutet vieles darauf hin, dass  $T_{reg}$  Zellen eine zentrale Rolle bei der Vermeidung allergischer Erkrankungen einnehmen (186). Es stellt sich die Frage, ob das Fehlen oder die Fehlfunktion von  $T_{reg}$  Zellen der Grund für allergische Erkrankungen und Asthma ist. Eine Erklärung für das Ansprechen von Atopikern auf eine spezifische Immuntherapie (SIT) wäre die Induktion von  $T_{reg}$  Zellen (9).

Die SIT stellt derzeit die einzige bekannte Behandlung allergischer Erkrankungen mit kurativem Ansatz dar. Bei Erfolg bewirkt sie eine lang anhaltende bis lebenslange Immuntoleranz gegenüber Allergenen und kann präventiv vor dem Voranschreiten einer allergischen Erkrankung schützen (48, 135). Auch wenn sie schon seit fast einem Jahrhundert angewandt wird, werden die Mechanismen der Allergen-SIT bisher nicht vollkommen verstanden. Die Rolle der  $T_{reg}$  Zellen bei der Wiederherstellung einer normalen Immunität gegenüber Allergenen wird zunehmend akzeptiert (10) (Abb. 9).

# Spezifische Immuntherapie



**Abb. 9: Effekte der allergen-spezifischen Immuntherapie**

Die Allergen-SIT reduziert die Symptome einer Allergie und den Verbrauch von Medikamenten, erhöht die Lebensqualität und wirkt präventiv gegen ein Weiterschreiten einer bestehenden Allergie und beschützt ebenso vor neuen Sensibilisierungen gegenüber anderen Allergenen. Die Zahl der T<sub>reg</sub> Zellen ist erhöht. Die Degranulation sowie die Zahl von Mastzellen und basophilen Granulozyten wird reduziert, ebenso wie die Zahl eosinophiler Granulozyten und Gewebsmastzellen im Bereich der Allergenexposition. Die Zahl von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2 Zellen wird durch eine allergen-spezifische Immuntherapie reduziert. IgE nimmt ab und es kommt zu einem Immunglobulin-Klassenwechsel Richtung IgA, IgG1 und IgG4. (modifiziert nach Akdis M. Akdis C. J.Allergy Clin.Immunol. 2007).

T<sub>reg</sub> Zellen sind in der Lage T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2 Zellen zu inhibieren und nehmen so eine Schlüsselfunktion bei der Allergen-SIT ein. Über die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  bewirken adaptive T<sub>R</sub>1 Zellen und natürliche CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen bei allergenspezifischen B Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgE zu IgG4, IgG1 und IgA. Darüber hinaus wird die Ausschüttung von Zytokinen zur Induktion von Mastzellen, basophilen- und eosinophilen Granulozyten, die eine allergische Inflammation maßgeblich unterstützen, inhibiert (8, 11, 201).

Die subcutane Immuntherapie (SCIT) benötigt bis zu 100 Injektionen, um eine Hyposensibilisierung erfolgreich abzuschließen. Dies ist ein entscheidender Nachteil, besonders bei der Behandlung von Kindern. Die sublinguale Immuntherapie (SLIT) wird daher zunehmend akzeptiert, auch wenn eine sehr viel höhere Dosis an Allergenen benötigt wird, um einen Erfolg zu erreichen. Bei beiden Applikationsformen, ob subcutan oder über die orale Schleimhaut, können die verwendeten Lösungen toxische oder nicht-allergische Proteine enthalten, wodurch es zu Nebenwirkungen kommen kann, in seltenen Fällen bis zu einer Anaphylaxie (216). Daher ist eine Modifizierung der Allergen-SIT durchaus erwünscht, um die Therapie effizienter und sicherer zu gestalten. Für dieses Ziel ist das Verständnis der Funktionsweise der  $T_{reg}$  Zellen von essentieller Bedeutung.

## 2.5 Hypothesen

Allergische Erkrankungen wie das Asthma bronchiale stellen ein weit verbreitetes Gesundheitsproblem dar, dem bis heute kein kuratives Behandlungskonzept gegenübersteht. Eine Möglichkeit protektive Immunität zu induzieren erhofft man sich aus dem Verständnis der Funktionsmechanismen regulatorischer T Zellen.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass natürlich vorkommende  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  Zellen ihre regulatorischen Funktionen *in vitro* durch direkten Zellkontakt ausbilden. *In vivo* scheint der Einfluss der immunsuppressiven Zytokine zu überwiegen.

Die erste Hypothese dieser Arbeit lautet: **Der inhibitorische Effekt von regulatorischen T Zellen auf naive  $CD4^+$  T Zellen beruht *in vitro* auf einem direkten Zellkontakt.**

Da das gut erforschte murine Immunsystem dem des Menschen sehr ähnlich ist, wurde für die Durchführung dieser experimentellen Studien ein Mausmodell gewählt, um die systematische Entwicklung  $T_H1$ -ähnlicher regulatorischer Zellen zu analysieren. Die Etablierung dieses murinen Modellsystems war aus der Arbeitsgruppe von D. T. Umetsu bekannt und wurde für die Bearbeitung der Fragestellungen übernommen.

Neben der Funktionsweise regulatorischer T Zellen ist die Induktion dieser Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt. Manche Forschungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Induktion regulatorischer T Zellen durch die Anwesenheit immunsuppressiver Substanzen gehemmt wird. Dies würde bedeuten, dass Immunsuppressiva die körpereigenen Schutzmechanismen unterdrücken und so der Langzeitverlauf allergischer Erkrankungen und Asthma negativ beeinflusst wird. Gegenwärtig stellen Corticosteroide und andere immunmodulatorische

Substanzen jedoch die einzige sichere Therapie schwerer allergischer und asthmatischer Erkrankungen dar.

Die zweite Arbeitshypothese lautet: **Immunmodulatorische Substanzen hemmen die Induktion regulatorischer T Zellen und somit die Toleranzentwicklung.**

Um neue und kurative Behandlungsmöglichkeiten im Bereich von allergischen Erkrankungen und Asthma entwickeln zu können, müssen wir auch im humanen Immunsystem Zusammenhänge verstehen und weiter erforschen. Ein Ansatz besteht in der Aktivierung regulatorischer T Zellen über Adjuvantien wie die hitzeinaktivierten Listerien (HKL = Heat-Killed-Listeria), die sich im murinen Modell als erfolgreich erweisen.

Die dritte Hypothese lautet: **Humane Immunzellen von allergischen Patienten reagieren auf HKL *in vitro* ähnlich wie Zellen des murinen Immunsystems.**

### **Ziel I: Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen**

- a) Zellkontakt
- b) Zytokine

### **Ziel II: Pharmakologischer Einfluss auf regulatorische T Zellen**

- a) Prednisolon und Methylprednisolon
- b) Tacrolimus und Cyclosporin A

### **Ziel III: Analyse regulatorischer T Zellen des Menschen**

- a) Beeinflussung der humanen Immunantwort durch HKL

### 3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tiere

BALB/c Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
BALB/c Mäuse	Harlan Winkelmann, Borchon, D
DO11.10 Mäuse	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, D

Die sechs bis zwölf Wochen alten weiblichen Tiere wurden (in Gruppen von drei bis acht Mäusen pro Käfig) in einem Individually Ventilated Cages (IVC)-System gehalten. Die Versuche mit Tieren wurden alle gemäß des Tierschutzgesetzes durchgeführt und nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin vorab genehmigt.

#### 3.2 Material

##### 3.2.1 Chemikalien

Aluminiumhydroxid Al(OH) <sub>3</sub> , Inject Alum	Pierce, Rockford, IL, USA
Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Antikörper (markiert):	
CD11c, Indodicarbocyanin (Cy5)	Robert Koch Institut (RKI)
CD8a, Phycorythrin (PE)	RKI
CD4, Peridinin-chlorophyll- protein complex PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD3, Fluoreszein- Isothiocyanat(FITC)Becton	Dickinson, Heidelberg, D
CD86, (PE)	RKI
MHC II, (FITC)	RKI
KJ 1.26, biotinyliert	RKI
Streptavidin, (APC)	RKI
CD4, (PE)	RKI
OVA-T Zell Rezeptor- bio KJ-1.26	RKI

autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
autoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
BD OptEIA Set Mouse IL-4	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Mouse IL-10	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Mouse INF- $\gamma$	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Human TGF- $\beta$ 1	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Mouse IL-2	Becton Dickinson, Heidelberg, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (no touch)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD8 <sup>+</sup> Dendritic Cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CellTrace CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Paisley, UK
Collagenase Typ IV	Worthington, Lakewood, NJ, USA
Cyclosporin A	Sigma, St. Louis, MO, USA
Deoxyribonuclease (DNase)I Typ IV 15KU	Sigma, Steinheim, D
Dexamethason	Sigame, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
Di-Natriumphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Braun, Melsungen, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Braun, Melsungen, D
Fetales Kälberserum (FKS) (10 %)	GIBCO, Eggenstein, D
Ficoll-Paque	GE Healthcare, Feiburg, D
Forene	Abbott, Wiesbaden, D
Freund's Adjuvant Incomplete (IFA)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF), rekombinant murin	Cell Concepts, Umkirch, D
Heat Killed Listeria monocytogenes (HKL)	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Isotypen:	
Rat ID10-Cy5	RKI
Rat IgG2 <sub>ak</sub> -PE	RKI
Mu IgG2 <sub>ak</sub> -PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Mu IgG2 <sub>ak</sub> -FITC	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Rat IgG2 <sub>ak</sub> -PE	RKI
Rat IgG2 <sub>ak</sub> -FITC	RKI
Ketanest [50 mg/ml] (Ketaminhydrochlorid)	DeltaSelect, Dreieich, D

L-Glutamin [2mM]	PAA Laboratories, Linz, A
Lieschgras	Alk-Scherax, Wedel, D
Medium (RPMI 1640)	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Methylprednisolon	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Braun, Melsungen, D
Natriumchlorid NaCl (0,9%ige, wässrige Lösung)	Braun, Melsungen, D
Natriumhydrogencarbonat NaHCO <sub>3</sub>	Braun, Melsungen, D
Natriumhydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Braun, Melsungen, D
Ovalbumin (OVA VI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicillin [100 U/ml]	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Phosphate Buffered Saline (PBS)-Dulbecco (1x)	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Prednisolon	Sigma, St. Louis, MO, USA
Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen, D
Schwefelsäure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2M)	Merck, Darmstadt, D
Streptomycin [100 mg/ml]	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Inst., Fullerton, USA
Tacrolimus	astellas, München, D
<sup>3</sup> [H]-Thymidin	Amersham Buchler, Braunschweig., D
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Türksche Lösung	Sigma, Steinheim, D
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D
2-Propanol (70%ig in Aqua dest.)	Merck, Darmstadt, D

Beschichtungspuffer:

0,1M Natrium-Carbonat-Puffer; pH 9,5:

2,10 g NaHCO<sub>3</sub>

0,89 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

250 ml Aqua dest.

0,2M Natrium-Phosphat-Puffer; pH 6,5:

2,95 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4,03 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

250 ml Aqua dest.

Blockpuffer; pH 7,0:

450 ml PBS-Dulbecco (1x)

50 ml FKS(10 %)

Kulturmedium:

Medium (RPMI 1640)

L-Glutamin [2mM]

Streptomycin [100 mg/ml]

Penicillin [100 U/ml]

$\beta$ -Mercaptoethanol

FKS (10 %)

Waschpuffer für den **Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**:

50 ml PBS-Dulbecco (1x)

0,5 ml Tween 20 (0,005 %)

950 ml Aqua dest.

Waschpuffer für den **Magnetic Activated Cell Sorter (MACS)**:

500 ml PBS-Dulbecco (1x)

2,5 ml FKS (0,5%)

0,292 g EDTA (2mM)

### 3.2.2. Geräte

autoMACS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
autoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Blutentnahme-Röhre	Krankenhaus Zehlendorf, Berlin, D
Brutschrank, Heraeus	Heraeus, Hanau, D
Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Krefeld, D
Durchlichtmikroskop, Primo Star	Carl Zeiss, Jena, D
ELx405 Microplate Washer	BioTek, Bad Friedrichshall, D
Filterplättchen	Filter Dunn Labortechnik, Asbach, D
Flachbodenplatte (96 Well), Immune Maxisorp	Nunc, Roskilde, DK
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Offenburg, D
Injekt-F-Einmalspritze (1 ml)	Braun, Melsungen, D

Inverses Lichtmikroskop	Hundt, Wetzlar, D
Kanülen, Microlance	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kolbenhubpipette (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Konische Reagenzgläser (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Liquid-Szintillationsmessgerät (Wallac 1409)	Wallac, Turku, F
Mehrkanalpipette (10 µl, 100 µl, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, D
Pari-Boy®	Pari-Werke, Starnberg, D
Petrischalen (ø 35 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Petrischalen (ø 100 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Pipetten (5 ml und 10 ml)	Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, D
PP-Rundboden Röhrchen 1,3 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Präparationsbesteck	J. Schmid Laborbedarf, Berlin, D
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Rotlichtlampe	Osram, München, D
Rundbodenröhrchen (5 ml), Polysterol	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Skalpell, No. 21	Feather, Osaka, J
Spritzen (1 ml), Plastikpak	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Spritze (5 ml)	Braun, Melsungen, D
Sterilbank, Herasafe	Heraeus, Hanau, D
Szintillationsröhrchen (5 ml)	Packard Instruments, Groningen, D
Transfer-Pipette	Sarstedt, Nürnberg, D
Top-Mix	Fischer Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, F
Zellharvester	Titertek, Lier, N
Zellkultur-Einsatz, Porengröße 0.4 µm	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zellkulturplatte (24 Well), Flachboden	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zellkulturplatte (96 Well), Rundboden	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zellsieb 70 µm, Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, D
4-Wegehahn, blau 360°	Smith, Kirchenseen, D

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Etablierung von HKL als Immunadjuvans

##### 3.3.1.1 Immunisierung mit dem Immunadjuvans HKL

Zur Etablierung von HKL als Immunadjuvans wurden BALB/c Mäuse (Harlan Winkelmann) intradermal (i.d.) in Ohren beziehungsweise (bzw.) Fußsohlen am Tag 0 immunisiert. Die Injektionslösung bestand für die Verumgruppe aus 200 µg OVA , 200 µl PBS und 100 µl IFA (pro Maus: 200 µl) und für die Positivkontrolle aus 200 µg OVA, 100 µl HKL ( $4 \times 10^8$  Organismen) und 100 µl IFA (pro Maus: 200 µl). Die drei Substanzen wurden jeweils in einem 5 ml Rundbodenröhrchen mit einer 1 ml-InjektF-Einmalspritze und einer 0,9 mm x 40 mm Kanüle gemischt. Zur Injektion wurde dieselbe 1 ml-Injekt-F-Einmalspritze verwendet mit einer 0,9 mm x 25 mm Kanüle. Die i.d.-Applikation erfolgte in allgemeiner Anästhesie mit Ketanest/Rompun (1 Ampulle 10 ml Ketanest gemischt mit 1,66 ml Rompun und anschließend mit NaCl 0,9% 1:4 verdünnt) intraperitoneal (i.p.).

##### 3.3.1.2 Isolierung der Zellen und Restimulation *in vitro*

Die Analyse der Tiere fand am Tag 7 statt. Die immunisierten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die drainierenden Lymphknoten entnommen. Bei der i.d.-Gabe in die Ohren wurden die zervikalen Lymphknoten entnommen, bei der i.d.-Gabe in die Fußsohlen entsprechend die poplitealen und inguinalen.

Die Lymphknoten jedes Tieres wurden separat aufgearbeitet. In einem Zellsieb in einer Petrischale wurden alle Lymphknoten eines Tieres mit Hilfe des Spitzenstempels einer 1 ml-Spritze vorsichtig durchgerieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde in Medium mit 2 % FKS in ein 15 ml Reagenzglas aufgenommen und für 10 Minuten (min) bei 4 Grad Celsius (°C) und 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in Medium mit 2 % FKS gelöst. Nach 10 min Ruhen im Kühlschrank wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 15 ml Reagenzglas überführt und die Zellzahl mit Türkscher Lösung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

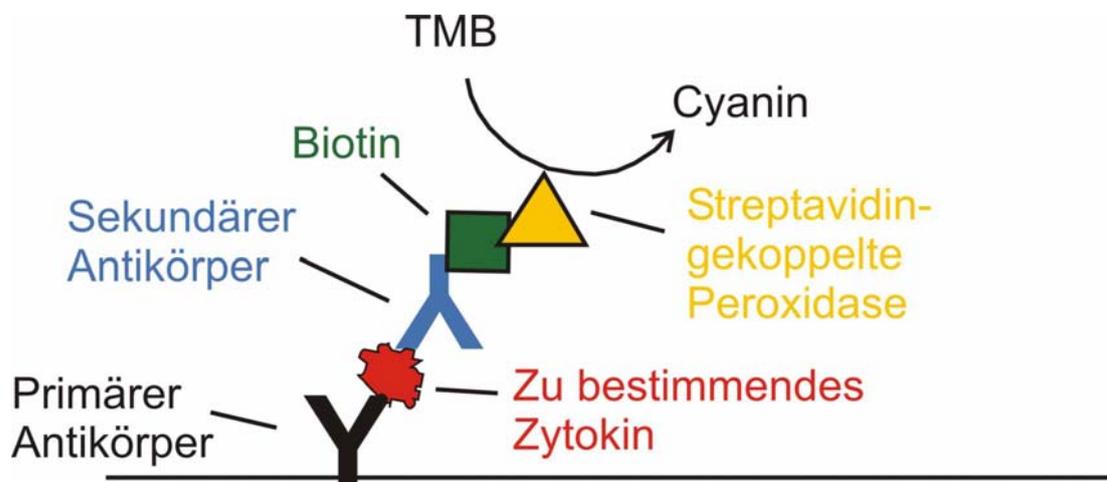
Für die Restimulation wurde eine 96 Well-Zellkulturplatte verwendet und pro Well  $5 \times 10^5$  Zelle für die Analyse der sekretorischen Zytokine eingesetzt und  $2,5 \times 10^5$  Zellen für das Messen der Proliferation. Das Kulturmedium wurde mit OVA VI zur Restimulierung der Zellen versetzt, in

den Konzentrationen: 0; 31,25; 62,5; 125; 250 und 500  $\mu\text{g/ml}$ . Das Endvolumen betrug 200  $\mu\text{l/Well}$ . Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5%  $\text{CO}_2$ .

### 3.3.1.3 Analyse der Zytokinüberstände mittels ELISA

Für die Analyse der sekretorischen Zytokine wurden die Überstände der 96 Well-Zellkulturplatten für IFN- $\gamma$  nach 48 Stunden und für die Zytokine IL-4 und IL-10 nach 96 Stunden abgenommen.

Die Messung der Zytokine IL-4 IL-10 und IFN- $\gamma$  aus Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA, mit den entsprechenden OptEIA Sets von BD. Es handelte sich hierbei um einen Sandwich ELISA (Abb. 10)



**Abb. 10: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA**

Der primäre Antikörper, mit dem der Boden der Zellekulturplatte beschichtet ist, bindet das zu untersuchende Zytokin. Der sekundäre Antikörper ist an Biotin gekoppelt und bindet ebenfalls an das zu bestimmende Zytokin. Daher der Name Sandwich ELISA. Die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase heftet sich an das Biotin und setzt TMB in Cyanin um. Über die Messung der Extinktion des entstandenen Farbstoffes kann die Konzentration des Zytokins bestimmt werden.

Der jeweilige primäre Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin wurde in Beschichtungspuffer gelöst und eine 96 Well-Flachbodenplatte damit beschichtet (50 µl/Well). Die Inkubation erfolgte bei +4°C über Nacht. Nach Eliminierung des überschüssigen Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen mittels Blockpuffer (200 µl/Well) über eine Stunde bei Raumtemperatur gesättigt. Nach fünfmaligem Waschen wurde die zu bestimmende Probe und der Standard, der das zu messende Zytokin in definierten Konzentrationen enthält, aufgetragen (50 µl/Well in den Verdünnungen 1:2 und 1:20, Dreifachbestimmung). Als Leerwerte wurde Waschpuffer auf die Platte gegeben (Zehnfachbestimmung). Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die nicht gebundene Probe durch fünfmaliges Waschen der Platte entfernt, der sekundäre biotinylierte Antikörper aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser biotinylierte Antikörper bindet spezifisch an das bereits an den primären Antikörper gebundene Zytokin. An den Biotinanteil dieses sekundären Antikörpers bindet die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase. Es setzt das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) über eine Redoxreaktion in ein Cyanin um. Als Oxidationsmittel wirkt Wasserstoffperoxid. Das entstandene Cyanin bewirkt einen Farbumschlag nach blau. Das TMB wird nach achtmaligem Waschen auf die Platte gegeben. Die Reaktion wird nach 30 min durch Senkung des pH-Wertes mittels Schwefelsäure gestoppt, wobei es erneut zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kommt. Die Extinktion wurde photometrisch mit dem FLUOstar OPTIMA (Testfilter: 450 nm, Referenzfilter: 570 nm) gemessen und durch Vergleich der Standardkurve die Konzentration des zu bestimmenden Zytokins berechnet. Hierbei wurde eine 4-Punkt-Kurve in einem doppelt logarithmischen Diagramm erstellt.

#### **3.3.1.4 Proliferationsassay**

Nach der Restimulation mit OVA werden die Zellen mit dem  $\beta$ -Strahler  $^3\text{[H]}$ -Thymidin markiert und für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert (37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 25 µl/Well, 18.5 kBq/Well in PBS). Das  $^3\text{[H]}$ -Thymidin wird während der Zellteilung als Nukleosidanalogen in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) proliferierender Zellen eingebaut. Seine Inkorporation kann mit Hilfe eines Szintillations-Messgerätes gemessen werden. Die Zellen wurden mit dem Zellharvester geerntet, indem der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen jeweils einer Bodenvertiefung auf ein Filterpapierplättchen überführt wurden (Dreifachbestimmung). Diese Plättchen wurden in je einem Szintillationsröhrchen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit aufgelöst und die Radioaktivität darin mit einem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät bestimmt. Die

Inkorporationsrate des  $^3\text{[H]}$ -Thymidins wird als Stimulationsindex (SI) angegeben, der sich wie folgt berechnet:

**SI** = Aktivität der Zellen nach Stimulation [cpm] / Aktivität der Zellen ohne Stimulation [cpm].

### **3.3.2 Generierung und Analyse der Funktionsweise von regulatorischen T Zellen**

#### **3.3.2.1 Immunisierung**

Die Immunisierung erfolgte wie unter 3.3.1.1 beschrieben in BALB/c Mäuse von Chales River, mit dem Unterschied der Applikationsform (i.p anstatt i.d).

#### **3.3.2.2 Isolation von $\text{CD8}\alpha^+$ dendritischen Zellen mittels MACS**

Am Tag 5 wurden die BALB/c Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milz für die Isolation der  $\text{CD8}\alpha^+$ DCs, die mit OVA oder OVA und HKL stimuliert worden waren, entnommen.

Die Milzen wurden in einer Petrischale zerkleinert, mit Medium, DNaseI (1 mg in 1 ml NaCl 0,9 % gelöst) und Collagenase (1,6 mg in 1 ml NaCl 0,9 % gelöst) für den Verdau versetzt und anschließend für zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Alle 30 min wurden die Milzfragmente mit einer 5 ml Pipette durch Aufnahme und Abgabe bewegt. Die entstandene Zellsuspension mit den verbliebenen Milzfragmenten wurde durch ein Zellsieb gegeben und vorsichtig mit der Stempelrückseite durchgedrückt. Die Collagenaseaktivität wurde durch Zugabe von 20% FKS gestoppt. Anschließend wurden die Suspensionen zweimal durch Zentrifugieren gewaschen (1200 U/min, 10 min, 4°C), mit Türkscher Lösung angefärbt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zellisolation erfolgte gemäß der Beschreibung des  $\text{CD8}^+$  Dendritic Cell Isolation Kit mouse mit der MACS Technologie. Hierbei werden superparamagnetische Partikel (circa 50 nm) an monoklonale Antikörper gekoppelt, die an die entsprechenden Zielzellen binden. Diese Zellen werden über eine Säule gegeben, die sich in einem permanenten magnetischen Feld befindet. Die an die magnetischen Partikel gebundenen Zellen werden auf der Säule zurückgehalten und können durch das Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld von dieser gewaschen werden (133).

Die Milzzellen dieses Experiments wurden mit dem Biotin-Antibody-Cocktail (Anti-Maus-Antikörper gegen: CD90, CD45R und CD45b) 10 min auf Eis inkubiert und anschließend Anti-Biotin MicroBeads (15 min auf Eis) hinzugefügt. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in den autoMACS Pro Separator gegeben und mit dem Programm Depl025 die indirekt gefärbten Zellen (T, B, und NK Zellen) depletiert. Die restlichen Zellen wurden gewaschen, mit den CD8a (Ly-2) MicroBeads (gegen  $CD8\alpha^+$  DCs) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend, nach wiederholtem Waschen, in den autoMACS Pro Separator gegeben und mit dem Programm Posseld2 positiv selektioniert.

### **3.3.2.3 Reinheitskontrolle der $CD8\alpha^+$ dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Die Reinheit der isolierten Zellen lässt sich mittels Durchflusszytometrie quantifizieren. Mit Hilfe des Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) können Größe (Vorwärts-Scatter) und Granularität (Seitwärts-Scatter) von Zellen ermittelt werden. Durch Markierung von Oberflächenantigenen mit fluoreszierenden Farbstoffen lassen sich Zellen im FACS sortieren und damit weiter spezifizieren.

Von der Probe wurden in jedes 5 ml Rundbodenröhrchen  $3 \times 10^5$  Zellen gegeben und durch Zentrifugieren mit PBS gewaschen. Nach der Inkubation von 10 min mit dem Fc-Block wurde mit den vier Antikörpern ( $CD11c \rightarrow Cy5$ ,  $CD8a \rightarrow PE$ ,  $CD4 \rightarrow PerCP$   $CD3 \rightarrow FITC$ ) gefärbt. Die Isotypen (Rat ID10-Cy5, Rat  $IgG2_{ak}-PE$ , Mu  $IgG2_{ak}-PerCP$ , Mu  $IgG2_{ak}-FITC$ ) dienen der Kontrolle der unspezifischen Bindungen. Nach 45 min Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurde erneut mit PBS gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Durch die Auswahl einer bestimmten Zellpopulation z.B. im Vorwärts-Seitwärts-Scatter können diese Zellen genauer betrachtet werden. Man nennt diesen Vorgang „Gaten“. In diesem Fall wurde ein Gate auf die dendritischen Zellen gelegt und diese anhand der fluoreszierenden Farbstoffe, mit denen die Zellen markiert wurden, weiter untersucht und spezifiziert.

### **3.3.2.4 Isolation von DO11.10 OVA-TZR-transgenen $CD4^+CD25^-$ T Zellen**

Nach Töten der DO11.10 TZR-transgenen Mäuse durch zervikale Dislokation wurden die Milzen der Tiere entnommen und die Zellen, wie unter 3.3.1.2. beschrieben, aufgearbeitet.

Nach der Ermittlung der Zellzahl wurde entsprechend der Angaben des CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kits gearbeitet. Hierbei werden CD4<sup>+</sup> T Zellen in einem „no-touch“-Verfahren isoliert, indem mit biotinylierten Antikörpern gegen CD8a (Ly-2), CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac1) und Ter 115 diese Zellen mit Hilfe von Anti-Biotin MicroBeads depletiert werden (autoMACS Pro Separator; Programm: Deplete).

### **3.3.2.5 Intravenöser Adoptivtransfer von DO11.10 T Zellen und CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DCs**

Für den adoptiven Transfer beider Zellpopulationen wurden BALB/c Mäuse von Charles River mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine Weitstellung der Venen zu erreichen. Nach Fixierung der Tiere in einer Blutentnahme-Röhre wurden pro Maus  $1 \times 10^6$  CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs und  $5 \times 10^6$  DO11.10 T Zellen in 500  $\mu$ l NaCl 0,9% intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene injiziert.

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

Eine BALB/c-Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und beide Oberschenkelknochen mit Rücksicht auf die Unversehrtheit der Knochenmarkshöhlen entfernt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochenmarkshöhlen eröffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (0,55 mm x 25 mm) ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde in Kulturmedium aufgenommen, durch Zentrifugation und Abnahme der Überstände gewaschen und anschließend auf fünf Petrischalen ( $\varnothing$  100 mm) aufgeteilt (10 ml/Petrischale). Zur Ausdifferenzierung der DCs wurde der hämatopoetische Wachstumsfaktor GM-CSF hinzugegeben (10 ng/ml). Nach sieben Tagen Kultur im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) waren die dendritischen Zellen des Knochenmarks zu verwenden.

### **3.3.2.7 Reinheitsbestimmung der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark mittels Durchflusszytometrie**

Entsprechend der Beschreibung unter 3.3.2.3 mit folgenden Antikörpern und Isotypen:

Antikörper:

CD11c, Cy5

CD86, PE

MHC II, FITC

Isotypen:

Rat ID10-Cy5

Rat IgG2<sub>ak</sub>-PE

Rat IgG2<sub>ak</sub>-FITC

### **3.3.2.8 Isolation der adoptiv transferierten DO11.10 T Zellen und Aufnahme in die Co-Kultur mit DCs und naiven DO11.10 T Zellen**

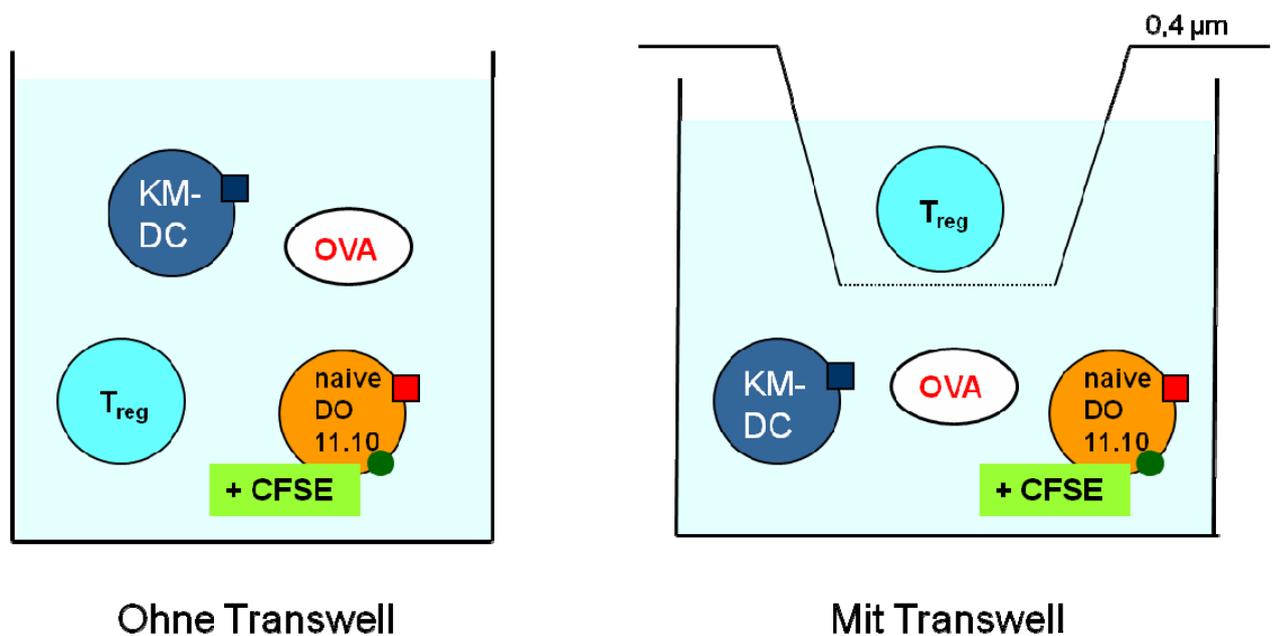
Die beiden Zellpopulationen (adoptiv transferierte T Zellen und naive DO11.10 T Zellen) wurden parallel isoliert. Zur Isolierung beider Populationen wurde die Milz der Tiere verwendet. Die naiven DO11.10 T Zellen wurden wie in Punkt 3.3.2.4 isoliert und anschließend mit CFSE laut den Angaben des Herstellers gefärbt. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der bei jeder Zellproliferation zu 50% an die Tochterzellen weitergegeben wird und somit eine genaue Beobachtung der Proliferation der naiven DO11.10 T Zellen mittels FACS erlaubt (123). Die nicht fluoreszierende Vorstufe von CFSE ist aufgrund von zwei Acetat-Seitenketten sehr gut membrangängig und diffundiert leicht in die Zelle. In der Zelle werden die Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten, die Lipophilie und damit auch die Membrangängigkeit nehmen ab und das CFSE kann erschwert die Zelle verlassen. CFSE wird kovalent an freie Aminogruppen intrazellulärer Proteine gebunden und verliert damit weiter die Tendenz aus der Zelle zu diffundieren. Insgesamt stellt es damit einen geeigneten Farbstoff zur Proliferationsanalyse dar (154).

Die adoptiv transferierten DO11.10 T Zellen wurden wie unter 3.3.1.2 angegeben isoliert und anschließend mit Hilfe der MACS-Methode weiter aufgereinigt. Hierfür wurden die Zellen mit einem biotinylierten Antikörper gegen das Oberflächenantigen KJ 1.26 markiert und nach der

Bindung der Anti-Biotin MicroBeads an diesen Antikörper die Zellen positiv selektiert (autoMACS Pro Separator; Programm: Posseld2).

Für die Bestimmung der Proliferation der T Effektorzellen wurden naive, CFSE gefärbte DO.11.10 T Zellen und vorkultivierte dendritische Zellen aus dem Knochenmark beide in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  vorgelegt. Die adoptiv transferierten DO11.10 T Zellen ( $T_{reg}$  Zellen) wurden in den Verhältnissen 8:1; 4:1; 2:1 und 1:1 (naive DO11.10 T Zellen: adoptiv transferierter DO.11.10 T Zellen) zu den naiven DO11.10 T Zellen eingesetzt, was einer Zellzahl von  $0,5 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$  entspricht. Dem Kulturmedium wurden 250  $\mu\text{g/ml}$  OVA zugesetzt (insgesamt 2300  $\mu\text{l/Well}$ ).

Um den Einfluss des direkten Zellkontakts der adoptiv transferierten DO11.10 T Zellen ( $T_{reg}$  Zellen) auf die naiven DO11.10 T Zellen (T Effektorzellen) zu untersuchen, wurden die Ansätze einmal mit und einmal ohne Zellkultur-Einsätze (Transwell) angesetzt. Die Porengröße der eingesetzten Transwell betrug 0,4  $\mu\text{m}$  (Abb. 11).



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Ansätze mit und ohne Transwell**

Der Ansatz ohne Transwell erlaubt den  $T_{reg}$  Zellen in direkten Kontakt mit den DCs und den naiven T Effektorzellen zu treten. Bei dem Einsatz von Transwell werden die  $T_{reg}$  Zellen von den anderen beiden Zellpopulationen getrennt und die Kommunikation zwischen  $T_{reg}$  Zellen mit DCs und naiven T Effektorzellen kann nur noch über Zytokine stattfinden. Das OVA kann, wie die Zytokine, die Membran der Transwell überwinden. Die CFSE-Markierung dient der späteren Analyse der Proliferation.



### **3.3.2.10 Analyse der Zytokinüberstände mittels ELISA**

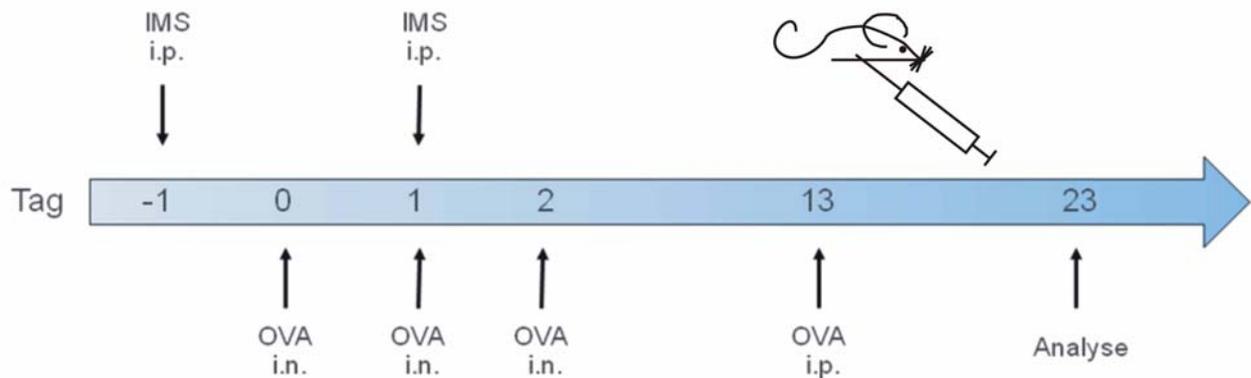
Durchführung entsprechend 3.3.1.3, mit folgenden OptEIA Sets:

BD OptEIA Set Mouse IL-10	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Mouse INF- $\gamma$	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Human TGF- $\beta$ 1	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD OptEIA Set Mouse IL-2	Becton Dickinson, Heidelberg, D

## **3.3.3 Einfluss immunmodulatorischer Substanzen auf die Entwicklung regulatorischer T Zellen**

### **3.3.3.1 Immunisierung**

Die Behandlung der Tiere begann am Tag -1 mit der intraperitonealen Gabe des Immunsuppressivums (Dexamethason, Prednisolon, Methylprednisolon, Tacrolimus und Cyclosporin A) (Abb. 13). Hierbei wurden die einzelnen immunmodulatorischen Substanzen (IMS) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die beiden Corticosteroide Prednisolon und Methylprednisolon wurden in den Konzentrationen: 1000  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ; 500  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  pro Maus in PBS gelöst. Cyclosporin A wurde in den gleichen Konzentrationen gelöst, jedoch nicht in PBS, sondern in DMSO und NaCl 0,9 %. Tacrolimus wurde in NaCl 0,9 % gelöst in den Konzentrationen: 500  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ; 50  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ . Dexamethason wurde wie die beiden anderen Corticosteroide in PBS gelöst und in der Konzentration 100  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  intraperitoneal verabreicht.



**Abb. 13: Behandlungsprotokoll zur Induktion einer respiratorischen Toleranz und der Intervention durch die systemische Gabe von Immunsuppressiva**

Für die Induktion der Toleranz erhielten die Mäuse OVA intranasal (i.n.) an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0,1 und 2). Das zu untersuchende Immunsuppressivum (IMS) wurde systemisch vor und während der Toleranzinduktion i.p. verabreicht (Tag -1 und 1). Die systemische Sensibilisierung erfolgte am Tag 13 mit OVA / Alum intraperitoneal. Zur Analyse erfolgte am Tag 23 die Entnahme der Milzen und die Isolierung und Restimulation der Lymphozyten.

Am Tag 0, 1 und 2 wurden die Tiere intranasal mit OVA (100 µg OVA / 50 µl PBS pro Maus) immunisiert, um eine antigenspezifische Immuntoleranz zu induzieren. Die intranasale Applikation erfolgte in allgemeiner Anästhesie mit dem Narkosegas Isofluran (Forene). Die 50 µl wurden den Tieren vor die Nase pipettiert und die Mäuse atmeten die Flüssigkeitsmenge ein.

Am Tag 1 wurde parallel zu der intranasalen Applikation von OVA erneut das Immunsuppressivum intraperitoneal verabreicht.

Die systemische Sensibilisierung der Tiere erfolgte nach zehn Tagen (Tag 13). Hierzu wurden 50 µg OVA in 2 mg Alum (Adjuvans) in sterilem PBS gelöst und in einem Volumen von 200 µl/Maus intraperitoneal appliziert. Nach weiteren zehn Tagen (Tag 23) wurden die Milzen der Tiere zur Analyse entnommen.

Als Positivkontrolle wurden Tiere lediglich systemisch sensibilisiert (50 µg OVA in 2 mg Al(OH)<sub>3</sub> und sterilem PBS gelöst, 200 µl/Maus intraperitoneal). Die Tiere der Negativkontrolle blieben unbehandelt. Als Toleranzkontrolle bekamen die Mäuse neben der systemischen Sensibilisierung eine allergenspezifische Immuntoleranzinduktion durch dreimalige intranasale Applikation von OVA (100 µg OVA / 50 µl PBS pro Maus).

Eine weitere Kontrollgruppe stellten die Dexamethason-behandelten Tiere dar, bei denen das gleiche Protokoll wie bei den anderen Immunsuppressiva verwendet wurde. Eine Hemmung der Ausbildung einer Immuntoleranz bei dieser Behandlung war bereits bekannt (185).

### **3.3.3.2 Isolation, Restimulierung und Analyse**

Isolation und Restimulation der Milzzellen der behandelten Tiere erfolgte wie unter 3.3.1.2 beschrieben. Analyse der Zytokinüberstände mittels ELISA wurde wie unter Punkt 3.3.1.3 durchgeführt. Der Proliferationsassay erfolgte wie unter 3.3.1.4 angegeben.

### **3.3.4 Einfluss von HKL auf Immunzellen des Menschen**

#### **3.3.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen**

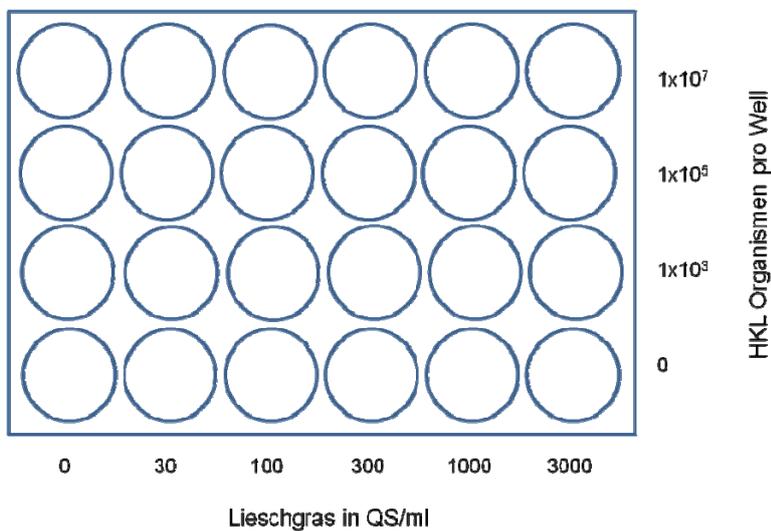
Periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) sind Immunzellen, die sich im peripheren Blut befinden. Sie bestehen aus Lymphozyten und Monozyten und leisten einen wesentlichen Beitrag zur Immunabwehr. PBMC werden mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (35).

Für die Versuche wurden heparinisierte Blutproben eines Allergikers (gegenüber Lieschgras-Pollen) und einer gesunden Kontrollperson (Non-Atopiker) verwendet. Beide Blutproben wurden wie folgt weiterbehandelt. Nach Verdünnung (1:2 mit dem Medium RPMI 1640) wurden 30 ml der Probe in einem 50 ml Reagenzglas auf 15 ml Ficoll-Medium überschichtet. Nach 15 min Zentrifugation bei 2100 U/min (ohne Bremse) und 25°C sammelten sich die PBMC entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase. Darüber befinden sich Plasma und Thrombozyten. Das Zellsediment bilden die Erythrozyten und Granulozyten, da sie eine höhere Dichte als die zu isolierenden Leukozyten und Monozyten besitzen. Letztere wurden vorsichtig abgenommen und die gewonnenen Zellen dreimal mit Medium gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen mit Thrombozyten zu entfernen. Der erste Waschgang wurde bei 1530 U/min bei 4°C für 15 min durchgeführt. Die folgenden fanden bei 940 U/min, gleicher Temperatur und gleicher Zeit statt.

Nach der Zellzählung mit Türk'scher Lösung in der Neubauer-Zählkammer wurden die PBMC mit CFSE nach Angaben des Herstellers gefärbt.

### 3.3.4.2 Vergleich der Proliferationsrate von PBMC von Atopiker versus Non Atopiker

Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen beider PBMC-Populationen wurden mit 2 ml Kulturmedium pro Well in 24 Well-Zellkulturplatten ausplattiert. Das FKS des Kulturmediums wurde durch autologes Serum ersetzt. Beiden Zellpopulationen wurden verschiedene Konzentrationen des Allergens Lieschgras zugesetzt. 0 Einheiten (SQ)/ml, 30 SQ/ml, 100 SQ/ml, 1000 SQ/ml und 3000 SQ/ml. Zusätzlich wurden nur bei den PBMC des Atopikers hitzeinaktivierte Listerien mitkultiviert. Jeweils ein Well für jede Lieschgras-Konzentration ohne HKL, mit  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^7$  Organismen pro Well (Abb. 14).



**Abb. 14: Induktion humaner regulatorischer T Zellen durch HKL eines Atopikers**

PBMCs eines Atopikers gegen Lieschgras wurden nach Isolation ausplattiert und mit steigenden Konzentrationen von Lieschgras versetzt (0, 30, 100, 300, 1000 und 3000 QS/ml). Zur Induktion menschlicher  $T_{reg}$  Zellen wurde HKL in drei Konzentrationen mitkultiviert ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^7$  Organismen pro Well).

Nach 84 Stunden Inkubation im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die CFSE gefärbten PBMC mittels Durchflusszytometrie analysiert.

## 4 ERGEBNISSE

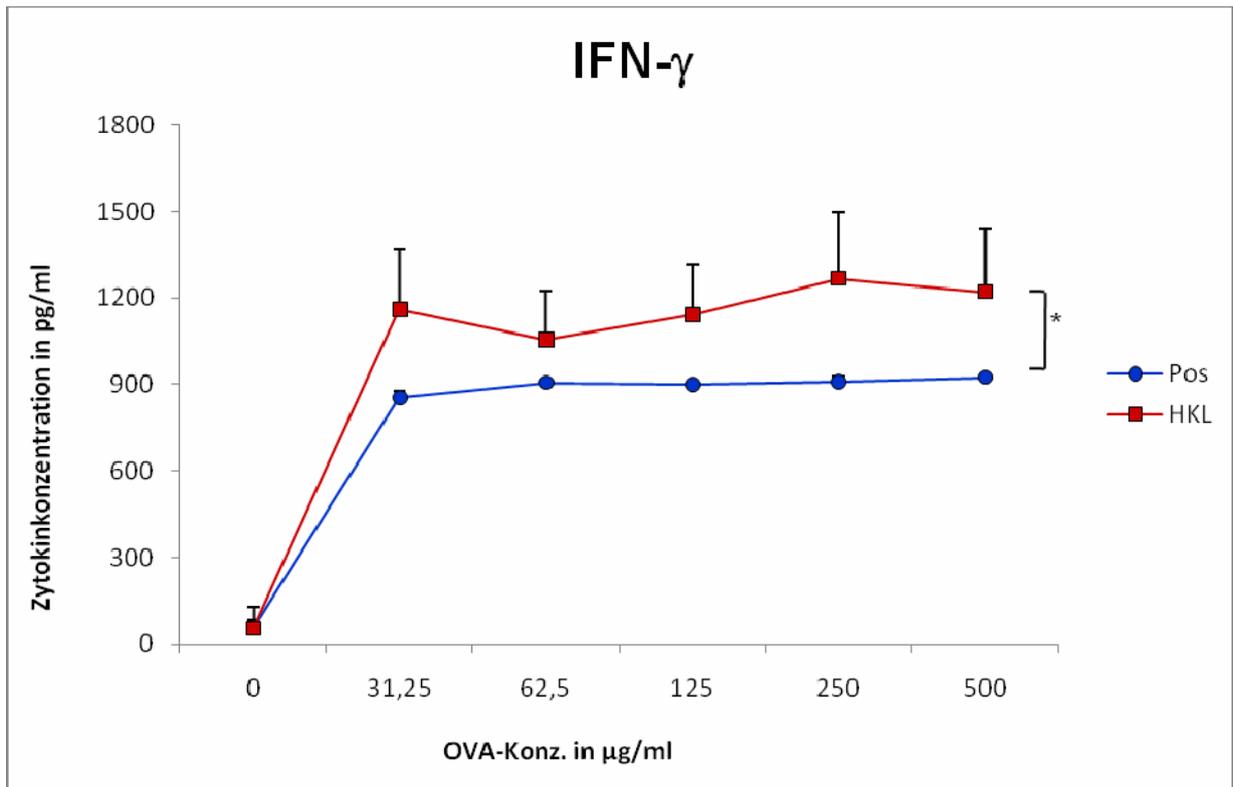
### 4.1 Einfluss von HKL auf die Immunantwort

#### 4.1.1 HKL als Adjuvans induziert eine T<sub>H</sub>1 gewichtete Immunantwort *in vivo*

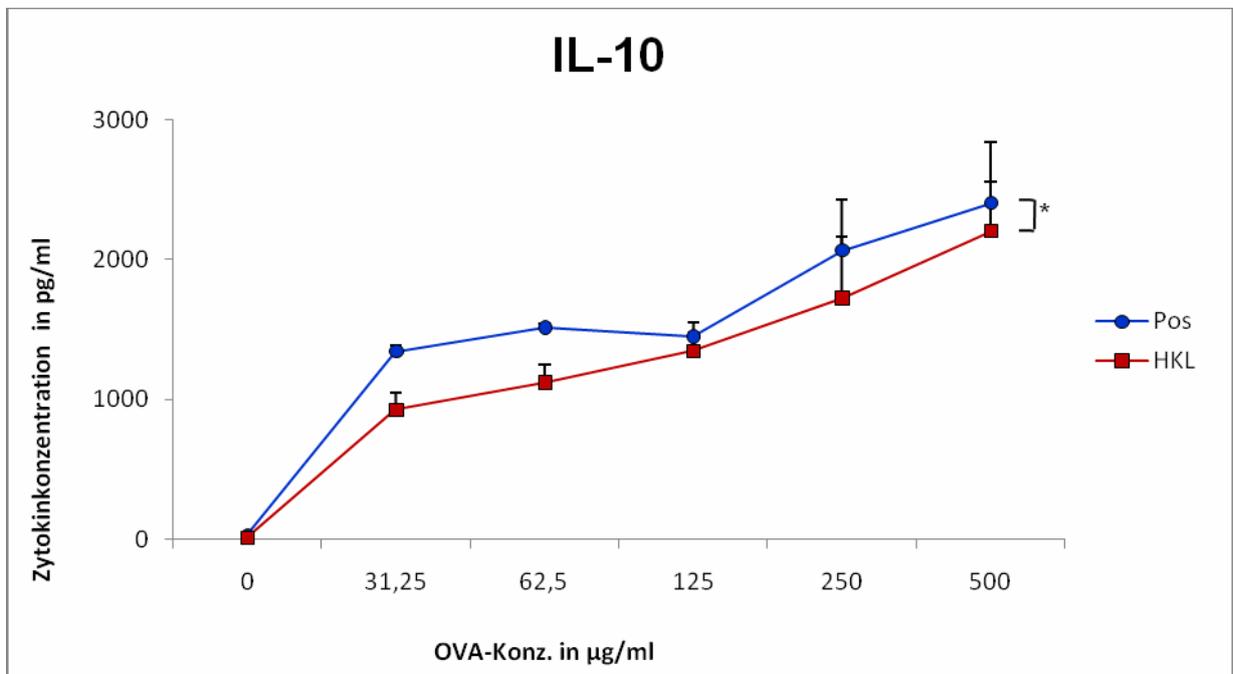
*Listeria monocytogenes* ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium, das Flagellen besitzt und zu den fakultativ intrazellulären Erregern zählt. HKL stimuliert das angeborene Immunsystem, was beispielsweise die Produktion von IL-12 erhöht. Die IFN- $\gamma$ -Synthese wird gesteigert und die Produktion von IL-4 in NK-Zellen und Effektor T Zellen inhibiert (90, 101, 132, 159, 194, 220).

In den ersten Experimenten sollte die Wirkung von hitzeinaktivierten Listerien auf das murine Immunsystem gezeigt werden. BALB/c Mäuse wurden i.d. in die Fußsohlen mit HKL ( $4 \times 10^8$  Organismen), OVA (200  $\mu\text{g}$ ) und IFA (100  $\mu\text{l}$ ) immunisiert. Die Positiv-Kontrollgruppe erhielt OVA und IFA. Am Tag 7 nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten entfernt und mit OVA *in vitro* restimuliert. Die ELISA-Auswertungen dieser Zellkultur zeigten, dass HKL *in vivo* die Produktion von Zytokinen nach einem T<sub>H</sub>1-ähnlichen Muster induziert (Abb. 15). So sind ein Anstieg von IFN- $\gamma$  und erniedrigte Werte für IL-4 zu sehen. Kontrollen zeigen dem gegenüber keinen Anstieg des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN- $\gamma$ . Das T<sub>H</sub>2 Zytokin IL-4 wurde deutlich höher detektiert, wie Abb. 15a und 15c zeigen. In die gleiche Richtung deuten die Daten der ELISA von IL-10 in Abb. 15b. Die über HKL induzierten Zellen zeigen eine Erniedrigung der Zytokinkonzentration gegenüber der Positivkontrolle, jedoch nicht so deutlich, wie es bei IL-4 zu sehen ist. Insgesamt lässt sich der Schluss ziehen, dass die Infektion mit HKL einen Wechsel von einem T<sub>H</sub>2-ähnlichen zu einem T<sub>H</sub>1-ähnlichen Zytokinmuster im murinen Modell bewirkt.

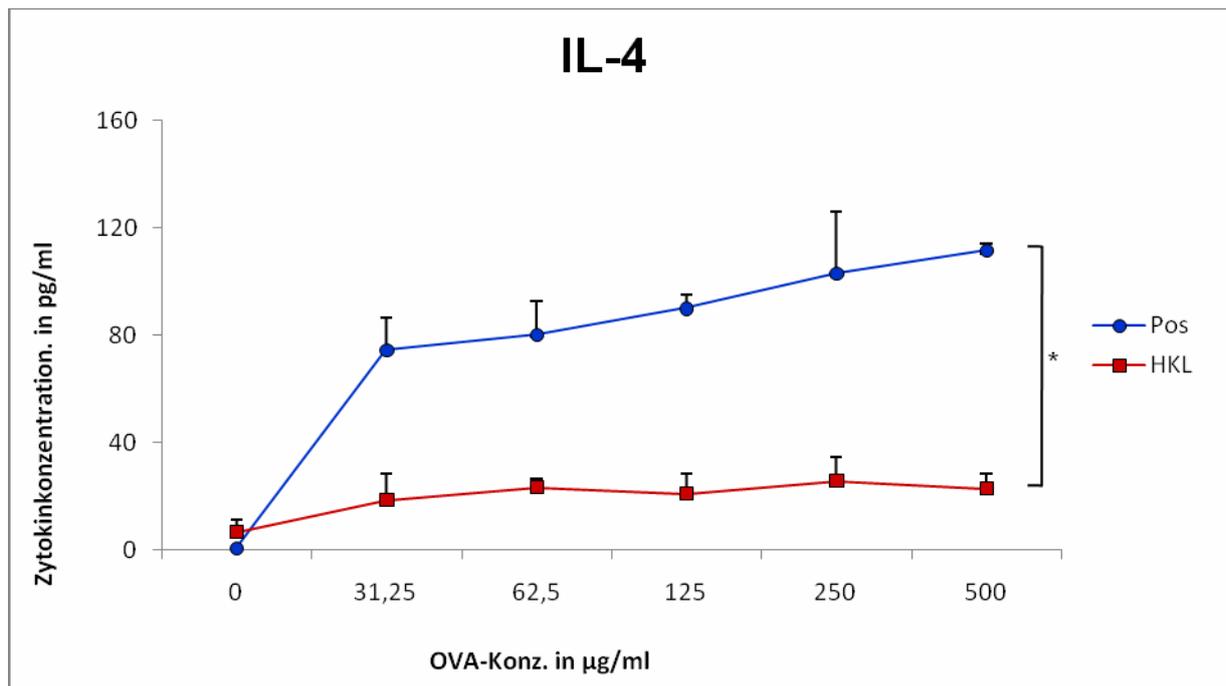
a



b



c



**Abb. 15: Zytokinproduktion von poplitealen und inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung mit HKL**

BALB/c Mäuse wurden i.d. in die Fußsohlen mit HKL ( $4 \times 10^8$  Organismen), OVA (200 µg) und IFA (100 µl) immunisiert. Die Positiv-Kontrollgruppe erhielt kein HKL, sondern nur OVA und IFA. Am Tag 7 wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten entnommen und *in vitro* für 48 bzw. 96 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an OVA restimuliert. Die Konzentration der Zytokine in den Überständen der Zellkultur wurden mittels ELISA bestimmt. Abb. 15a zeigt die Zytokinkonzentration von IFN- $\gamma$ , 15b die von IL-10 und 15c zeigt die Konzentration von IL-4.

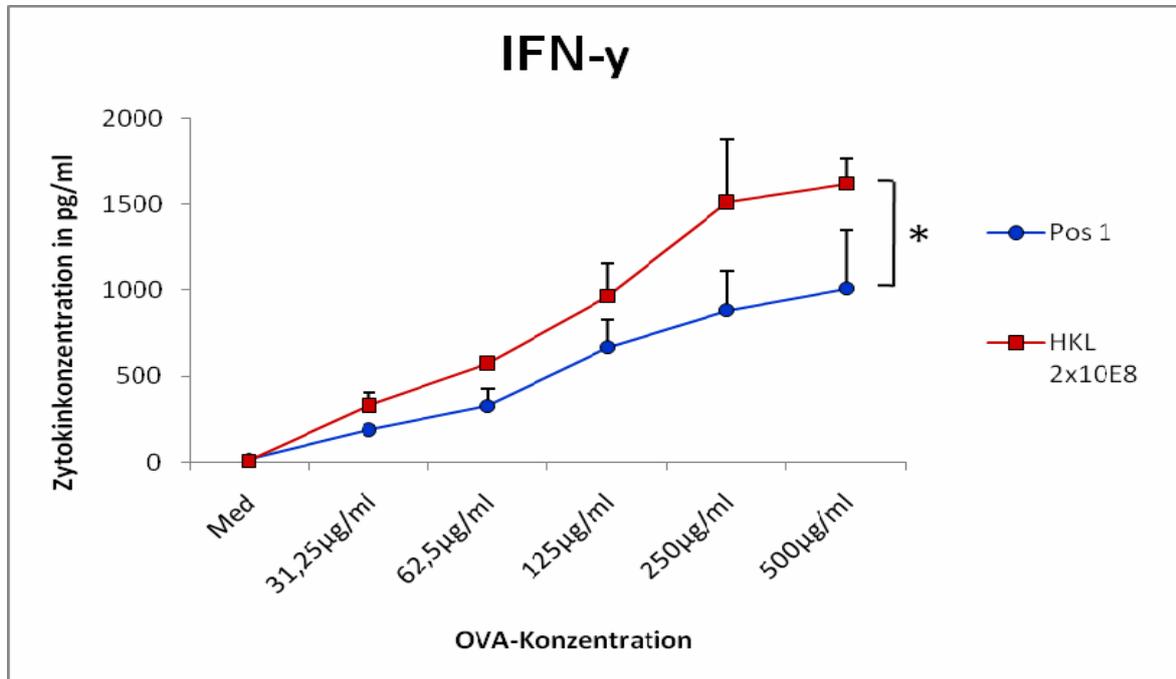
#### 4.1.2 Intraperitoneal verabreichtes HKL induziert ebenfalls eine T<sub>H</sub>1 gewichtete Immunantwort

Die Ergebnisse aus 4.1.1 waren sehr vielversprechend, bedurften jedoch einer Verbesserung, da für die weiteren Experimente dieser Arbeit eine höhere Zellzahl benötigt wurde. Dazu sollte die Applikationsform verändert werden. Anstatt i.d. in die Fußsohlen die Substanzen zur Immunisierung zu applizieren, wurden die gleichen Mengen an Substanzen i.p in das Abdomen injiziert. Sowohl die größere Drainagefläche des Bauchfells als auch die Gewinnung der Immunzellen aus der Milz anstatt aus den Lymphknoten erhöhten die Zahl an gewonnenen Leukozyten.

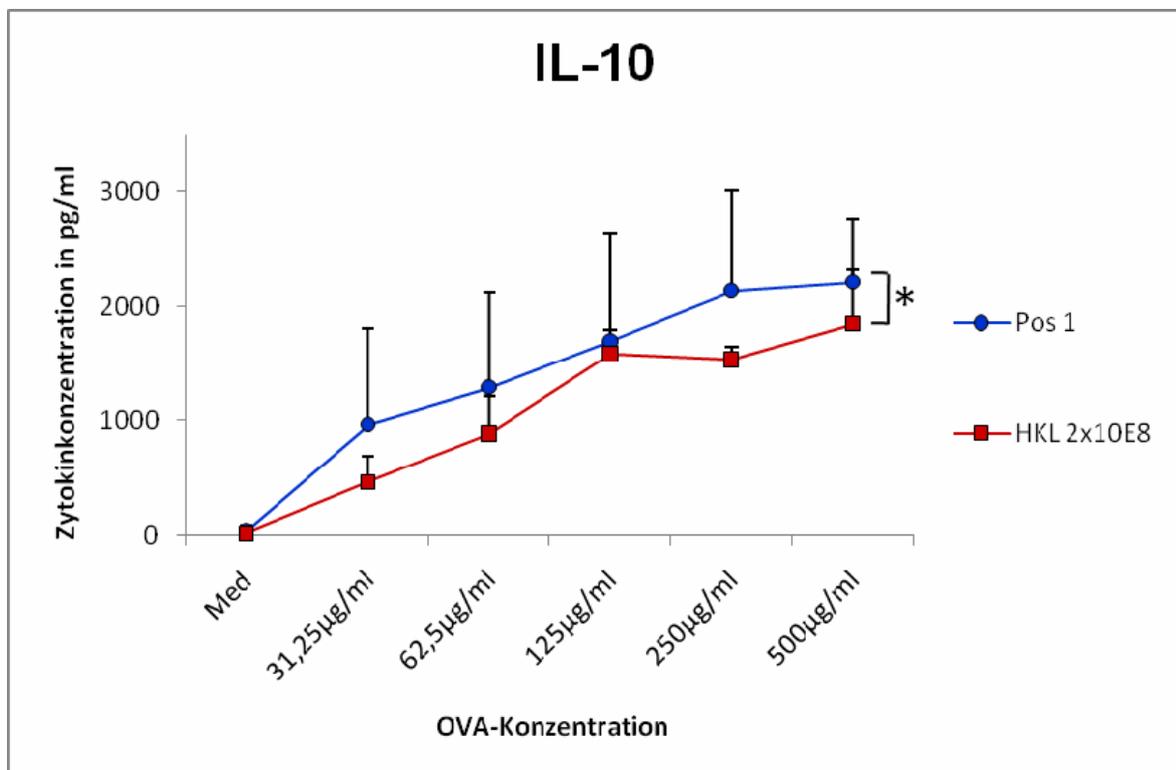
Restimulation, ELISA und der Proliferationsassay entsprachen denen der Leukozyten aus den Lymphknoten nach der Immunisierung in die Fußsohlen. Auch hier konnte ein Wechsel im

Zytokinmuster der mit HKL behandelten Tiere von T<sub>H</sub>1-ähnlich nach T<sub>H</sub>2-ähnlich beobachtet werden (Abb. 16).

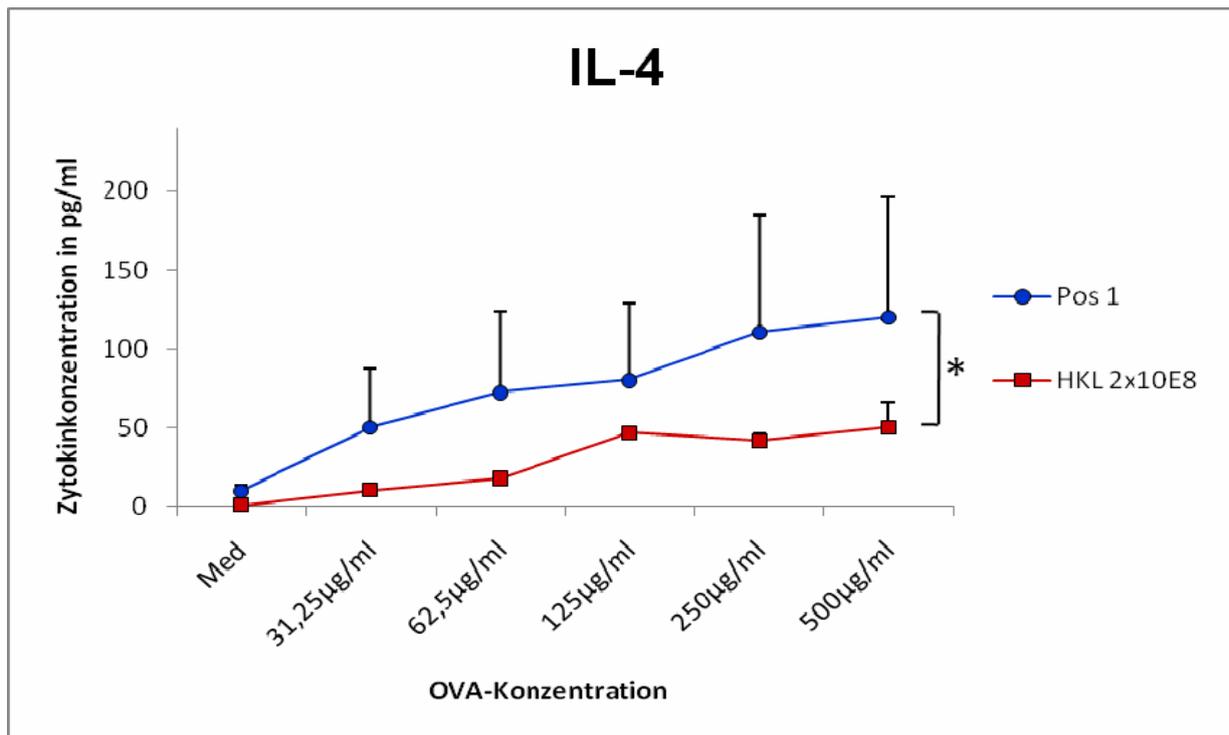
**a**



**b**



c

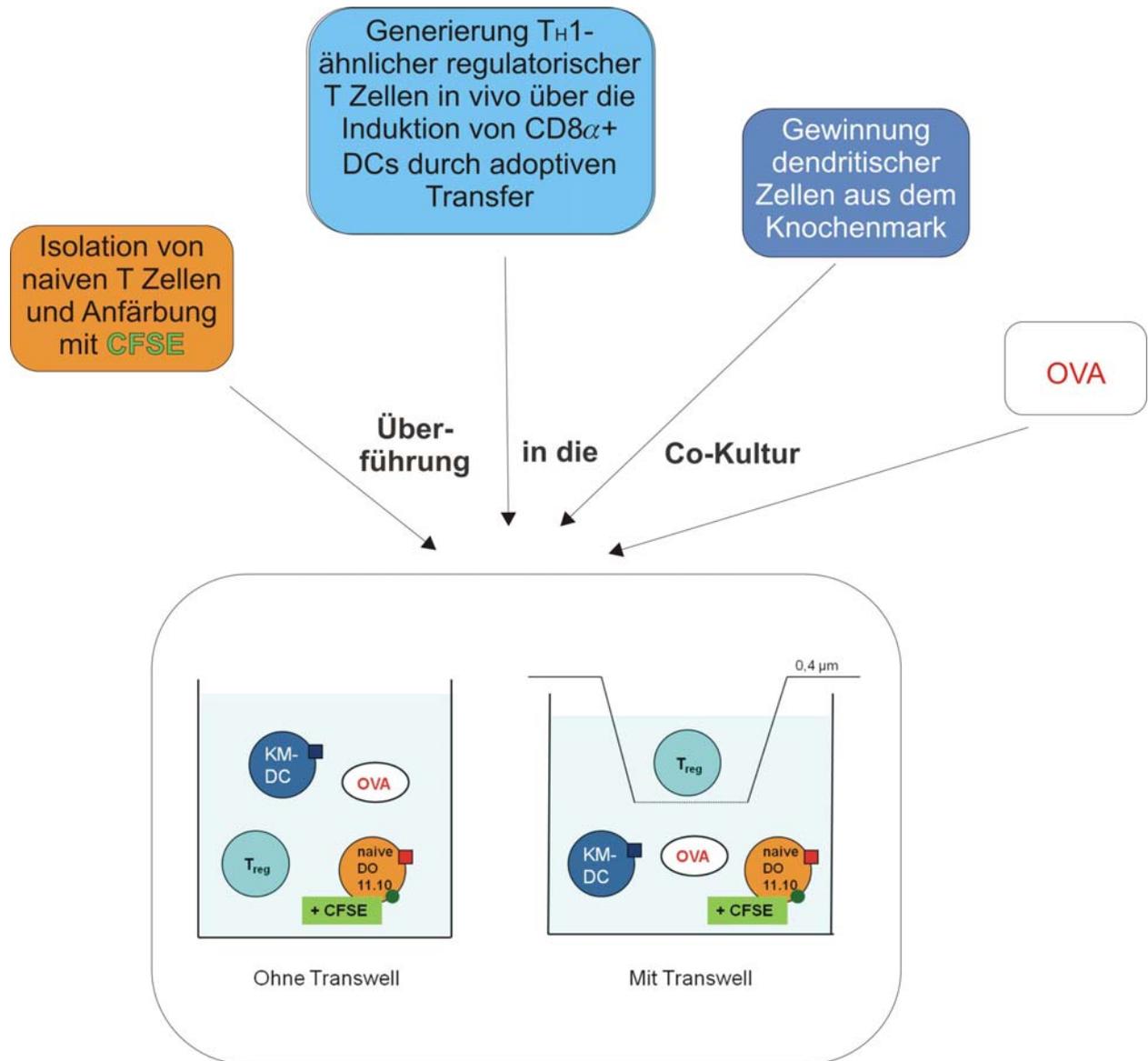


**Abb. 16: Zytokinproduktion von Milzzellen nach Immunisierung mit HKL**

Die Mäuse wurden wie unter Abb. 15 beschrieben immunisiert, es wurde jedoch nicht i.d. in die Fußsohlen injiziert, sondern i.p. und nicht die Lymphknoten, sondern die Milzen der Tiere wurden entnommen. Die Restimulation erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben.

#### 4.2 Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen

Für die Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen wurde deren Einfluss auf naive T Zellen untersucht.  $T_{reg}$  Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Proliferation von T Effektorzellen unterdrücken und so eine überschießende Reaktion verhindern oder eine abgeschlossene Immunreaktion beenden. Um diese Hemmung der Proliferation sichtbar machen zu können, wurden die naiven T Zellen mit CFSE gefärbt und ihr Verhalten mit und ohne Einfluss von  $T_{reg}$  Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Für die Aktivierung naiver T Zellen ist die Präsentation eines Antigenes über APCs erforderlich. In dieser Arbeit wurden Knochenmarks-DCs als Antigen präsentierende Zellen und das Antigen OVA verwendet (Abb. 17).

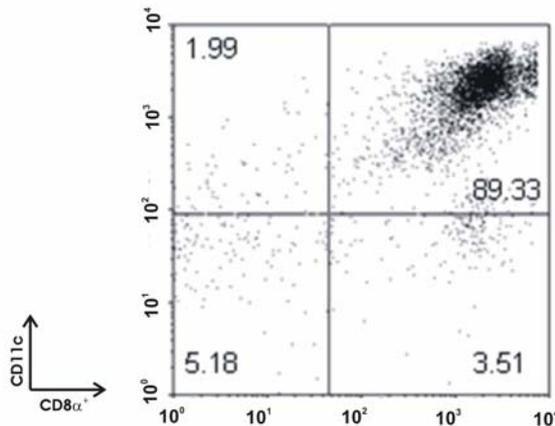


**Abb. 17: Flussdiagramm der Co-Kultur**

$T_H1$ -ähnliche regulatorische T Zellen wurden über die Stärke der Proliferation von T Effektorzellen analysiert. Die Co-Kultur bestand neben den  $T_{reg}$  Zellen und den T Effektorzellen aus dendritischen Zellen und dem Antigen OVA. Über die Präsentation von OVA der dendritischen Zellen wurden die naiven T Effektorzellen aktiviert. Merkmal dieser Aktivität ist die Proliferation von T Effektorzellen, die über  $T_H1$ -ähnliche regulatorische T Zellen gehemmt werden kann. Die Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen wurde über die Trennung mit Transwell präzisiert, in Bezug auf direkten Zellkontakt oder der Kommunikation über Zytokine.

#### 4.2.1 Generierung regulatorischer T Zellen *in vivo*

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass bei der Aufnahme von HKL in das murine Immunsystem  $CD8\alpha^+$ DCs entstehen, die wiederum in der Lage sind  $T_H1$ -ähnliche regulatorische T Zellen zu induzieren (184).  $CD8\alpha^+$ DCs wurden mit Hilfe von MACS nach der i.p Applikation von HKL aus der Milz isoliert. Die Zellen wurden nach der Behandlung mit MACS im FACS analysiert (Abb. 18).



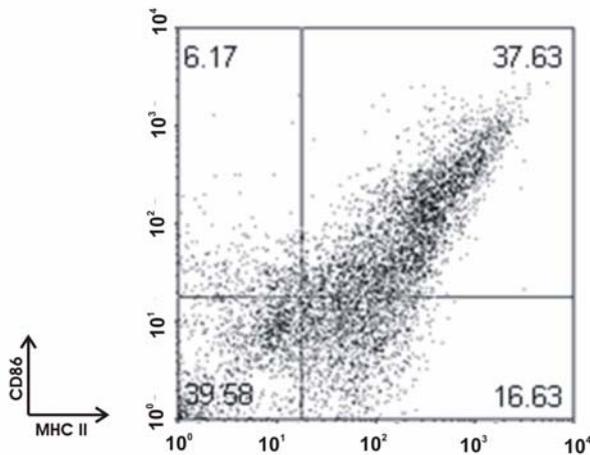
**Abb. 18: Reinheit der  $CD8\alpha^+$  DCs**

Die im Dot-Plot dargestellten dendritischen Zellen wurden im Vorwärts-Seitwärts-Scatter gegatet. Zur weiteren Analyse der Zellen war zuvor gegen die Oberflächenantigene CD11c, ein Marker für dendritische Zellen, und CD8a mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert worden. Es ergab sich eine Reinheit der  $CD8\alpha^+$  DCs von 89,33 %.

Parallel wurden, wiederum mit dem MACS-System, naive T Zellen aus DO11.10 Mäusen gewonnen. Beide Zellpopulationen wurden per adoptiven Transfer i.v. in eine naive BALB/c Maus zurückgegeben. Im murinen Immunsystem entstanden aus den naiven DO11.10 T Zellen unter Einflussnahme der  $CD8\alpha^+$  DCs nach 5 Tagen  $T_H1$ -ähnliche regulatorische T Zellen. Zur Isolierung mit MACS der ehemals naiven DO11.10 T Zellen wurde das Oberflächenantigen KJ 1.26 genutzt, das ausschließlich auf den Zellen der DO11.10 Mäuse exprimiert wird.

#### 4.2.2 Generierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Um die regulierende Eigenschaft der  $T_{reg}$  Zellen auf Effektor T Zellen zu untersuchen, werden aktivierte T Zellen benötigt. Die drei Grundvoraussetzungen für die Aktivierung naiver Effektor T Zellen sind die Präsentation eines Antigens über das MHC-Molekül, co-stimulatorische Signale und spezifische Zytokine. Hierfür wurden DCs generiert, da diese als professionelle antigenpräsentierende Zellen naive T Zellen höchst effektiv aktivieren und polarisieren können. Nach siebentägiger Inkubation von Knochenmarkszellen mit GM-CSF konnten dendritische Zellen in der FACS-Analyse bestätigt werden (Abb. 19).

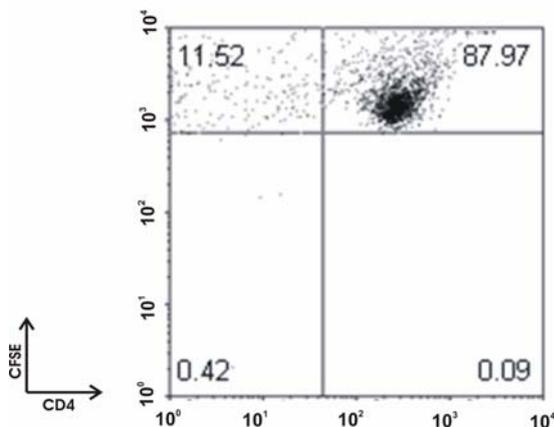


**Abb. 19: Reinheit der Knochenmarks-DCs**

Die zu untersuchenden Zellen wurden gegen die Oberflächenantigene CD86 und MHCII mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Beide Antigene befinden sich auf APCs und dienen der Kommunikation mit T Zellen. Im dargestellten Dot-Plot ist eine 37,63 %ige Reinheit der Knochenmarks-DCs zu erkennen, was für eine Aktivierung der naiven Effektor T Zellen ausreichend ist.

#### 4.2.3 Isolierung naiver T-Zellen

Von DO11.10 TZR-transgenen Mäusen wurden mittels Auto-MACS naive T Zellen isoliert und mit CFSE angefärbt, um die Proliferation der Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmen zu können (Abb. 20).



**Abb. 20: Kontrolle der CFSE gefärbten naiven T Zellen**

Der Dot-Plot zeigt, dass 87,97 % der analysierten Zellen CD4 positiv waren und diese den Farbstoff CFSE aufgenommen haben.

#### 4.2.4 Auswertung der Co-Kultur

Der Einfluss von  $T_{reg}$  Zellen auf T Effektorzellen wurde durch Co-Kultur von  $T_{reg}$  Zellen, DCs und naive T Zellen untersucht. Die Negativkontrolle bestand in einem Ansatz ohne OVA, da ohne das Antigen keine Aktivierung der naiven T Zellen eintreten kann. Die Positivkontrolle war ohne  $T_{reg}$  Zellen angesetzt, um hier eine maximale Aktivierung der naiven T Zellen zu erreichen. Die beiden Zellpopulationen  $T_{reg}$  Zellen und naive T Zellen wurden in einem Ansatz mit Hilfe

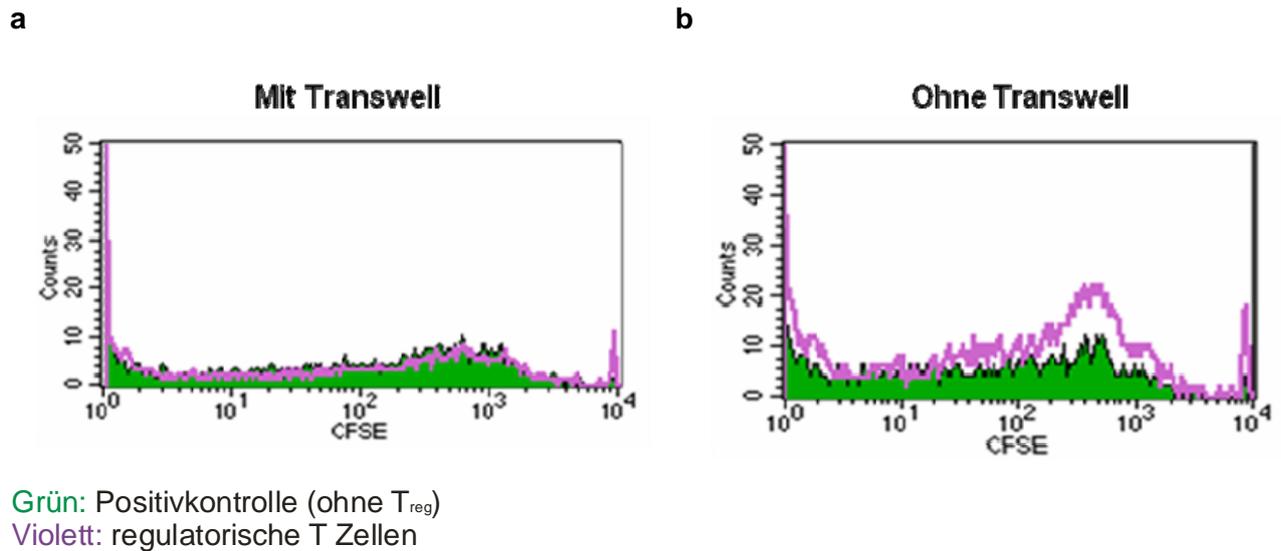
von Zellkultur-Einsätzen getrennt und in einem zweiten ohne Zellkultur-Einsätze kultiviert, um einen direkten Zellkontakt zu ermöglichen.

#### **4.2.4.1 Die Proliferationsrate der Effektor T Zellen wird bei direktem Zellkontakt mit regulatorischen T Zellen gehemmt**

Die Proliferation der zunächst unreifen, durch den Einfluss von DCs zu Effektor T Zellen gereiften, CFSE markierten Zellen ist ein Maß für die Effektivität von  $T_{reg}$  Zellen. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchungsreihe weisen darauf hin, dass der direkte Zellkontakt für den inhibitorischen Effekt der  $T_{reg}$  Zellen verantwortlich ist.

Abb. 21a zeigt die Proliferation nach 84 Stunden der Positivkontrolle und der ehemaligen naiven T-Zellen, die mit den regulatorischen T Zellen nicht in direktem Zellkontakt standen. Die beiden Zellpopulationen wurden über die Zellkultur-Einsätze getrennt. Der Unterschied der Proliferation der Positivkontrolle und der ehemaligen naiven T Zellen ist minimal. Die T Zellen wurden bei diesem Versuchsaufbau nicht erkennbar von den  $T_{reg}$  Zellen beeinflusst.

Dagegen ist die Proliferation gehemmt bei den Zellen, die mit regulatorischen T Zellen inkubiert wurden und mit ihnen in direktem Zellkontakt standen (Abb. 21b). Hier ist der Unterschied der Positivkontrolle und der ehemaligen naiven T Zellen zu erkennen. Da keine Proliferation der Effektor T Zellen stattfand, konnte das CFSE nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden.



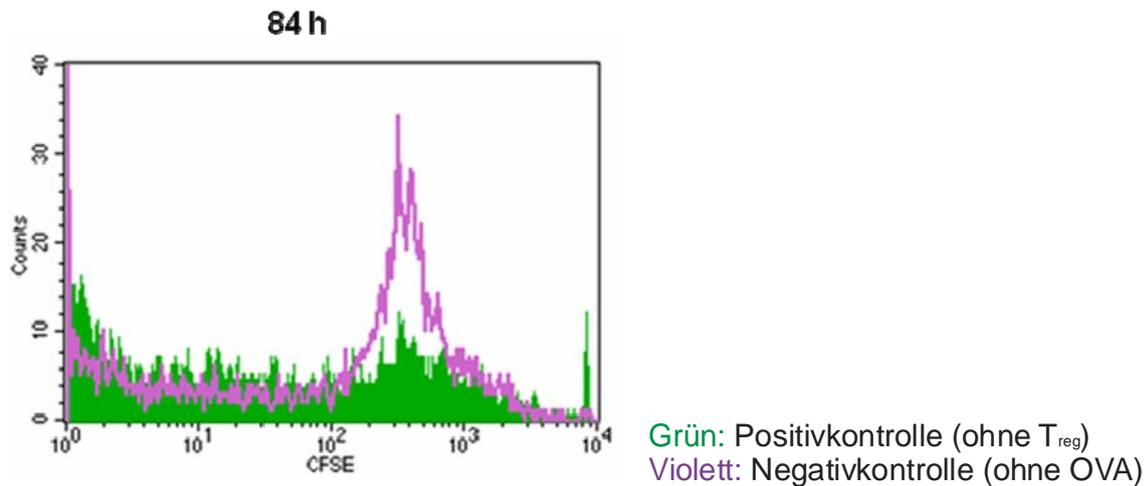
**Abb. 21: Proliferation CFSE markierter CD4<sup>+</sup> T Zellen – mit und ohne Transwell**

Für die Analyse regulatorischer T Zellen wurde eine Co-Kultur angelegt mit ehemals naiven CFSE markierten CD4<sup>+</sup> T Zellen, DCs, regulatorischen T Zellen und OVA und nach 48 Stunden die Proliferation mit FACS analysiert. Es wurden in einem Ansatz mit Transwell-Zellkultur-Einsätzen die T<sub>reg</sub> Zellen von dem Rest der Zellen getrennt, während ein zweiter Ansatz ohne Transwell den direkten Zell-Zell-Kontakt zuließ. Die Positivkontrolle (grün dargestellt) entspricht der aus Abb. 16. Die Proliferation ehemals naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen mit dem Zusatz von T<sub>reg</sub> Zellen ist violett dargestellt. Die Proliferation der CFSE markierten CD4<sup>+</sup> T Zellen ist ohne Transwell, also mit direktem Zell-Zell-Kontakt, deutlich geringer (Abb. 21b). Mit Transwell und einer räumlichen Trennung der Zellen fällt die Proliferation deutlich stärker aus (Abb. 21a).

Die Proliferation der CFSE-gefärbten T Zellen ist mit dem Zellkultur-Einsatz deutlich erhöht und es zeigt sich nur ein geringer Unterschied zur Positivkontrolle. Dagegen ist die Proliferation dieser Zellpopulation ohne Zellkultur-Einsätze klar erniedrigt und der Unterschied zwischen der Positivkontrolle und der Proliferationsrate mit dem Zusatz von T<sub>reg</sub> Zellen ist deutlich zu erkennen.

Die Kommunikation der regulatorischen T Zellen mit den Effektor T Zellen ist demnach abhängig von einem direkten Zellkontakt und kann nicht alleine über Zytokine erfolgen.

Die Positivkontrolle zeigt eine deutliche Abnahme der CFSE-gefärbten Zellen, was bedeutet, dass sie stark proliferiert und das CFSE an die Tochterzellen jeweils zu gleichen Teilen weitergegeben haben (Abb. 22). Die Zellen der Negativkontrolle zeigen hingegen fast keine Proliferation. Es fand keine ausreichende Aktivierung der Effektor T Zellen statt. Die violett gezeichnete Linie bleibt erhöht, da das CFSE bei ausbleibender Proliferation nicht weitergegeben werden kann.

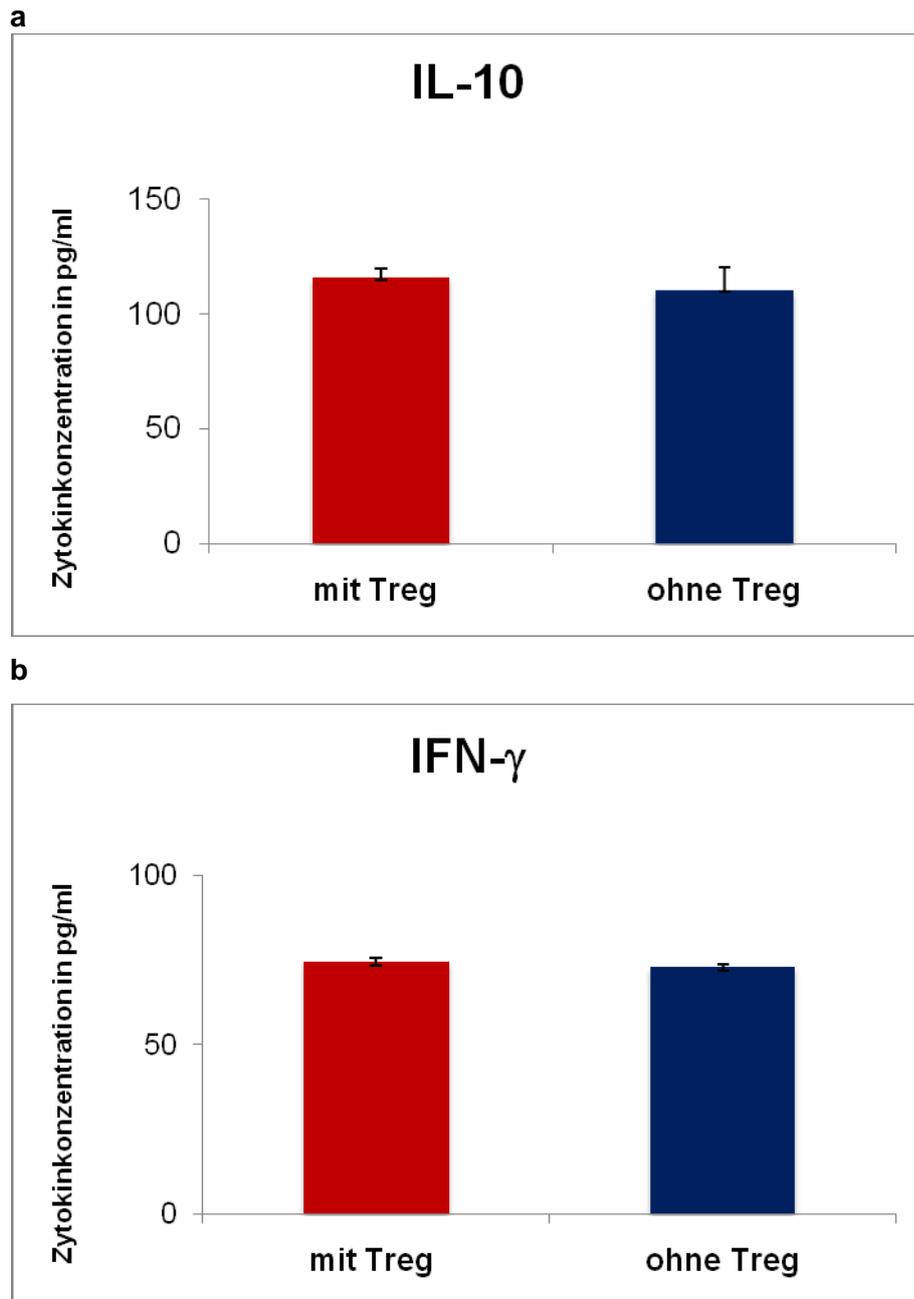


**Abb. 22: Proliferation CFSE markierter CD4<sup>+</sup> T Zellen – Positiv- und Negativkontrolle**

In der Co-Kultur, wie unter Abb. 21 beschrieben, bestand die Positivkontrolle aus einem Ansatz ohne T<sub>reg</sub> Zellen (hier grün dargestellt), die Negativkontrolle aus einem Ansatz ohne OVA (hier violett dargestellt). Beide Kontrollen wurden auch mit Transwell angesetzt, hatten jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis. Es zeigt sich eine deutlich höhere Proliferationsrate in der Positiv- als in der Negativkontrolle. Die hohe Zahl an Counts bei der hohen Konzentration von CFSE der Negativkontrolle bedeutet keine Abnahme der CFSE-Konzentration und ist Ausdruck des nicht Proliferierens.

#### **4.2.4.2. Die Funktionsweise regulatorischer T Zellen ist unabhängig von IFN- $\gamma$ und IL-10**

Der Befund aus den Analysen der Proliferationsraten von Effektor T Zellen deutet auf einen direkten Zellkontakt der Funktionsweise regulatorischer T Zellen. Um dies weiter zu überprüfen, wurden die Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  untersucht. Es ist bekannt, dass beide Zytokine von den T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen Zellen produziert werden und daher bestand die Annahme, dass sie bei der Funktionsweise dieser Zellen eine wesentliche Rolle spielen (184). Die Ergebnisse beider Zytokinkonzentrationen zeigen jedoch, dass keine signifikante Differenz zwischen den Ansätzen mit T<sub>reg</sub> Zellen und den Positivkontrollen ohne T<sub>reg</sub> Zellen zu detektieren ist (Abb. 23). T<sub>reg</sub> Zellen scheinen unabhängig von den Zytokinen IL-10 und IFN- $\gamma$  ihre Wirkung zu entfalten. Dieses Erkenntnis gibt einen Hinweis auf einen direkten Zellkontakt als Wirkmechanismus regulatorischer T Zellen.



**Abb. 23: Konzentrationen der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  mit und ohne Anwesenheit von T<sub>reg</sub> Zellen**

Die Produktion von Zytokinen wurde in den Überständen der Zellkultur über ELISA ermittelt. Ein Ansatz bestand aus Effektor T Zellen, Knochenmark-DCs, OVA und T<sub>reg</sub> Zellen (mit T<sub>reg</sub>). Die Kontrolle bestand nur aus Effektor T Zellen, DCs und OVA (ohne T<sub>reg</sub>). Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Anwesenheit und Abwesenheit regulatorischer T Zellen bei den Konzentrationen der Zytokine IL-10 (Abb. 23a) und IFN- $\gamma$  (Abb. 23b) zu erkennen.

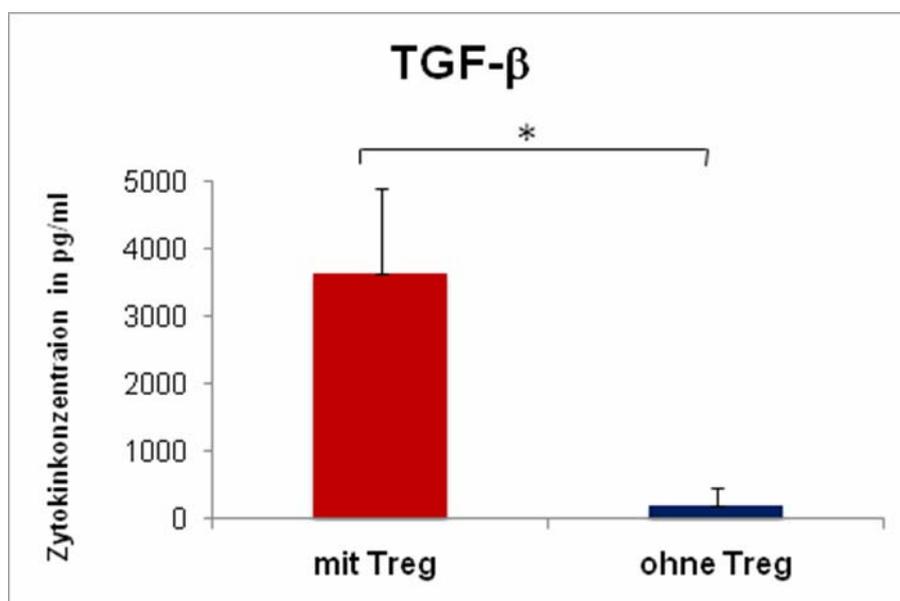
#### 4.2.4.3. TGF- $\beta$ und IL-2 haben einen Einfluss auf die Funktionsweise regulatorischer T Zellen

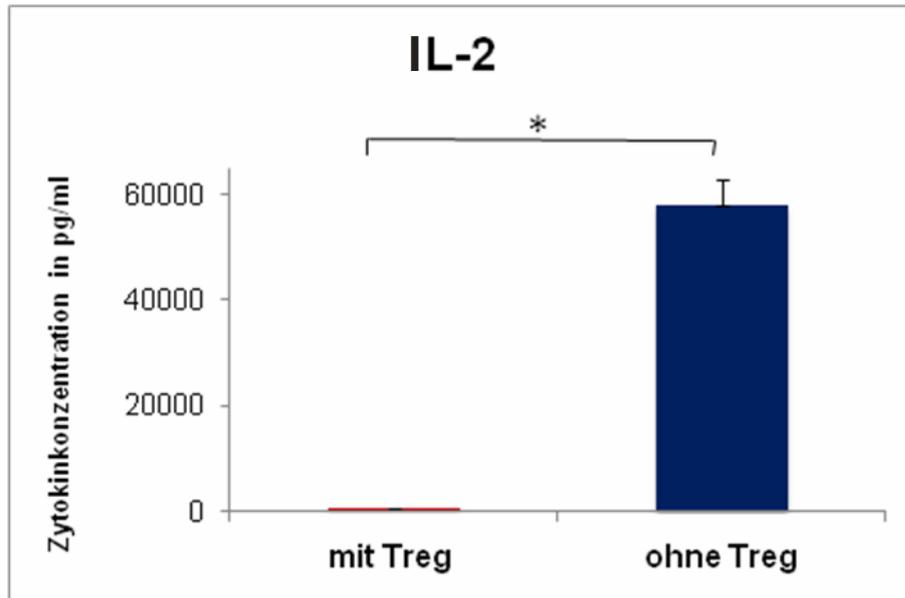
TGF- $\beta$  ist neben IL-10 ein klassisch regulatorisches Zytokin (115, 117). Es wird von verschiedenen T<sub>reg</sub> Zellen produziert, daher wurde untersucht, ob die T<sub>reg</sub> Zellen dieser Arbeit ihre Funktion ebenfalls über TGF- $\beta$  entfalten. IL-2 stellt einen Wachstumsfaktor für T Zellen dar, der von T<sub>H</sub> Zellen synthetisiert wird und hauptsächlich autokrin wirkt. IL-2 dient der Aufrechterhaltung einer Immunreaktion und ist daher von großem Interesse für die Funktionsweise regulatorische T Zellen (69, 175).

Die Daten der Analyse der Zytokine IL-2 und TGF- $\beta$  zeigen sehr deutliche Unterschiede zwischen der Anwesenheit von T<sub>reg</sub> Zellen und der Positivkontrolle ohne T<sub>reg</sub> Zellen (Abb. 24). Die Zytokinkonzentration von TGF- $\beta$  ist bei dem Ansatz mit T<sub>reg</sub> Zellen signifikant höher als bei der Positivkontrolle ohne T<sub>reg</sub> Zellen. Bei IL-2 verhält es sich umgekehrt. Das Zytokin liegt bei der Probe mit T<sub>reg</sub> Zellen in sehr viel niedrigerer Konzentration vor als in der Positivkontrolle. Der Unterschied beträgt mehrere Zehnerpotenzen bei IL-2.

Nach den Ergebnissen der Zytokinbestimmungen von IL-10 und IFN- $\gamma$  zeigen die Ergebnisse von IL-2 und TGF- $\beta$  sehr deutlich, dass der Einfluss der T<sub>reg</sub> Zellen auf Effektor T Zellen auch abhängig von Zytokinen ist. Die Funktionsweise von T<sub>reg</sub> Zellen scheint *in vitro* nicht alleine auf einem direkten Zellkontakt zu beruhen.

a



**b**

**Abb. 24: Deutliche Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen von IL-2 und TGF- $\beta$  bei An- und Abwesenheit von T<sub>reg</sub> Zellen**

Die Zytokinkonzentrationen wurden wie bei IL-10 und IFN- $\gamma$  mit ELISA analysiert. Während die Konzentration von TGF- $\beta$  bei der Anwesenheit von T<sub>reg</sub> Zellen sehr hoch ist (Abb. 24a), ist sie bei IL-2 im Gegensatz zur Positivkontrolle überaus gering (Abb. 24b). Beide Ergebnisse sind signifikant und geben einen Hinweis auf die Bedeutung dieser Zytokine bei der Funktionsweise regulatorischer T Zellen.

### **4.3 Einfluss immunmodulatorischer Substanzen auf die Toleranzentwicklung**

#### **4.3.1 Respiratorische Toleranz wird durch Prednisolon und Methylprednisolon aufgehoben**

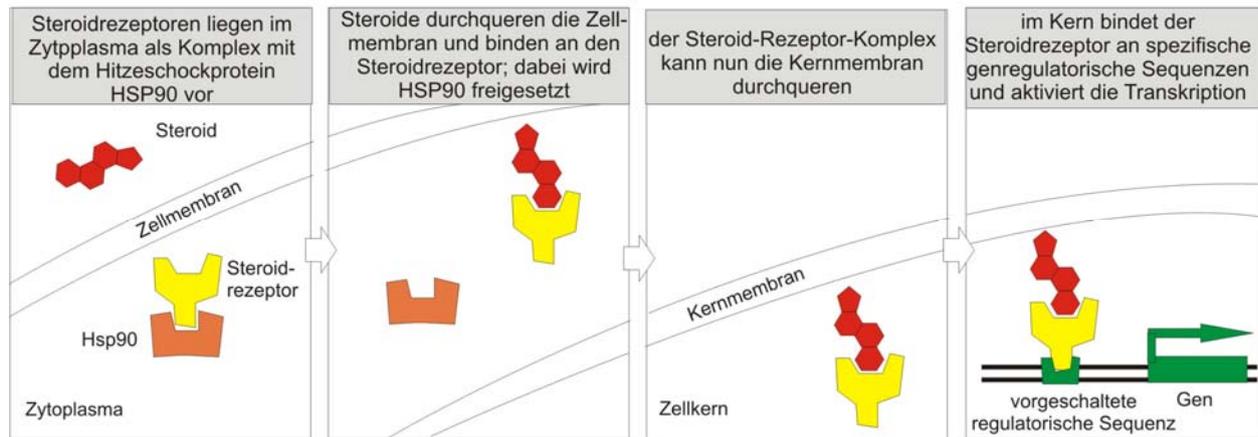
Corticosteroide sind in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen die wirksamsten Medikamente, die heute verfügbar sind. Inhalative Corticosteroide stellen neben Beta<sub>2</sub>-Sympathomimetika eine der effektivsten und am häufigsten angewandten Therapieformen bei Asthma bronchiale dar.

Corticosteroidtherapie	
Wirkung auf	physiologische Wirkung
↓ IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF ↓ IL-3, IL-4, IL-5, IL-8	↓ Entzündung durch Zytokine
↓ Stickoxide	↓ Stickoxid
↓ Phospholipase A <sub>2</sub> ↓ Cyclooxygenase Typ2	↓ Prostaglandine ↓ Leukotriene
↓ Adhäsionsmoleküle	verminderte Leukozytenwanderung aus den Blutgefäßen
↓ Endonukleasen	Induktion der Apoptose bei Lymphozyten und Eosinophilen

**Abb. 25: Antiphlogistische Wirkung von Corticosteroiden**

Corticosteroide sind stark entzündungshemmende Medikamente, die die Expression vieler Gene regulieren. Sie hemmen die Produktion vieler Zytokine und anderer Mediatoren, blockieren die Einwanderung von Leukozyten und induzieren bei Lymphozyten den Zelltod durch Apoptose. Hier dargestellt sind nur die positiven Eigenschaften der Corticosteroide bei der Unterdrückung einer Entzündungsreaktion. Zahlreiche Nebenwirkungen sind bekannt (modifiziert nach Janeway et al., 2004, Immunobiology) (95).

Ihre antiphlogistische Wirkung beruht unter anderem auf einer Verminderung der Einwanderung von T<sub>H</sub>2 Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten in die Atemwege und auf der Reduktion der Produktion von T<sub>H</sub>2 Zytokinen und weiterer Entzündungsmediatoren (18, 27, 66). Corticosteroide sind lipophil und diffundieren durch die Plasmamembran in die Zellen. Dort binden sie an den zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor, der in nahezu jeder Körperzelle exprimiert wird. Der Komplex aus Rezeptor und Corticosteroid dringt in den Zellkern ein und wirkt dort als Transkriptionsfaktor (86).



**Abb. 26: Molekularer Wirkmechanismus von Corticosteroiden**

Corticosteroide dringen über Diffusion in die Zelle ein und binden dort an einen spezifischen Rezeptor. Diese Bindung verdrängt das Hitzeschockprotein, mit dem der Rezeptor verbunden ist und legt die Bindungsstelle für die DNA frei. Der Komplex aus Corticosteroid und Rezeptor wandert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Genen (modifiziert nach Janeway et al., 2004, Immunobiology) (95).

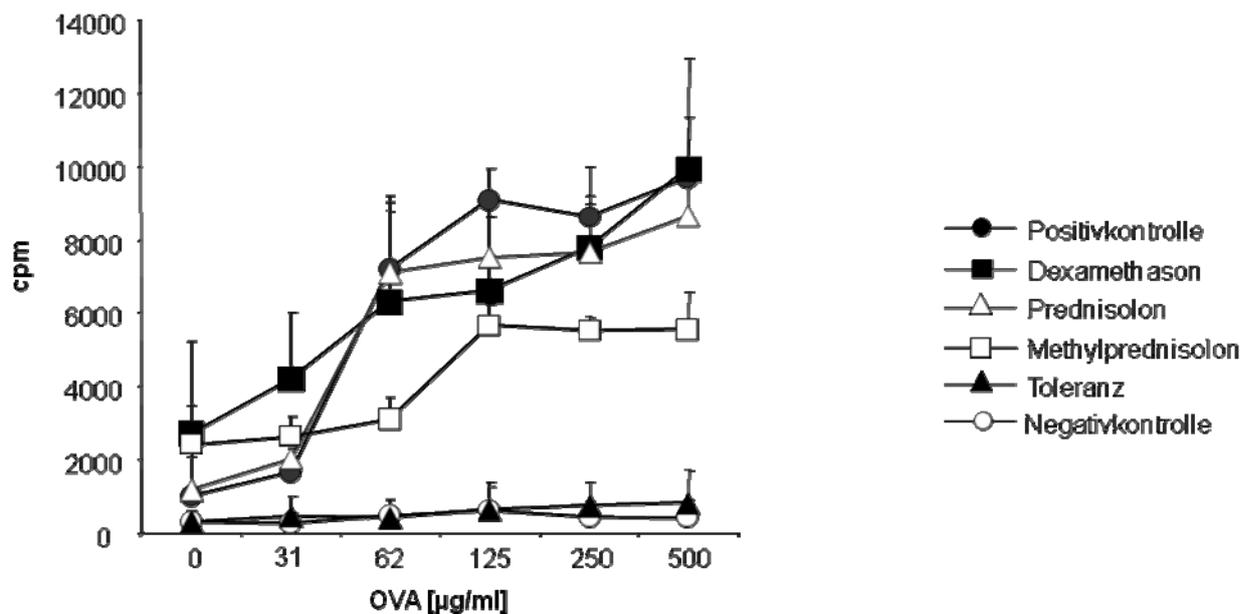
Wie aus Voruntersuchungen bereits bekannt, induziert die Exposition inhalativer Antigene eine respiratorische Toleranz. Diese Toleranz wird auf der Ebene von T Zellen induziert und schützt vor der Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität (4). Kommt es bei der Induktion zur gleichzeitigen Behandlung mit Dexamethason, so wird die Toleranzentwicklung unterdrückt und eine AHR entsteht. Der Grund hierfür liegt in der fehlenden Entwicklung regulatorischer T Zellen (30, 47, 185).

Die Fragestellung dieser Arbeit lautete, ob die Induktion regulatorischer T Zellen grundsätzlich von Corticosteroiden gehemmt wird. Hierzu wurden Prednisolon und Methylprednisolon untersucht. Dexamethason wurde als weitere Positivkontrolle verwendet.

Das Ergebnis dieser Arbeit war eine Unterdrückung der respiratorischen Toleranz bei der Gabe von 500 µg Prednisolon, 500 µg Methylprednisolon oder 100 µg Dexamethason. Die relative glucocorticoide Potenz liegt von Desamethason bei 30 während sie bei Prednisolon und Methylprednisolon etwas bei 5 liegt. Daher ist die eingesetzte Dosis von Dexamethason geringer. Die zuvor induzierte T Zell Toleranz, über die intranasale Gabe von OVA, wurde durch die systemische Behandlung mit Corticosteroiden aufgehoben. Bei der Restimulation der T Zellen mit Ovalbumin *in vitro* kam es zu einer Wiederherstellung der Proliferationsrate, die der

Proliferation der Positivkontrolle fast gleichkam und signifikant über der Proliferationsrate der Negativkontrolle und der Toleranzgruppe lag. (Abb. 27)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die systemische Gabe von Corticosteroiden generell eine mukosale Toleranzentwicklung inhibiert, unabhängig von der Art des Corticosteroids.



**Abb. 27: Corticosteroide heben die Entwicklung einer T Zell Toleranz auf**

BALB/c Mäuse wurden intranasal mit OVA (100 µg) an Tag 0, 1 und 2 behandelt. In der Abwesenheit eines Immunsuppressivums entstand eine Toleranz (▲), während mit 500 µg Prednisolon (△), 500 µg Methylprednisolon (□) oder 100 µg Dexamethason (■) diese Toleranzentwicklung aufgehoben wurde. Die Negativkontrolle wurde nur mit PBS behandelt (○). Die Positivkontrolle erhielt weder OVA noch ein Immunsuppressivum (●). Alle Gruppen wurden an Tag 13 systemisch mit OVA / Alum i.p. sensibilisiert, an Tag 23 wurden die Splenozyten isoliert. Die Restimulation erfolgte für 48 Stunden *in vitro* ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well) mit den entsprechenden OVA-Konzentrationen. Anschließend wurden die Immunzellen für weitere 24 Stunden mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert. Die Inkorporation des Thymidins wurde ermittelt.

#### 4.3.2 Tacrolimus und Cyclosporin A blockieren die respiratorische Toleranzentwicklung

Neben den Corticosteroiden werden in schweren Fällen von allergischen Erkrankungen auch Immunsuppressiva wie Tacrolimus und Cyclosporin A eingesetzt, so zum Beispiel bei der atopischen Dermatitis. Beide Substanzen gehören zur Gruppe der Calcineurininhibitoren und stammen aus der Transplantationsmedizin. Calcineurin ist eine calciumabhängige

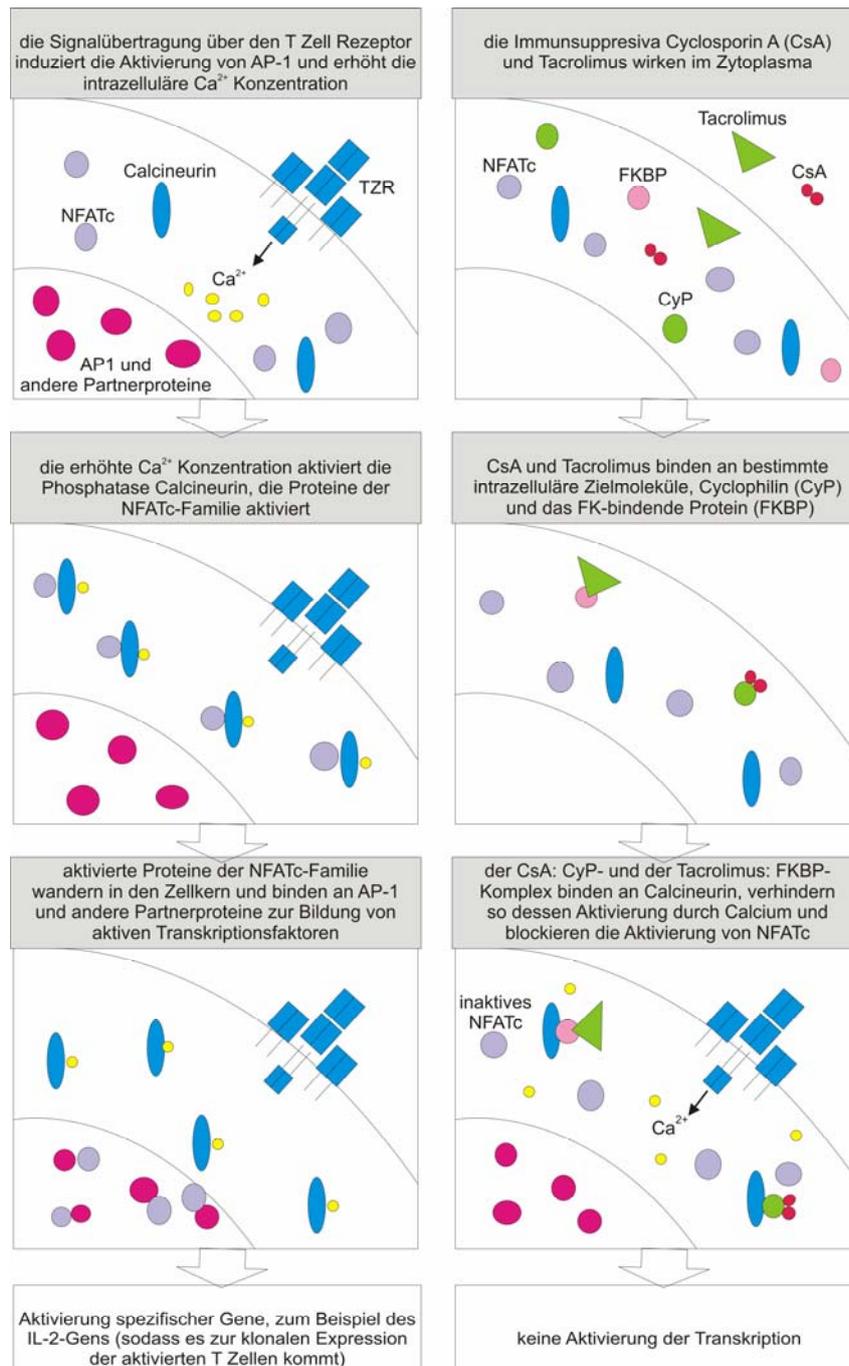
Proteinphosphatase, die eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB induziert. Chemisch sind Cyclosporin A und Tacrolimus nicht miteinander verwandt. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung des spezifischen Immunsystems, besonders der T<sub>H</sub> Zellen.

Immunologische Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus	
Zelltyp	Wirkung
T Lymphozyt	verminderte Expression von IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF-α verminderte Zellteilung wegen der Abnahme der IL-2 Produktion verminderte Ca <sup>2+</sup> abhängige Exozytose Hemmung der durch Antigene ausgelösten Apoptose
B Lymphozyt	Hemmung der Zellteilung als Folge der verminderten Zytokinproduktion durch die T Zellen Hemmung der Zellteilung nach dem Besetzen von Immunglobulinen an der Zelloberfläche durch Liganden Induktion der Apoptose nach Aktivierung der B Zellen
Granulozyt	verminderte Ca <sup>2+</sup> abhängige Exozytose

**Abb. 28: Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus auf Immunzellen**

Cyclosporin A und Tacrolimus wirken besonders auf T Zellen. Die Reduktion der Expression besonders des Zytokins IL-2 ist eines der Hauptwirkungen von Calcineurininhibitoren. Es kommt zu einer verminderten Zellteilung infolge der Abnahme der IL-2 Produktion. Calcineurininhibitoren wirken neben den T Zellen auch auf B Zellen und Granulozyten (modifiziert nach Janeway et al., 2004, Immunobiology) (95).

Die Wirkung beider Medikamente wird über die Blockade eines Signaltransduktionsweges erreicht. Cyclosporin A bindet an den zytosolischen Rezeptor Cyclophilin. Tacrolimus bildet einen Komplex mit dem „FK-binding-Protein“, ebenfalls ein Rezeptor im Zytosol. Beide Komplexe sind in der Lage die Phosphatase Calcineurin zu hemmen und damit die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB zu unterdrücken. Über diese Hemmung kommt es zu einer verminderten Synthese von Zytokinen, wie dem IL-2, IL-4, IFN-γ und TGF-β. Die Hauptwirkung wird der verminderten IL-2 Produktion zugeschrieben. Die T<sub>H</sub> Zellen werden nicht aktiviert, die Proliferation unterbleibt und damit findet eine reduzierte Immunreaktion statt (61, 120, 176).



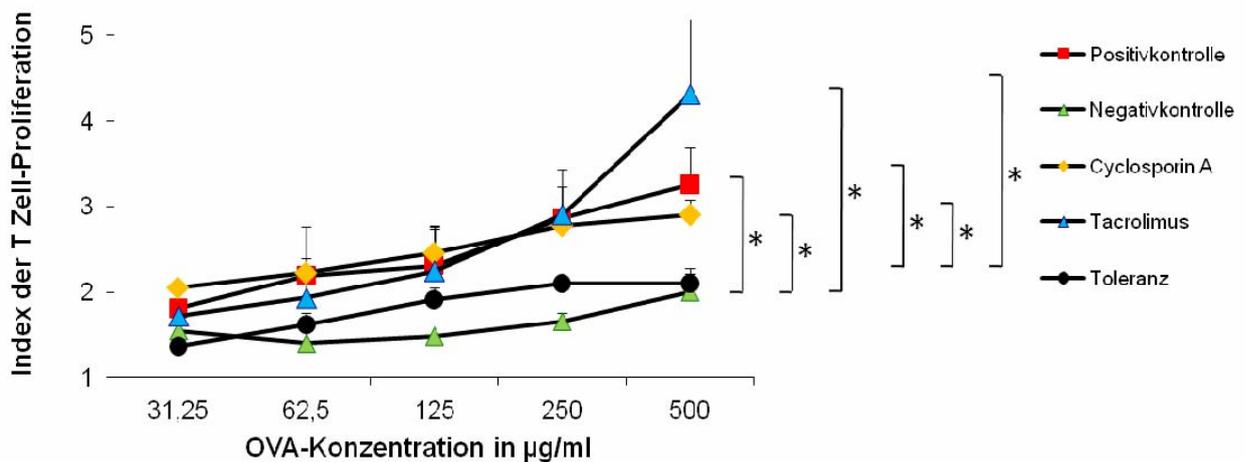
**Abb. 29: Wirkmechanismus von Cyclosporin A und Tacrolimus auf molekularer Ebene**

Calcineurininhibitoren hemmen die T-Zell-Aktivierung durch die Blockade der Proteinphosphatase Calcineurin. Über die Stimulation des T-Zell-Rezeptors kommt es zu einer erhöhten Calciumkonzentration im Zytoplasma der T-Zelle, was eine Aktivierung des Enzyms Calcineurin bewirkt. Calcineurin aktiviert weitere Proteine, die im Zellkern als Transkriptionsfaktoren fungieren und beispielsweise die Produktion von Zytokinen anregen. Binden Cyclosporin A und Tacrolimus an ihre intrazellulären Zielmoleküle (Cyclophilin und „FK-binding-Protein“), wird diese Kaskade unterdrückt und es kommt zu keiner gesteigerten Transkription (modifiziert nach Janeway et al., 2004, Immunobiology) (95).

Daten aus *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass Tacrolimus eine 10- bis 100- fach höhere Potenz in der Unterdrückung von Calcineurin besitzt als Cyclosporin A (84, 214). Daher wurde bei den Versuchen Tacrolimus in deutlich niedrigeren Dosen als Cyclosporin A eingesetzt. Tacrolimus in den Konzentrationen: 500 µg, 100 µg und 50 µg pro Tier und Cyclosporin A mit 1000 µg, 500 µg und 100 µg pro Tier.

Es sollte untersucht werden, ob die toleranzaufhebende Wirkung nur für Corticosteroide gilt oder auch andere Immunsuppressiva in der Lage sind, eine mukosale Toleranz aufzuheben. Um diese Frage zu beantworten, wurde das identische Protokoll wie bei den Versuchen mit Corticosteroiden verwendet, jedoch wurden während der Toleranzentwicklung Tacrolimus bzw. Cyclosporin A intraperitoneal injiziert. Unabhängig von einem differenten Wirkmechanismus der beiden Substanzgruppen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Abb. 30 zeigt, dass Tacrolimus und Cyclosporin A bei systemischer Gabe den tolerogenen Effekt aufhebt und die Proliferation der T Zellen wiederhergestellt wird.

Damit ist gezeigt worden, dass nicht nur der pharmakologische Effekt von Corticosteroiden, sondern auch der von anderen immunmodulatorischen Substanzen negative Auswirkungen auf die Entwicklung einer Immuntoleranz gegenüber Antigenen besitzt.



**Abb. 30: Calcineurininhibitoren hemmen die Entwicklung einer T Zell Toleranz**

Immunisierung, Restimulation und Analyse erfolgte wie unter Abb. 27 beschrieben. Die eingesetzten Immunsuppressiva variierten. Die Ergebnisse mit Tacrolimus und Cyclosporin A entsprachen denen mit Corticosteroiden.

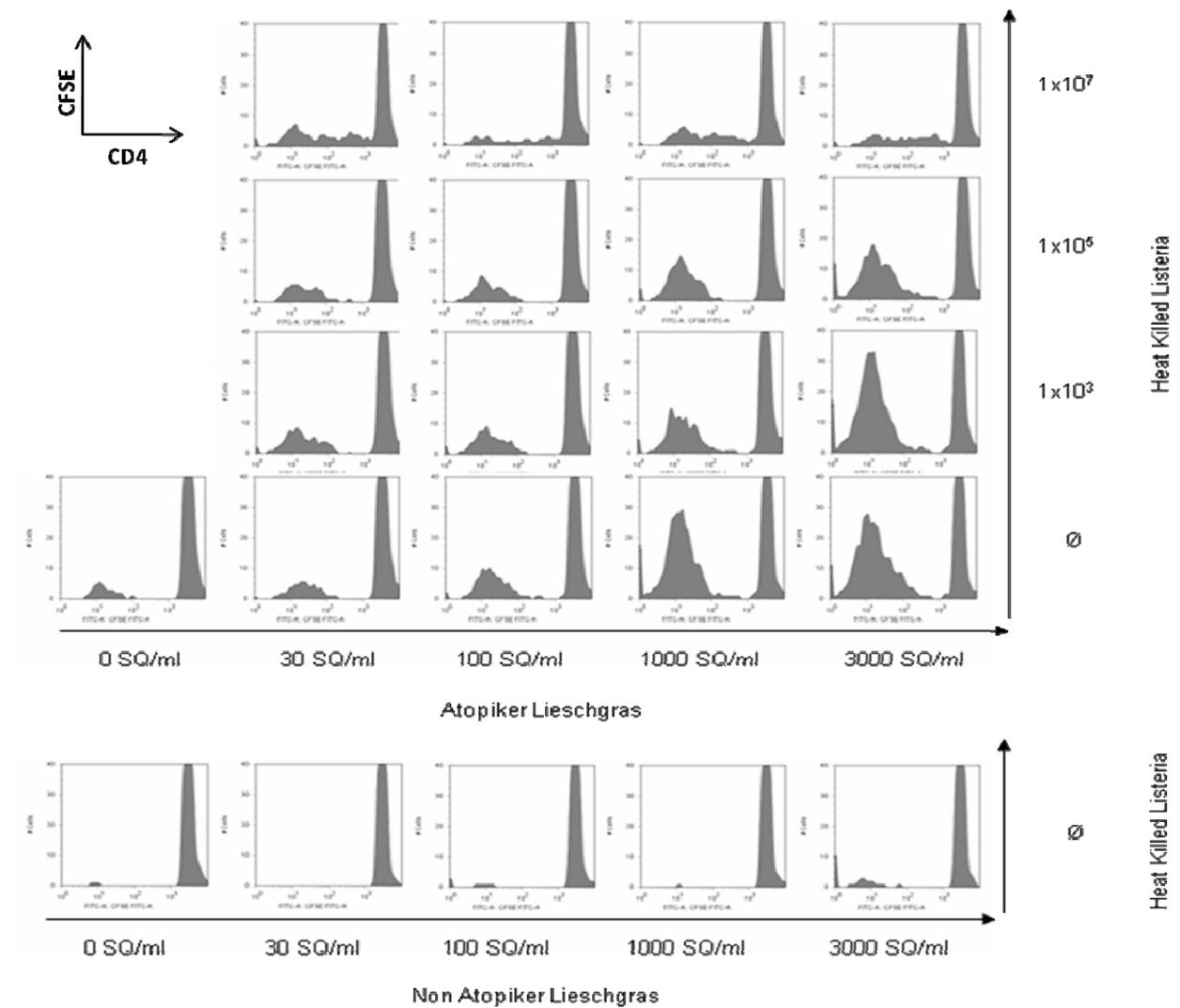
#### 4.4 Humane Immunzellen reagieren auf HKL *in vitro* entsprechend muriner Zellen

Die bisherige Datenerhebung fand ausschließlich im murinen Modell statt. Der nächste Schritt bestand in der Untersuchung regulatorischer T Zellen im humanen Modell, um mögliche Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien in der Behandlung von allergischen Erkrankungen zu finden. Dies ist die Grundlage eines der hintergründigen Ziele der vorliegenden Arbeit.

Aus den Voruntersuchungen war bekannt, dass die Immunzellen im murinen Modell einen Wechsel von einem  $T_H2$ -ähnlichen zu einem  $T_H1$ -ähnlichen Zytokinmuster vollziehen und dabei regulatorische T Zellen entstehen. Die zugrundeliegende Fragestellung der Versuche mit humanen Leukozyten war, ob sie entsprechend den murinen Immunzellen auf HKL reagieren. Als humane Zellen wurden PBMCs von Atopikern und gesunden Kontrollpersonen verwendet. Die Allergie der Atopiker richtete sich gegen Pollen von Lieschgras. Diese Gräserart ist ein Hauptauslöser des Heuschnupfens. Beide Zellpopulationen wurden *in vitro* mit verschiedenen Einheiten von Lieschgras inkubiert und die Leukozyten des Atopikers zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen von HKL versetzt.

Abb. 31 zeigt, dass die Anwesenheit von HKL einen deutlichen Effekt auf die Proliferationsrate der humanen PBMCs hat. Die Zellen der gesunden Kontrollperson haben, wie erwartet, unabhängig von den Einheiten des eingesetzten Lieschgrases, nahezu nicht proliferiert. Die PBMCs des Allergikers zeigen ohne den Zusatz von HKL eine starke Proliferation, die in Abhängigkeit höherer Lieschgras-Einheiten zunimmt. Mit dem Zusatz von hitzeinaktivierten Listerien nimmt die Proliferationsrate in Abhängigkeit von der Anzahl von Organismen ab.

Das humane System reagiert, ähnlich dem murinen Modell, auf die Anwesenheit von HKL mit einer Unterdrückung von Effektor T Zellen. Auch beim Menschen scheint die Anwesenheit von HKL die Induktion von regulatorischen T Zellen zu fördern.



**Abb. 31: HKL induziert im humanen Immunsystem eine Toleranz gegenüber Allergenen**

Die Proliferation humaner PBMCs eines Atopikers gegenüber Lieschgras und eines Non-Atopikers wurden über Ficoll-Zentrifugation isoliert und mit CFSE markiert. Bei der *in vitro* Restimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Lieschgras konnte bei dem Non-Atopiker keine Proliferation detektiert werden. Die Proliferation der PBMCs des Atopikers stieg in Abhängigkeit der Lieschgraskonzentration und konnte mit HKL abhängig von der Zahl der Organismen gehemmt werden.

## 5 DISKUSSION

Die Funktion des Immunsystems besteht im Schutz des Körpers vor Infektionen. Der Organismus ist in der Lage, wenn ein Erreger erfolgreich eliminiert werden konnte, diese Immunabwehr zu beenden und eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts gingen Forschergruppen von sogenannten Suppressor T Zellen aus, die fähig seien das Immunsystems zu unterdrücken (67, 68). Lange Zeit wurde deren Existenz aufgrund von nicht reproduzierbaren Daten und nicht verstandener Wirkungsmechanismen angezweifelt bis hin zur völligen Ablehnung und Diskreditierung der Theorie (136). Mit der Entdeckung der natürlichen regulatorischen T Zellen Mitte der 90er Jahre von Sakaguchi et al. waren die Zweifel widerlegt. Die Suppressor T Zelle wurde in regulatorische T Zelle umbenannt und ihre Existenz allgemein akzeptiert (173).

Eine Vielzahl verschiedener  $T_{reg}$  Zellen sind heute bekannt, die die immunologische Homöostase und die Selbst-Toleranz aufrechterhalten. Ein wichtiges Ziel der immunologischen Forschung ist es neue Therapieansätze über die Regulation von Immunantworten entwickeln zu können (131).

Der Wirkmechanismus von  $T_{reg}$  Zellen zur Umsetzung ihrer regulatorischen Funktion ist oft nur teilweise oder gar nicht bekannt. Zwei grundsätzliche Wege der Zellkommunikation sind der Zell-Zell-Kontakt über Oberflächenantigene und der para- und autokrine Mechanismus über Zytokine.

Die Gruppe um Shevach konnte zeigen, dass die natürlich vorkommenden  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$   $T_{reg}$  Zellen *in vitro* ihre unterdrückende Funktion über einen Zellkontakt-abhängigen und Zytokin-unabhängigen Mechanismus vermitteln. Der genaue biochemische Mechanismus ist jedoch nicht geklärt. Ebenso wenig erforscht ist der Wirkmechanismus dieser  $T_{reg}$  Zellen *in vivo* (181).

Ein Beispiel für eine zytokinvermittelte Hemmung regulatorischer T Zellen konnte von Roncarlo et al. gezeigt werden. IL-10 sezernierende  $T_{R1}$  Zellen hemmen antigen-spezifische Effektor T Zellen über die Sekretion der Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  (169).

In dieser Arbeit sollte zunächst der Mechanismus der  $T_{H1}$ -ähnlichen  $T_{reg}$  Zellen näher bestimmt und analysiert werden. Die erste Arbeitshypothese besagt, dass für die supprimierende Funktion der  $T_{H1}$ -ähnlichen  $T_{reg}$  Zellen *in vitro* auf naive  $CD4^+$  T Zellen ein direkter Zellkontakt erforderlich ist.

### 5.1 Entdeckung der T<sub>H</sub>1 ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen

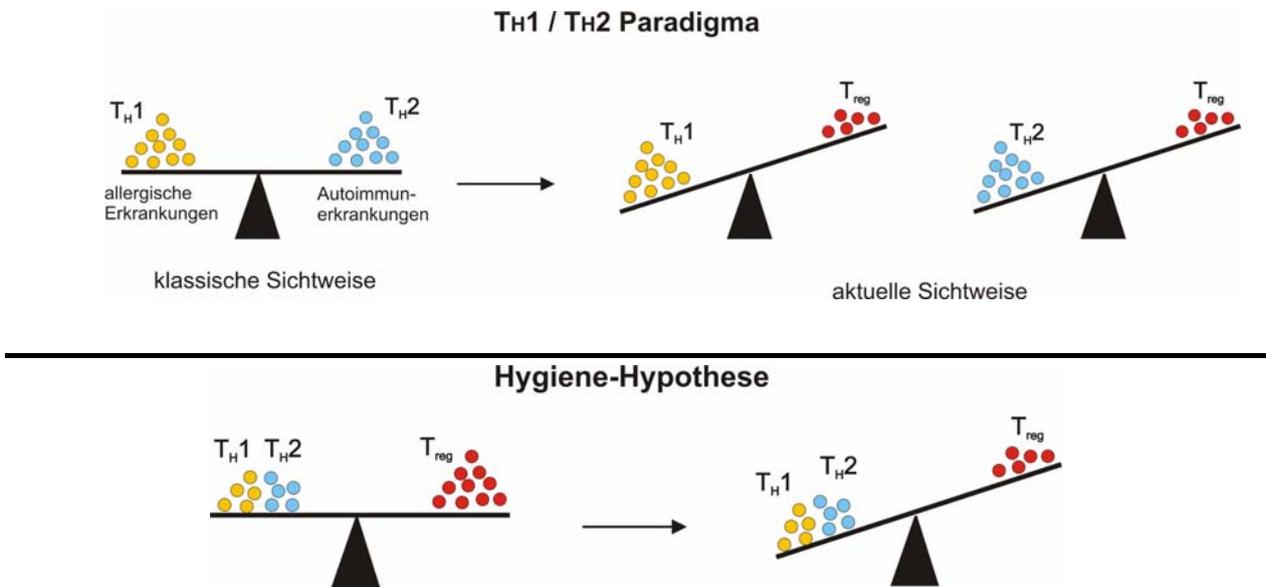
Der in den ersten beiden Versuchen dargestellte Wechsel von einer bereits bestehenden T<sub>H</sub>2-dominanten Immunantwort zu einem T<sub>H</sub>1-dominantem Zytokinmuster bei der Immunisierung mit HKL als Immunadjuvans deutet auf den dichotomen Charakter von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 hin, wie ihn als erstes T. R. Mosmann und R. L. Coffman 1989 beschrieben haben (140). Darauf gründete die Annahme, dass man eine T<sub>H</sub>2-dominante Erkrankung wie Allergie und Asthma durch die Unterdrückung dieser Immunantwort über die Induktion der T<sub>H</sub>1-dominanten Immunantwort therapieren könne (77, 220).

Die Arbeitsgruppe um D. T. Umetsu konnte jedoch zeigen, dass die Mechanismen zur Unterdrückung der T<sub>H</sub>2 dominanten Immunantwort nicht auf das Vorhandensein von T<sub>H</sub>1 Zellen zurückzuführen sind. Der Versuch in einem murinen Modell für Asthma, eine durch T<sub>H</sub>2 Zellen hervorgerufene Hyperreagibilität des Bronchialsystems durch T<sub>H</sub>1-Zellen auszugleichen, schlug fehl (76). Es kam sogar zu dem gegenteiligen Effekt, dass die Atemwegsentzündung und Hyperreagibilität des Bronchialsystems unter Einfluss von T<sub>H</sub>1-Zellen exazerbierten (76, 162). Die T<sub>H</sub>1 Zelle ist, wie die T<sub>H</sub>2 Zelle, pro-inflammatorisch.

Ebenfalls gegen diese einfache Dichotomie von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 sprechen Beobachtungen von J.-F. Bach. Er verglich die Epidemiologie von Infektionskrankheiten, Autoimmunkrankheiten und allergischen Erkrankungen in den letzten fünf Dekaden des letzten Jahrhunderts. Während die Rate an Infektionskrankheiten deutlich abgenommen hatte, waren die Inzidenz von Autoimmun- und allergischen Erkrankungen gestiegen (17).

Die Zunahme der immunologischen Erkrankungen und die Abnahme der Infektionskrankheiten lassen sich mit der Hygiene-Hypothese gut nachvollziehen. Während in den Industriestaaten die Menschen sich am Anfang des letzten Jahrhunderts noch sehr oft mit Infektionserregern auseinandersetzen mussten, hat dies in den letzten Jahrzehnten durch verstärkte Hygienemaßnahmen deutlich abgenommen. Die Zunahme der allergischen Erkrankungen sei auf die „Unterforderung“ des Immunsystems zurückzuführen. Die parallele Zunahme der Autoimmunerkrankungen steht nicht im Gegensatz zu der Hygiene-Hypothese wohl aber zum T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2-Paradigma. Autoimmunkrankheiten entstehen durch einen Überschuss an T<sub>H</sub>1 Zellen und allergische Erkrankungen zeigen eine überschießende Reaktion der T<sub>H</sub>2 Zellen. Da beide Krankheitsgruppen in der Bevölkerung zunehmen, spricht das gegen die wechselseitige Ausbalancierung der beiden Zellpopulationen. Nach der Theorie der T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Dichotomie müsste bei der Zunahme einer Krankheitsgruppe die andere reflektorisch abnehmen. Es scheint,

als ob die Regulation von  $T_{H1}$  als auch  $T_{H2}$  gestört wäre und so beide Krankheitsformen als Folge zunehmen. Das  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  Paradigma ist komplexer als ursprünglich angenommen und lässt nicht den Rückschluss zu, dass „ $T_{H1}$  gleich anti- $T_{H2}$  und umgekehrt“ sei.



**Abb. 32: Gegenüberstellung der Hygiene-Hypothese und des  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  Paradigmas**

Die Hygiene-Hypothese besagt, dass die Abnahme von Infektionskrankheiten in der Bevölkerung eine Zunahme von allergischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen bedingt. Dies beruht auf Beobachtungen der letzten Jahrzehnte, steht jedoch im Widerspruch zum klassischen  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  Paradigma. Eine gleichzeitige Zunahme beider Erkrankungen kann dieses Paradigma nicht erklären. Bezieht man die Existenz regulatorischer T Zellen mit ein, ist eine erweiterte Sichtweise der Zusammenhänge möglich, die zum Verständnis entscheidend beitragen kann.

Die erste Annahme, dass der Zytokinwechsel bei der Applikation von HKL auf den dichotomen Charakter von  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  zurückzuführen ist, konnte widerlegt werden. Eine  $T_{H2}$  dominante Erkrankung wie Asthma kann nicht durch die Induktion einer  $T_{H1}$  dominanten Immunantwort therapiert werden. Die Arbeitsgruppe Umetsu konnte zeigen, dass eine weitere pro-inflammatorische Effektor T Zelle, in diesem Fall die  $T_{H1}$  Zelle, zur Exazerbation führt und nicht zum Abklingen der Entzündungsreaktion (76).

HKL muss einen weiteren Mechanismus zur Unterdrückung einer bestehenden  $T_{H2}$  Immunantwort auslösen. Dieser wurde mit der Entdeckung der  $T_{H1}$  ähnlichen  $T_{reg}$  Zellen entschlüsselt (184). Die immunologische Reaktion, hier die Hyperreagibilität des Bronchialsystems, wird von einer regulatorischen T Zelle unterdrückt.

Warum eine derartige immunologische Reaktion nach Applikation von HKL eintritt, ist noch nicht geklärt. Es könnten  $T_{H1}$ -ähnliche  $T_{reg}$  Zellen induziert werden, um die normalerweise heftige, durch Listerien ausgelöste  $T_{H1}$ -Antwort abzuschwächen (184).

## 5.2 Funktionsweise T<sub>H1</sub>-ähnlicher T<sub>reg</sub> Zellen – direkter Zellkontakt oder Zytokine?

### 5.2.1 Die Bedeutung der Proliferationsrate der Effektor T Zellen und die Rolle der Zytokine IL-10 und INF- $\gamma$ für die Funktionsweise T<sub>H1</sub>-ähnlicher T<sub>reg</sub> Zellen

Die erste Hypothese dieser Arbeit postuliert einen direkten Zellkontakt für den inhibitorischen Effekt von T<sub>reg</sub> Zellen auf ehemals naive CD4<sup>+</sup> T Zellen *in vitro*. Diese Annahme konnte durch die Analyse der Proliferationsrate bestätigt werden. Es zeigte sich eine Abnahme der Proliferation von Effektor T Zellen in der Co-Kultur ohne Zellkultur-Einsätze, also bei direktem Zellkontakt. Die Ergebnisse der Zytokin-ELISA von IL-10 und IFN- $\gamma$  deuten in dieselbe Richtung. Es wurde bei beiden Botenstoffen keine Differenz der Zytokinkonzentration zwischen T<sub>reg</sub> Zellen und der Kontrollgruppe gefunden. Sie scheinen nicht wesentlich zur Funktion der T<sub>H1</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen beizutragen.

Bereits 1998 konnte an den natürlichen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen gezeigt werden, dass sich die Funktion von T<sub>reg</sub> Zellen auf Effektor T Zellen durch eine Separation mit Zellkultur-Einsätzen unterdrücken lässt. Eine verminderte Proliferationsrate der Effektor T Zellen konnte jeweils nur bei direktem Zellkontakt zu den T<sub>reg</sub> Zellen nachgewiesen werden (192, 193). Diese Arbeit konnte nun zeigen, dass auch adaptive T<sub>reg</sub> Zellen (speziell T<sub>H1</sub>-ähnliche T<sub>reg</sub> Zellen) für ihre inhibitorische Funktion auf räumliche Nähe zu Effektor T Zellen angewiesen sind.

Die T<sub>H1</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen sind durch die Produktion von IL-10 und IFN- $\gamma$  charakterisiert (184). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob diese T<sub>reg</sub> Zellen über IL-10 und / oder IFN- $\gamma$  ihr inhibitorisches Potenzial gegenüber einer bestehenden T<sub>H2</sub> Immunantwort und einer Allergen-induzierten AHR ausüben.

Das Zytokin IL-10 gilt in erster Linie als ein immunsuppressives Zytokin. Für den protektiven Charakter dieses Zytokins spricht, dass es häufig von regulatorischen T Zellen gebildet wird, wie beispielsweise den T<sub>R1</sub> Zellen, T<sub>H3</sub> Zellen und den natürlichen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen (14, 41, 73). Eine entscheidende suppressive Funktion von IL-10 konnte von T<sub>R1</sub> Zellen im Mausmodell von T<sub>H1</sub>-vermittelter Colitis gezeigt werden (16,). Auch bei dem Wirkmechanismus der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen ist die IL-10 Produktion als ein wichtiger suppressiver Faktor identifiziert worden (12). Es gibt jedoch Untersuchungen, die IL-10 auch aktivierende Eigenschaften zusprechen, zum Beispiel auf zytotoxische CD8<sup>+</sup> T Zellen (74, 171). Es galt anfänglich als ein T<sub>H2</sub>-Zytokin und als Gegenspieler zu T<sub>H1</sub>, indem es die Produktion von T<sub>H1</sub>-Zytokinen unterdrücke (42, 137). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass neben T<sub>H2</sub> Zellen auch T<sub>H1</sub> Zellen, Makrophagen oder DCs das Zytokin IL-10 produzieren (19, 138).

Das klassische  $T_H1$  Zytokin  $IFN-\gamma$  wäre als Gegenspieler zu einer  $T_H2$  Immunantwort gut vorstellbar. Jedoch hat auch dieses Zytokin sehr ambivalente Eigenschaften. Ursprünglich als pro-inflammatorisches Zytokin angesehen und dabei an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt, werden ihm mittlerweile auch protektive Eigenschaften zugeschrieben (170). Diese Protektion gilt nicht nur bei  $T_H2$  vermittelten Immunantworten, sondern auch bei  $T_H1$  gewichteten Erkrankungen. Man nimmt sogar an, dass  $IFN-\gamma$  selbst-limitierend ist und über ein autokrin negatives Feedback auf  $T_H1$  Zellen wirkt (54). Die Aufrechterhaltung der Homeostase durch  $T_H1$ -ähnliche  $T_{reg}$  Zellen bei einer  $T_H2$  gewichteten Immunantwort ist jedoch unabhängig von der  $IFN-\gamma$  Produktion.

Die Funktionsweise  $T_H1$ -ähnlicher  $T_{reg}$  Zellen scheint unabhängig von beiden Zytokinen zu sein, da kein Unterschied zwischen der An- oder Abwesenheit der  $T_{reg}$  Zellen besteht. Diese Beobachtungen lassen verschiedene Schlussfolgerungen zu. Die  $IL-10$  und  $IFN-\gamma$  Produktion kann alleine für die Induktion der  $T_H1$ -ähnlichen  $T_{reg}$  Zellen von Bedeutung sein und nicht für ihre Funktion in der Effektorphase. Zum anderen wurden die Zytokine in der Differenzierungsphase (Priming Phase) intrazellulär nachgewiesen und die Versuche fanden *in vivo* statt (184), während die aktuellen Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen stammen und die Zytokine in den Überständen gemessen wurden. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass Immunzellen *in vivo* und *in vitro* ein unterschiedliches Verhalten zeigen und besonders in Bezug auf  $IL-10$  sind sehr unterschiedliche Ergebnisse bekannt (109).

### **5.2.3. Der Einfluss der Zytokine $TGF-\beta$ und $IL-2$ auf die Funktionsweise $T_H1$ -ähnlicher $T_{reg}$ Zellen**

Die Untersuchungen beider Zytokine waren von großem Interesse, da  $TGF-\beta$  ein regulatorisches Zytokin ist, das in engem Zusammenhang mit Immunsuppression steht und  $IL-2$  den wichtigsten Wachstumsfaktor für T Zellen darstellt (69, 172, 175, 209). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass  $T_H1$ -ähnliche regulatorische T Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration beider Zytokine haben. Die Validität der ersten Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass der direkte Zellkontakt zu Effektor T Zellen von entscheidender Bedeutung für die Funktion  $T_H1$ -ähnlicher regulatorischer T Zellen ist, wird durch diese Ergebnisse in Frage gestellt. Es bedarf einer genauen Betrachtung der beiden Zytokine und speziell ihrer Bedeutung für regulatorische T Zellen.

Die Datenlage von TGF- $\beta$  in der Immunologie ist durchaus heterogen und lässt Fragen offen. Im Jahr 1986 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass TGF- $\beta$  von Immunzellen produziert wird und eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von humanen T Lymphozyten besitzt (104). Die hemmende immunmodulierende Wirkung von TGF- $\beta$  auf T-Zell-vermittelte Immunantworten und Autoimmunprozesse, und damit auf die Immuntoleranz, konnte in vielen Untersuchungen bestätigt werden (115, 117). Die Fehlfunktion dieses Zytokins führt zu unkontrollierter T Zell Proliferation und massiven letalen Autoimmunprozessen in fast allen Geweben. Dies konnte an transgenen Mäusen mit defektem TGF- $\beta$ -Rezeptor bzw. Mäusen mit mutiertem TGF- $\beta$ -Gen gezeigt werden (70, 182). Es deutet auf den protektiven Charakter dieses Zytokins hin und speziell darauf, dass TGF- $\beta$  auf der Ebene der zellulären Immunologie in der Lage ist T Zellen zu supprimieren. TGF- $\beta$  kann die Differenzierung der beiden Effektorzellen  $T_H1$  und  $T_H2$  inhibieren und besitzt damit eindeutig immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften (82, 121). Untersuchungen  $CD8^+$  zytotoxischer T Zellen konnten zeigen, dass nicht Differenzierung oder Proliferation supprimiert wurden, sondern  $T_{reg}$  Zellen über das TGF- $\beta$  die Degranulation zytotoxischer Substanzen von  $CD8^+$  T Zellen unterdrücken (131). Dies deutet auf ein breites Spektrum verschiedener Möglichkeiten und Zeitpunkte, wie und wann  $T_{reg}$  Zellen agieren.

Allgemein werden viele Eigenschaften des TGF- $\beta$  auch regulatorischen T Zellen zugeschrieben. Die Ergebnisse der Zytokinüberstände mittels ELISA bei der Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen ergaben deutlich höhere Werte von TGF- $\beta$  bei Anwesenheit von  $T_{reg}$  Zellen als in der Positivkontrolle ohne  $T_{reg}$  Zellen. Ein Erklärungsansatz für diesen Unterschied ist, dass  $T_H1$  ähnliche regulatorische T Zellen selbst in der Lage sind TGF- $\beta$  zu produzieren. Sie entfalten darüber ihre Fähigkeiten eine pathologische Immunantwort zu unterdrücken, um so vor allergischen Erkrankungen und Asthma zu schützen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene  $T_{reg}$  Zellen das Zytokin TGF- $\beta$  produzieren und darüber vermutlich eine periphere Toleranz induzieren. Zu ihnen gehören die  $Tr1$  Zellen, die  $T_H3$  Zellen und die natürlichen regulatorischen  $CD4^+CD25^+$  Zellen, die in der Lage sind, TGF- $\beta$  zu exprimieren (116, 163, 212). Die Arbeitsgruppe Umetsu konnte in einem murinen Asthma-Modell zeigen, dass TGF- $\beta$  produzierende Zellen eine AHR und eine Entzündungsreaktion im Lungengewebe unterdrücken kann. Es blieb jedoch offen, welche Zelle für die Produktion dieses Zytokins verantwortlich ist (78). Andere Untersuchungen haben ergeben, dass *in vitro* die Unterdrückung der Proliferation von Effektor T Zellen durch natürliche  $T_{reg}$  Zellen von einer

Zell-Zell-Interaktion abhängt und unabhängig von Zytokinen ist (192, 193). Die Behandlung mit TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörpern zeigte in einem murinen Modell für Autoimmun-Gastritis keinen Effekt auf die Funktion von T<sub>reg</sub> Zellen (157). Dagegen wurden in einem murinen Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen von Powrie et al. die suppressiven Eigenschaften der T<sub>reg</sub> Zellen durch Anti-TGF- $\beta$ -Antikörper unterdrückt (161). Dabei scheint nicht von Bedeutung zu sein, ob TGF- $\beta$  von den T<sub>reg</sub> Zellen selbst exprimiert wird. Die Anwesenheit des Zytokins ist wichtig (50). Versuche konnten zeigen, dass natürliche T<sub>reg</sub> Zellen, die selbst nicht mehr in der Lage sind TGF- $\beta$  zu produzieren (TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäuse), ihre volle suppressive Wirkung auf Effektor T Zellen ausüben können. In diesem Colitis-Modell zeigte eine Blockade des TGF- $\beta$  eine deutliche Verschlechterung der Entzündungsreaktion im Darm. Das TGF- $\beta$  hat also auch hier suppressive Eigenschaften, auch wenn es nicht direkt von T<sub>reg</sub> Zellen stammt. Ein Erklärungsversuch hierfür liegt in der Annahme, dass T<sub>reg</sub> Zellen die Produktion von TGF- $\beta$  in andere Zellen induzieren können (110). Bei der Analyse der Funktionsweise der T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen T Zellen im Rahmen dieser Arbeit kann nicht definitiv geklärt werden, welche Zellen das TGF- $\beta$  letztendlich produzieren. Als Möglichkeiten bleiben die T<sub>reg</sub> Zellen, die Effektor T Zellen oder die DCs. Eine experimentelle Untersuchung, um herauszufinden, welche Zellen TGF- $\beta$  produzieren, wäre die intrazelluläre Anfärbung dieses Zytokins während der Effektorphase und anschließende Analyse im Durchflusszytometer.

Für die Produktion von TGF- $\beta$  der T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen T Zellen spricht die Entdeckung von zellgebundenem TGF- $\beta$ . Die Arbeitsgruppe Strober konnte zeigen, dass zellgebundenes TGF- $\beta$  von regulatorischen T Zellen auf der Oberfläche präsentiert wird (142, 143). Dies würde bedeuten, dass neben dem direkten Zellkontakt auch die Anwesenheit des Zytokins TGF- $\beta$  eine Voraussetzung dafür ist, dass T<sub>H</sub>1-ähnliche regulatorische T Zellen eine Effektorzelle erfolgreich unterdrücken können. Bei einer Trennung mit Transwell würde eine suppressive Wirkung unterbleiben, obwohl TGF- $\beta$  sezerniert wird.

Die besondere Bedeutung von TGF- $\beta$  für T<sub>reg</sub> Zellen wurde mit der Entdeckung unterstrichen, dass TGF- $\beta$  die Foxp3 Expression in naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen induziert und sich ein Wechsel zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen vollzieht (40, 62, 210). Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch von T<sub>reg</sub> Zellen exprimiert wird. Er ist für die Entstehung und Funktion dieser Zellen von entscheidender Bedeutung und unterscheidet sie damit von Effektor T Zellen (88, 57). Auch die hier untersuchten T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen T Zellen exprimieren Foxp3 (184).

Bei der Ausdifferenzierung der erst kürzlich entdeckten  $T_H17$  Zellen ist der molekulare Mechanismus ebenfalls von TGF- $\beta$  abhängig (80, 200). Es wird eine Dichotomie zwischen der Differenzierung von  $T_{reg}$  Zellen und  $T_H17$  Zellen angenommen, ähnlich der Dichotomie zwischen  $T_H1$  und  $T_H2$ . Die *in vitro* Stimulierung naiver T Zellen mit TGF- $\beta$  induziert Foxp3<sup>+</sup>  $T_{reg}$  Zellen. Der Zusatz von IL-6 bei der *in vitro* Stimulierung naiver T Zellen fördert die Differenzierung von  $T_H17$  Zellen (28). Die hohen Werte von TGF- $\beta$  in den Zytokinüberständen der Ansätze mit  $T_{reg}$  Zellen stehen in Übereinstimmung mit dieser Theorie und zeigen den deutlichen Charakter einer  $T_{reg}$  gewichteten Immunantwort. Die Annahme einer Dichotomie wird durch die Entdeckung, dass IL-2 die Differenzierung Richtung  $T_{reg}$  Zellen lenkt und die der  $T_H17$  Zellen unterdrückt, unterstrichen (113). Eine Erklärung der extrem niedrigen IL-2 Werte in Anwesenheit regulatorischer T Zellen liefert die Theorie der Dichotomie zwischen  $T_{reg}$  Zellen und  $T_H17$  Zellen hingegen nicht.

Interleukin-2 wurde als erstes Zytokin beschrieben und stellt einen bedeutenden Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Zellen dar (69, 175). Unter ihnen insbesondere die  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen, auf die das Zytokin autokrin wirkt, und die Proliferation sowie eine weitere IL-2 Sekretion dieser Zellen anregt. Die Effektor T Zellen stehen in Abhängigkeit von IL-2. Der Wettbewerb um diese Ressource stellt neben direktem Zellkontakt und Zytokinen einen weiteren Wirkmechanismus dar (20, 187). Die Arbeitsgruppe Stockinger hat gezeigt, dass IL-2 von  $T_{reg}$  Zellen regelrecht „konsumiert“ wird und darüber die  $T_{reg}$  Zellen ihre supprimierenden Eigenschaften umsetzen (21). Der Mechanismus wird so verstanden, dass von den  $T_{reg}$  Zellen das IL-2 verbraucht wird und somit nicht mehr den Effektor T Zellen zur Verfügung steht. Die Konkurrenz um IL-2 der  $T_{reg}$  Zellen bewirkt in den Effektor T Zellen eine Unterbrechung des positiven autokrinen Feedbacks von IL-2. Es kommt nicht zur Hochregulierung von CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) und damit nicht zur vollen Effektivität dieser Zellen. Dies führt zu einer verminderten Proliferationsrate der Effektor T Zellen und damit zur Unterdrückung einer bestehenden Immunantwort.

Regulatorische T Zellen sind selbst nicht in der Lage IL-2 zu exprimieren, jedoch wird die Differenzierung, Vitalität und Funktion von  $T_{reg}$  Zellen über IL-2 gesteuert. Sie sind auf die Bereitstellung dieses Zytokins von anderen Zellen angewiesen (63, 153, 181). Knock-out Mäuse für IL-2 und CD25 entwickeln systemische Autoimmunerkrankungen, die charakteristisch für eine reduzierte Anzahl von  $T_{reg}$  Zellen sind (31, 125, 153, 189). Alle drei Proteinketten des IL-2-Rezeptors werden auf  $T_{reg}$  Zellen konstitutiv exprimiert und ermöglichen den Zellen ohne

weitere Aktivierung auf IL-2 zu reagieren (45, 125). Die Expression von CD25 wird in T<sub>reg</sub> Zellen über IL-2 verstärkt (183)

In dieser Arbeit deuten die Ergebnisse der Analyse des Zytokins IL-2 in den Überständen der Co-Kultur darauf hin, dass die Konkurrenz um IL-2 ein Wirkmechanismus der T<sub>H1</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen sein könnte. In den Zytokinüberständen der Zellkultur mit Zusatz von T<sub>reg</sub> Zellen war eine massive Reduktion des Zytokins IL-2 zu detektieren, während in der Kontrollgruppe ohne T<sub>reg</sub> Zellen sehr hohe Werte von IL-2 gemessen wurden. Die Vermutung, dass die T<sub>reg</sub> Zellen das IL-2 tatsächlich aktiv reduzieren müsste weiter experimentell validiert werden. Ein Ansatz wäre eine feste Anfangskonzentration von IL-2 und variierende Zellzahlen der eingesetzten T<sub>H1</sub>-ähnlichen T<sub>reg</sub> Zellen in der Zellkultur, um eine eventuelle Abhängigkeit der IL-2 Konzentration nach Inkubation von der eingesetzten Zellzahl der T<sub>reg</sub> Zellen detektieren zu können.

Die signifikanten Unterschiede der Zytokinkonzentrationen von TGF- $\beta$  und IL-2 zeigen, dass es sich um einen aktiven Prozess handelt, die die Homöostase der Immunantwort aufrecht erhält und nicht Anergie für die Unterdrückung der Proliferation der Effektor T Zellen verantwortlich ist (188). Beide Zytokine scheinen an dem Mechanismus der Funktionsweise regulatorischer T Zellen beteiligt zu sein, es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob sie unabhängig von einander agieren, oder das Zusammenspiel beider Botenstoffe eine Voraussetzung für ihre supprimierenden Eigenschaften ist (89).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass T<sub>H1</sub>-ähnliche T<sub>reg</sub> Zellen ihren Einfluss auf die Effektor T Zellen in einer Kombination aus direktem Zell-Kontakt und der Kommunikation über Zytokine ausüben.

### **5.3 Pharmakologische Unterdrückung der mukosalen Toleranzentwicklung**

#### **5.3.1 Prednisolon und Methylprednisolon hemmen die Entwicklung einer T Zell Toleranz**

In der Behandlung allergischer Erkrankungen werden seit Jahrzehnten überwiegend Corticosteroide in der anti-inflammatorischen Therapie eingesetzt. Die effektive Unterdrückung einer Entzündung beruht auf deren inhibitorischem Einfluss an verschiedenen Stellen des Immunsystems. Corticosteroide hemmen die Zytokinproduktion ebenso wie Funktion, Differenzierung und Wachstum von verschiedenen inflammatorischen Zellen (60, 66, 97). Trotz des hervorragenden Wirkungsprofils und des schnellen, sichtbaren Erfolges sind der Therapie mit Corticosteroiden Grenzen gesetzt. Seit mehr als 50 Jahren werden diese immunsuppressiven

Medikamente in der Therapie von Allergie und Asthma eingesetzt, gleichzeitig ist die Prävalenz dieser Erkrankungen in den letzten drei Dekaden kontinuierlich gestiegen (206, 207). Sie stellen keine kurative Therapie dar. Nach Absetzen der Therapie treten die Symptome der entzündlichen Erkrankung, wie z.B. Asthma bronchiale, schnell wieder auf (3).

Eine mögliche Erklärung für die hohe Prävalenz allergischer Erkrankungen parallel zu Corticosteroidbehandlungen bieten die Untersuchungen des Einflusses von Dexamethason auf die Toleranzentwicklung. Die Arbeitsgruppe um D. T. Umetsu entwickelte ein Protokoll für ein murines Asthma-Modell bei dem über die intranasale Gabe von OVA eine respiratorische Toleranz induziert wird. Diese Toleranzinduktion kann eine Atemwegsentzündung effektiv unterdrücken und schützt vor einer überschießenden Immunreaktion bei erneuter Inhalation großer Mengen dieses Antigens. Dass eine respiratorische Toleranz vor Asthma schützt, konnte schon vorher in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (7, 180, 195).

Die Gabe von Dexamethason i.p. während der Induktion der respiratorischen Toleranz unterdrückt die protektive Toleranzentwicklung. Diese Suppression der mukosalen Toleranzentwicklung ist an der Proliferation der Effektor T Zellen in der *in vitro* Restimulation erkennbar und an dem Auftreten einer schweren AHR bei den mit Dexamethason behandelten Tieren. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Toleranz über tolerogene DCs vermittelt wird, die wiederum die T<sub>reg</sub> Zellen induzieren (4). Dexamethason hemmt bereits die Entstehung der Toleranz-induzierenden DCs. Konsekutiv kommt es zu einem Fehlen oder einer Fehlfunktion von T<sub>reg</sub> Zellen (185).

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob nur hochpotentes Dexamethason diese hemmenden Eigenschaften aufweist oder ob der Effekt auch bei schwächeren Corticosteroiden wie Methylprednisolon und Prednisolon auftritt. Beide Medikamente werden neben Dexamethason häufig in der Klinik eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die systemische Gabe von Prednisolon und Methylprednisolon, ebenso wie Dexamethason, die Toleranzentstehung unterdrückt. Damit konnte die zweite Hypothese dieser Arbeit, dass immunmodulatorische Substanzen die Induktion regulatorischer T Zellen unterdrücken, in Bezug auf weitere Corticosteroide bestätigt werden. Es ist anzunehmen, dass die Hemmung der respiratorischen Toleranzinduktion eine Nebenwirkung der gesamten Wirkstoffklasse ist. Corticosteroide hemmen effektiv die T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub> Immunantwort, jedoch auch die protektive Immunantwort der T<sub>reg</sub> Zellen. Eine Diskriminierung zwischen den einzelnen T Zellen bei der Behandlung mit Corticosteroiden ist nicht möglich. Dadurch kommt es zur Unterdrückung des natürlichen

Gegenspielers einer allergischen Entzündung ( $T_{reg}$  Zellen), ausgelöst durch eine überschießende  $T_H2$  Antwort.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten gegenteilige Ergebnisse zu denen dieser Arbeit. Corticosteroide können zusammen mit Vitamin D3 IL-10 produzierende  $T_R1$  Zellen induzieren (19). Die Bedeutung dieser  $T_{reg}$  Zellen liegt jedoch weniger in der Prävention von Asthma bronchiale als vielmehr in derjenigen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (202). Jedoch auch in der Patientengruppe der Asthmatiker konnte ein positiver Effekt von Corticosteroiden auf  $T_{reg}$  Zellen nachgewiesen werden. Die mit Corticosteroiden behandelten Patienten hatten eine erhöhte Expression von Foxp3 mRNA, was als erhöhte Aktivität der  $T_{reg}$  Zellen gedeutet wurde, wenn auch nur zweifach im Vergleich mit Asthmatikern, die nicht mit Corticosteroiden behandelt wurden. Auch die suppressiven Fähigkeiten Dexamethason-behandelter naiver T Zellen auf frisch isolierte  $CD4^+$  T Zellen waren nur schwach (99).

Die Ergebnisse im murinen Asthma-Modell dieser Arbeit zeigen, dass die pharmakologische Beeinflussung durch Corticosteroide auf die Entwicklung einer T Zell Toleranz eine deutliche Unterdrückung der respiratorischen Toleranzentwicklung hat und mit der kompletten Restitution der Proliferationsfähigkeit der Effektor T Zellen einhergeht. Auch auf der Ebene der Sensibilisierung konnte gezeigt werden, dass Corticosteroide keine schützende Funktion haben, sondern die Sensibilität gegenüber Antigenen steigern (215). Das hat bedeutende Auswirkungen auf den erneuten Kontakt mit dem Allergen, da folglich unter diesen Voraussetzungen eine noch stärkere  $T_H2$  Immunantwort zu erwarten ist. Die Sensibilitätssteigerung der  $T_H2$  Zellen unter Einfluss von Corticosteroiden konnte bereits an verschiedenen Mechanismen gezeigt werden. Diese Klasse von Pharmaka hat das Potenzial *in vivo* ebenso wie *in vitro* eine Steigerung der IgE Synthese zu bewirken (145). Auf der anderen Seite üben sie einen hemmenden Einfluss auf die IL-12 Sekretion aus und unterdrücken direkt eine  $T_H1$  Antwort (26, 134). Eine Langzeitstudie konnte zeigen, dass Kinder, die im ersten Lebensjahr mit Corticosteroiden behandelt werden, eine erhöhte Prävalenz haben, später Allergien oder Asthma zu entwickeln (59). Die Aktivität einer  $T_H2$  Immunantwort scheint durch die Applikation von Corticosteroiden verstärkt zu werden. Nach Absetzen der Therapie lassen die unterdrückenden Eigenschaften nach und die erhöhte  $T_H2$ -Sensibilität kommt zum Tragen. Die Ergebnisse der Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussung von Methylprednisolon und Prednisolon auf die respiratorische Toleranz zeigen außerdem, dass die  $T_{reg}$  Zellen effektiv und bereits auf der Ebene der DCs gehemmt werden. Dies bedeutet, dass eine Behandlung mit Corticosteroiden eine  $T_H2$  Antwort unterstützt, zusätzlich die  $T_{reg}$  Zellen hemmt und keinen kurativen Ansatz darstellt.

Die Möglichkeiten in der Behandlung von Allergie und Asthma sind jedoch begrenzt und Corticosteroide stellen bis heute die effektivste Therapieoption dar. Sie sind heute noch das Mittel der Wahl. Der Einsatz dieser Medikamentengruppe ist unbestritten erforderlich, jedoch in möglichst geringer Dosis und über den kürzestmöglichen Zeitraum.

### **5.3.2 Tacrolimus und Cyclosporin A unterdrücken ebenfalls die Entwicklung einer T Zell Toleranz**

In der Therapie von Allergie und Asthma kommen neben Corticosteroiden auch andere Immunsuppressiva zum Einsatz. Zu ihnen gehören die Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A (38, 152). Ursprünglich aus der Transplantationsmedizin stammend, wo sie bis heute eingesetzt werden (55). In den frühen 80er Jahren wurden die immunsuppressiven Eigenschaften von Cyclosporin A entdeckt und seit 1984 wird es in der Behandlung der Abstoßungsreaktion nach Transplantationen verwendet (32, 126, 213). Mit der Entdeckung von Tacrolimus erweiterte sich Ende der 80er Jahre das Spektrum der immunsuppressiven Therapie in der Transplantationschirurgie (108).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Calcineurininhibitoren entsprechend der Corticosteroide allgemein immunsuppressiv und dementsprechend nicht selektiv auf die  $T_H2$  Immunantwort wirken und die Induktion regulatorischer T Zellen unterdrücken. Die Ergebnisse der *in vitro* Restimulation mit OVA nach der Behandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A während der Toleranzinduktion bestätigen dies. Die Proliferation der  $CD4^+$  Effektor T Zellen fiel deutlich höher aus als die der Toleranzgruppe und lag im Bereich der Positivkontrolle bzw. darüber. Die respiratorische Toleranzentwicklung wird neben Corticosteroiden auch von anderen Immunsuppressiva unterdrückt.

Die immunmodulatorische Wirkung von Calcineurininhibitoren beruht auf der Supprimierung von T Zellen auf der Ebene der Transkription. Die verminderte Expression von Zytokinen, besonders von IL-2, hemmt die Proliferation und Ausdifferenzierung von T Zellen (44). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass Calcineurininhibitoren neben  $T_H$  Zellen auch auf  $T_{reg}$  Zellen wirken. Mit diesen neuen Erkenntnissen lassen sich eventuell Beobachtungen erklären, die bisher noch unverstanden sind. Das Neuaufreten einer allergischen Erkrankung nach Behandlung mit einem Calcineurininhibitor besonders in der pädiatrischen Transplantationsmedizin ist nicht geklärt (105). Es könnte in Zusammenhang mit der

allgemeinen Immunsuppression von Calcineurininhibitoren stehen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde.

1997 wurde zum ersten Mal das Neuauftreten einer Allergie nach Behandlung mit einem Calcineurininhibitor beschrieben. Es handelte sich um ein Kind mit lebensbedrohlicher Nahrungsmittelallergie nach Behandlung mit Tacrolimus bei Lebertransplantation (111). Weitere Berichte folgten und behandelten hauptsächlich Nahrungsmittelallergien nach Transplantation mit anschließender Tacrolimus-Therapie (15, 122, 144) Neben Nahrungsmittelallergien wurden auch allergische Erkrankungen wie die atopische Dermatitis oder das allergische Asthma bronchiale beobachtet und dies nicht nur nach Behandlung mit Tacrolimus, sondern auch nach einer Cyclosporin A Behandlung (13). Der Grund für die höhere Anzahl an bekannten Fällen nach Tacrolimusbehandlung als nach einer Behandlung mit Cyclosporin A liegt eventuell in der deutlich höheren Potenz der Wirksamkeit von Tacrolimus (13, 84). Die geschätzte Prävalenz des Auftretens einer allergischen Erkrankung nach Transplantation mit anschließender Behandlung mit einem Calcineurininhibitor schwankt zwischen 10 und 22% (15). Warum dieses Phänomen innerhalb der Transplantationsmedizin besonders häufig in der Pädiatrie beobachtet wird, ist nicht hinreichend geklärt. Eine Vermutung ist, dass das noch nicht vollständig ausgereifte Immunsystem im Kindesalter anfälliger auf Störeinflüsse reagiert (34, 64).

Für das Phänomen wurden verschiedene Erklärungsansätze aufgestellt. Es wurde beschrieben, dass die Erdnussallergie eines Spenders über die kombinierte Nieren-Leber-Transplantation an den Empfänger weitergegeben wurde (114). Die meisten Nahrungsmittelallergien nach Transplantation standen jedoch in Zusammenhang mit der Einnahme von Calcineurininhibitoren und weder Donor noch Rezipient hatten eine positive Familienanamnese für allergische Erkrankungen oder eine bestehende Allergie zum Zeitpunkt der Operation (13, 34, 91, 111, 122, 144, 151). Diese Beobachtungen und die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein Hinweis, dass es sich eventuell um eine Störung des Gleichgewichts im Immunsystem handelt, was durch die Behandlung mit Calcineurininhibitoren hervorgerufen wird. Durch die Unterdrückung von T Zellen könnte die Homöostase des Immunsystems gestört werden und es könnte zu einem Überwiegen der  $T_H2$  Antwort, also einer Allergie kommen. Dies wird durch die Beobachtung einer Eosinophilie und eines erhöhten Spiegels von spezifischem und totalem IgE im Serum von Patienten, die mit Calcineurininhibitoren behandelt wurden, unterstützt (71). Die Erklärung eines Ungleichgewichts zwischen  $T_H1$  und  $T_H2$  scheint vor dem Hintergrund der hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse zu einfach. Beide Medikamente können eine respiratorische Toleranz

unterdrücken, also die Induktion regulatorischer T Zellen hemmen und darüber eventuell die Homöostase des Immunsystems in Richtung  $T_H2$  Immunantwort lenken.

Hervorzuheben ist, dass besonders das infantile Immunsystem betroffen ist. Sind die kindlichen  $T_{reg}$  Zellen noch nicht ausgereift genug, um entsprechend auf eine Störung des Immunsystems durch immunmodulatorische Substanzen zu reagieren? Was macht die adulten  $T_{reg}$  Zellen überlegen gegenüber derartigen „Störungen“?  $T_{reg}$  Zellen scheinen sich im Laufe des Lebens zu entwickeln. Ihre „Evolution“ ist jedoch noch sehr wenig verstanden und untersucht. Die Abnahme allergischer Symptome in der Adoleszenz und die Erfolge einer Behandlung mit einer SIT sind vielleicht darauf zurückzuführen, dass sich das Immunsystem fortwährend neuen Gegebenheiten anpassen kann. Bei dieser Feineinstellung scheinen regulatorische T Zellen eine besondere Rolle zu spielen.

Aus den Untersuchungen der immunmodulatorischen Substanzen im Rahmen dieser Arbeit lässt sich klar erkennen, dass eine Unterdrückung des gesamten Immunsystems viele Nebenwirkungen birgt. Die Möglichkeit einer gezielte Hemmung von Effektor T Zellen ohne Unterdrückung der  $T_{reg}$  Zellen wird diskutiert (128, 168). Die Induktion von  $T_{reg}$  Zellen über eine SIT hat bei der Behandlung von Allergien Erfolge (135). Dies sind erfolgversprechende Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten, bei denen gezielt bestimmte Zellen des Immunsystems angesprochen werden und nicht das gesamte Immunsystem unterdrückt wird.

#### **5.4 Der Einfluss von HKL auf das humane Immunsystem**

Untersuchungen der Funktionsweise von  $T_{reg}$  Zellen und die Betrachtung der pharmakologischen Beeinflussung dieser Zellen zielen auf die Entwicklung neuer Therapiekonzepte von Krankheiten, die durch Fehlfunktionen dieser T Zellen ausgelöst werden. Dies betrifft ein weites Spektrum verschiedener Fachrichtungen in der Humanmedizin: die Allergologie und Pneumologie, aber auch die Rheumatologie, Neurologie, Onkologie oder die Transplantationschirurgie.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Krankheiten wie rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder dem Typ 1 Diabetes mellitus die Funktion regulatorischer T Zellen beeinträchtigt ist (49, 79, 119). Im Bereich der Allergologie wurde beobachtet, dass die Anzahl von  $T_{reg}$  Zellen im peripheren Blut von Atopikern deutlich niedriger ist als die von gesunden Kontrollpersonen (7, 83, 198). Dieser vermutete protektive Charakter der  $T_{reg}$  Zellen konnte auch an Personen gezeigt werden, die gegen ein Allergen sensibilisiert waren und nach anfänglichen allergischen Beschwerden Symptomfreiheit erlangt hatten. Kinder mit einer symptomatischen Allergie gegen

Kuhmilch hatten eine verminderte Anzahl an peripheren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen und eine gesteigerte Proliferationsrate von PBMCs im Gegensatz zu Kindern mit erlangter Symptomfreiheit nach anfänglichen Beschwerden einer Kuhmilchallergie (100).

Die Frage ist, was die Anzahl und die Funktion der T<sub>reg</sub> Zellen beeinflusst und was der entscheidende Unterschied zwischen gesundem Individuum und Atopiker ist. Ein Erklärungsansatz für die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen, besonders in den Industriestaaten, ist die Hygiene-Hypothese. Im Zuge der verbesserten Lebensqualität müsse sich der menschliche Organismus weniger mit Pathogenen auseinandersetzen und das Immunsystem sei dadurch nicht ausreichend gefordert. Dies führe dazu, dass das Immunsystem auch auf ungefährliche Stoffe reagiere.

Es existieren viele Studien, die diese Theorie unterstreichen. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass Kinder, die früh Kontakt mit Hunden oder Katzen hatten, eine niedrigere Prävalenz besitzen allergische Krankheiten zu entwickeln (150, 158). Kinder, die in ländlichen Gegenden aufwachsen, insbesondere mit direktem Kontakt zu Tieren, zeigen seltener eine Sensibilisierung gegenüber Allergenen als Kinder aus urbanen Lebensräumen (36, 106, 164, 165, 203). Von Mutius et al. konnte gezeigt werden, dass Kinder mit mehreren Geschwistern oder frühem Kindergartenbesuch eine geringere Prävalenz besitzen Allergien zu entwickeln (204, 205, 206). Die frühe Auseinandersetzung mit Pathogenen scheint ein präventiver Faktor in Bezug auf Allergien zu sein.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass besonders eine Infektion mit Parasiten vor Allergien schützt (218, 219). An 520 Schulkindern aus Gabun wurde der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *Schistosoma haematobium* und Atopie untersucht. Die Kinder mit chronischer Schistosomiasis hatten einen erhöhten IL-10 Spiegel (199). Wie bei einer allergischen Reaktion so überwiegt auch bei einer Infektion mit Parasiten die T<sub>H</sub>2 Immunantwort (51). Auf welche Art die Infektion mit Helminthen das Immunsystem beeinflusst, ist nicht sicher geklärt. Belkaid et al. gehen davon aus, dass Parasiten selber in der Lage sind T<sub>reg</sub> Zellen zu induzieren, um darüber eine schädigende Immunantwort zu unterdrücken und somit ihr Überleben im Wirt zu sichern (23, 24, 25). Eine vergleichbare Strategie wurde auch von dem Bakterium *Bordetella pertussis* beobachtet, das T<sub>reg</sub> Zellen sehr wahrscheinlich über DCs induzieren kann (130).

Auch die Infektion mit HKL unterdrückt eine allergische Reaktion und induziert T<sub>reg</sub> Zellen (184). Diese Beobachtungen wurden im murinen Modell gemacht. Die dritte Hypothese dieser

Arbeit ist, dass humane Immunzellen ähnlich den Zellen des murinen Immunsystems auf HKL reagieren. Die Untersuchungen der humanen PBMCs eines Atopikers gegenüber Lieschgras und einer gesunden Kontrollperson zeigten klare Unterschiede in der Restimulation mit dem Antigen *in vitro*. Die Proliferation der PBMCs des Non-Atopikers ist deutlich geringer als die des Atopikers und spricht auch nicht auf hohe Konzentrationen des Antigens Lieschgras an. Die Zugabe von HKL in die Zellkultur der PBMCs des Atopikers bewirkt in Abhängigkeit der Konzentration von HKL eine Unterdrückung der Proliferation dieser Zellen.

Die Immunisierung mit hitzeinaktivierten Bakterien würde eine relativ sichere Therapie gegen allergische Erkrankungen darstellen. Die hitzeinaktivierten Listerien sind nicht mehr infektiös, behalten jedoch ihre immunstimulierende Potenz. Dennoch ist nicht sicher abzuschätzen, was ein derartiger Eingriff in das menschliche Immunsystem bewirken könnte. Vorstellbar ist eine Beeinträchtigung der Abwehr von Infektionen oder das unkontrollierte Wachstum von Tumoren (85, 148).

Es gibt mehrere Versuche einer *in vivo* Aktivierung von  $T_{reg}$  Zellen. Oft wird jedoch direkt in die Kommunikation zwischen Zellen eingegriffen. Gezielt werden bestimmte Rezeptoren angesprochen, um damit bestimmte Signalwege zu aktivieren oder zu inhibieren. Mit HKL wird dem Immunsystem eine bakterielle Infektion simuliert, ähnlich einer aktiven Impfung mit einem Totimpfstoff.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Regulatorische T Zellen sind für die Induktion und Aufrechterhaltung einer immunologischen Toleranz gegenüber Antigenen essentiell. Diese Arbeit befasst sich mit der Bedeutung regulatorischer T Zellen in der Pathogenese von Allergie und Asthma. Das Verständnis ihrer Funktionsweise und ihrer pharmakologischen Beeinflussung können maßgeblich zur Therapie und Prävention allergischer Erkrankungen beitragen.

Der inhibitorische Effekt *in vivo* generierter regulatorischer T Zellen auf CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde *in vitro* untersucht. T<sub>H</sub>1-ähnliche regulatorische Zellen wurden über die Induktion tolerogener DCs mit HKL und unter Ausnutzung des murinen Immunsystems generiert. In Co-Kultur mit naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen, DCs und OVA wurden die T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen Zellen weiter analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass eine räumliche Trennung mit Transwell-Einsätzen die inhibitorischen Effekte der T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen Zellen aufhebt. Die Anwesenheit von T<sub>H</sub>1-ähnlichen regulatorischen Zellen führte zu keiner Veränderung der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$ , während die Zytokine IL-2 und TGF- $\beta$  deutliche Unterschiede zeigten. Der Anstieg von TGF- $\beta$  und der starke Abfall der Konzentration von IL-2 deuten auf einen Synergismus von Zellkontakt und parakrinen Vorgängen. Ob diese Zytokine (IL-2 und TGF- $\beta$ ) parakrin wirken können, ist abhängig von Signalweite und Zellabstand.

Der pharmakologische Einfluss immunmodulatorischer Substanzen auf die Induktion regulatorischer T Zellen wurde auch im murinen Modell analysiert. Eine experimentell induzierte respiratorische Toleranz wurde mit der i.n. Applikation von OVA bei BALB/c Mäusen erreicht. Durch die systemische Gabe von Prednisolon und Methylprednisolon wurde die Toleranzinduktion unterdrückt. Von Dexamethason ist bekannt, dass es unter vergleichbaren Bedingungen ebenfalls die Toleranzentwicklung hemmt. Daher ist anzunehmen, dass die gesamte Medikamentengruppe der Corticosteroide diese Eigenschaft besitzt. Diese Hypothese lässt sich auf eine weitere Gruppe von Immunsuppressiva erweitern, da auch für die Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A eine Hemmung der immunologischen Toleranzinduktion in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die immunmodulatorischen Fähigkeiten des Adjuvans HKL waren aus dem murinen Modell bekannt. Es konnte hier gezeigt werden, dass HKL auch im humanen Immunsystem eine Toleranz gegenüber Allergenen induziert. Die Proliferation humaner PBMCs eines Atopikers

konnte durch den Zusatz von HKL bei der *in vitro* Restimulation mit dem Allergen Lieschgras auf das Niveau eines Non-Atopikers gehemmt werden.

Die Daten zeigen, dass regulatorische T Zellen pharmakologisch beeinflusst werden können. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten zu kurativen Therapiekonzepten allergischer Erkrankungen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. 1978. [Münchener Medizinische Wochenschrift/24 July 1906: Allergy by Clemens v. Pirquet, Vienna]. *MMW.Munch.Med.Wochenschr.* 120:474.
2. 1998. Forecasted state-specific estimates of self-reported asthma prevalence--United States, 1998. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* 47:1022-1025.
3. 2000. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N.Engl.J.Med.* 343:1054-1063.
4. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat.Immunol.* 2:725-731.
5. Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat.Med.* 8:1024-1032.
6. Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2003. Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130:108-118.
7. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J.Exp.Med.* 199:1567-1575.
8. Akdis, M., K. Blaser, and C. A. Akdis. 2005. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:961-968.
9. Akdis, M. 2006. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr.Opin.Immunol.* 18:738-744.
10. Akdis, M. and C. A. Akdis. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119:780-791.
11. Akdis, M. 2009. Immune tolerance in allergy. *Curr.Opin.Immunol.* 21:700-707.
12. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T. C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J.Immunol.* 166:3008-3018.
13. Arikian, C., M. Kilic, Y. Tokat, and S. Aydogdu. 2003. Allergic disease after pediatric liver transplantation with systemic tacrolimus and cyclosporine a therapy. *Transplant.Proc.* 35:3039-3041.
14. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J.Exp.Med.* 184:387-396.

15. Asante-Korang, A., G. J. Boyle, S. A. Webber, S. A. Miller, and F. J. Fricker. 1996. Experience of FK506 immune suppression in pediatric heart transplantation: a study of long-term adverse effects. *J.Heart Lung Transplant.* 15:415-422.
16. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 190:995-1004.
17. Bach, J. F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347:911-920.
18. Barnes, P. J., S. Pedersen, and W. W. Busse. 1998. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:S1-53.
19. Barrat, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. Waal-Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J.Exp.Med.* 195:603-616.
20. Barthlott, T., G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2003. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J.Exp.Med.* 197:451-460.
21. Barthlott, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. J. Atkins, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2005. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int.Immunol.* 17:279-288.
22. Beasley, R., J. Crane, C. K. Lai, and N. Pearce. 2000. Prevalence and etiology of asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105:S466-S472.
23. Belkaid, Y. and B. T. Rouse. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat.Immunol.* 6:353-360.
24. Belkaid, Y., R. B. Blank, and I. Suffia. 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol.Rev.* 212:287-300.
25. Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat.Rev.Immunol.* 7:875-888.
26. Bellinghausen, I., U. Brand, K. Steinbrink, A. H. Enk, J. Knop, and J. Saloga. 2001. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108:242-249.
27. Bentley, A. M., Q. Hamid, D. S. Robinson, E. Schotman, Q. Meng, B. Assoufi, A. B. Kay, and S. R. Durham. 1996. Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:551-556.
28. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
29. Bliss, J., C. Van, V. K. Murray, A. Wiencis, M. Ketchum, R. Maylor, T. Haire, C. Resmini, A. K. Abbas, and S. F. Wolf. 1996. IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. *J.Immunol.* 156:887-894.

30. Blotta, M. H., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1997. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *J.Immunol.* 158:5589-5595.
31. Bluestone, J. A. and A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 3:253-257.
32. Borel, J. F. 1980. Immunosuppressive properties of cyclosporin A (CY-A). *Transplant.Proc.* 12:233.
33. Bourgeois, C. and B. Stockinger. 2006. T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunol.Lett.* 107:89-92.
34. Boyle, R. J., W. Hardikar, and M. L. Tang. 2005. The development of food allergy after liver transplantation. *Liver Transpl.* 11:326-330.
35. Boyum, A. 1968. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 97:31-50.
36. Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, L. Grize, U. Neu, F. H. Sennhauser, H. S. Varonier, J. C. Vuille, and B. Wuthrich. 1999. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin.Exp.Allergy* 29:28-34.
37. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 27:68-73.
38. Camp, R. D., S. Reitamo, P. S. Friedmann, V. Ho, and F. Heule. 1993. Cyclosporin A in severe, therapy-resistant atopic dermatitis: report of an international workshop, April 1993. *Br.J.Dermatol.* 129:217-220.
39. Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A. M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J.Clin.Invest* 106:R75-R81.
40. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>. *J.Exp.Med.* 198:1875-1886.
41. Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
42. Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, K. D. Brown, and T. R. Mosmann. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J.Exp.Med.* 166:1229-1244.
43. Coffman, R. L. 2006. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat.Immunol.* 7:539-541.
44. Cronin, D. C., T. W. Faust, L. Brady, H. Conjeevaram, S. Jain, P. Gupta, and J. M. Millis. 2000. Modern immunosuppression. *Clin.Liver Dis.* 4:619-55, ix.

45. de la, R. M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J.Immunol.* 34:2480-2488.
46. DeKruyff, R. H., T. Turner, J. S. Abrams, M. A. Palladino, Jr., and D. T. Umetsu. 1989. Induction of human IgE synthesis by CD4+ T cell clones. Requirement for interleukin 4 and low molecular weight B cell growth factor. *J.Exp.Med.* 170:1477-1493.
47. DeKruyff, R. H., Y. Fang, and D. T. Umetsu. 1998. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J.Immunol.* 160:2231-2237.
48. Durham, S. R., S. M. Walker, E. M. Varga, M. R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S. J. Till, Q. A. Hamid, and K. T. Nouri-Aria. 1999. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N.Engl.J.Med.* 341:468-475.
49. Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med.* 200:277-285.
50. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 201:737-746.
51. Fallon, P. G. and N. E. Mangan. 2007. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat.Rev.Immunol.* 7:220-230.
52. Fanta, C. H. 2009. Asthma. *N.Engl.J.Med.* 360:1002-1014.
53. Fehervari, Z. and S. Sakaguchi. 2004. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 16:203-208.
54. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. 2006. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J.Immunol.* 176:2857-2863.
55. Filler, G. 2007. Calcineurin inhibitors in pediatric renal transplant recipients. *Paediatr.Drugs* 9:165-174.
56. Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki, and T. F. Gajewski. 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu.Rev.Immunol.* 11:29-48.
57. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330-336.
58. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22:329-341.
59. Fox, G. F., M. L. Everard, M. J. Marsh, and A. D. Milner. 1999. Randomised controlled trial of budesonide for the prevention of post-bronchiolitis wheezing. *Arch.Dis.Child* 80:343-347.
60. Franchimont, D., T. Kino, J. Galon, G. U. Meduri, and G. Chrousos. 2002. Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art. NIH clinical staff conference. *Neuroimmunomodulation.* 10:247-260.

61. Friedman, J. and I. Weissman. 1991. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* 66:799-806.
62. Fu, S., N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2004. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + C. *Am.J.Transplant.* 4:1614-1627.
63. Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J.Exp.Med.* 196:851-857.
64. Gabe, S. M., I. Bjarnason, Z. Tolou-Ghamari, J. M. Tredger, P. G. Johnson, G. R. Barclay, R. Williams, and D. B. Silk. 1998. The effect of tacrolimus (FK506) on intestinal barrier function and cellular energy production in humans. *Gastroenterology* 115:67-74.
65. Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
66. Gauvreau, G. M., J. Doctor, R. M. Watson, M. Jordana, and P. M. O'Byrne. 1996. Effects of inhaled budesonide on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154:1267-1271.
67. Gershon, R. K. and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737.
68. Gershon, R. K. and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.
69. Gordon, J. and L. D. MacLean. 1965. A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature* 208:795-796.
70. Gorelik, L. and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 12:171-181.
71. Granot, E., E. Yakobovich, and R. Bardenstein. 2006. Tacrolimus immunosuppression - an association with asymptomatic eosinophilia and elevated total and specific IgE levels. *Pediatr.Transplant.* 10:690-693.
72. Grimbaldston, M. A., M. Metz, M. Yu, M. Tsai, and S. J. Galli. 2006. Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr.Opin.Immunol.* 18:751-760.
73. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
74. Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1998. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J.Immunol.* 160:3188-3193.
75. Hamelmann, E. and U. Wahn. 2002. Immune responses to allergens early in life: when and why do allergies arise? *Clin.Exp.Allergy* 32:1679-1681.
76. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J.Clin.Invest* 103:175-183.

77. Hansen, G., V. P. Yeung, G. Berry, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2000. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8<sup>+</sup> T cells and IL-18. *J.Immunol.* 164:223-230.
78. Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2000. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J.Clin.Invest* 105:61-70.
79. Hansen, J. L., S. Haunso, M. R. Brann, S. P. Sheikh, and D. M. Weiner. 2004. Loss-of-function polymorphic variants of the human angiotensin II type 1 receptor. *Mol.Pharmacol.* 65:770-777.
80. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.* 6:1123-1132.
81. Hayama, T., C. Nagler, D. T. Umetsu, J. Chapman-Alexander, and G. J. Thorbecke. 1983. Ia-restricted interaction between normal lymphoid cells and SJL lymphoma (RCS) leading to lymphokine production. I. Enhancement and suppression of antibody formation to TI antigens by supernatants and cells from cocultures of RCS and lymphoid cells. *Cell Immunol.* 79:134-149.
82. Heath, V. L., E. E. Murphy, C. Crain, M. G. Tomlinson, and A. O'Garra. 2000. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur.J.Immunol.* 30:2639-2649.
83. Heaton, T., J. Rowe, S. Turner, R. C. Aalberse, N. de Klerk, D. Suriyaarachchi, M. Serralha, B. J. Holt, E. Hollams, S. Yerkovich, K. Holt, P. D. Sly, J. Goldblatt, P. Le Souef, and P. G. Holt. 2005. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet* 365:142-149.
84. Henderson, D. J., I. Naya, R. V. Bundick, G. M. Smith, and J. A. Schmidt. 1991. Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology* 73:316-321.
85. Hisaeda, H., Y. Maekawa, D. Iwakawa, H. Okada, K. Himeno, K. Kishihara, S. Tsukumo, and K. Yasutomo. 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat.Med.* 10:29-30.
86. Holgate, S. T. and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 8:218-230.
87. Holt, P. G. and C. McMenamin. 1989. Defence against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. *Clin.Exp.Allergy* 19:255-262.
88. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
89. Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2003. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> regulatory T cell subsets. *J.Leukoc.Biol.* 74:471-478.
90. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, and K. M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260:547-549.
91. Inui, A., H. Komatsu, T. Fujisawa, H. Matsumoto, and Y. Miyagawa. 1999. Food allergy and tacrolimus. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 28:355-356.

92. Ishizaka, K., T. Ishizaka, and M. M. Hornbrook. 1966. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J.Immunol.* 97:75-85.
93. Jacobson, N. G., S. J. Szabo, R. M. Weber-Nordt, Z. Zhong, R. D. Schreiber, J. E. Darnell, Jr., and K. M. Murphy. 1995. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J.Exp.Med.* 181:1755-1762.
94. Janeway, C. A., Jr., C. C. Goodnow, and R. Medzhitov. 1996. Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr.Biol.* 6:519-522.
95. Janeway, C. A., Jr., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2004. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> edition. *Garland Publishing* New York
96. Johansson, S. G. and H. Bennich. 1967. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 13:381-394.
97. John, M., S. Lim, J. Seybold, P. Jose, A. Robichaud, B. O'Connor, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1998. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:256-262.
98. Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley, and M. J. Grusby. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 4:313-319.
99. Karagiannidis, C., M. Akdis, P. Holopainen, N. J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P. Y. Mantel, G. Menz, C. A. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 114:1425-1433.
100. Karlsson, M. R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg. 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J.Exp.Med.* 199:1679-1688.
101. Kaufmann, S. H. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu.Rev.Immunol.* 11:129-163.
102. Kay, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 344:30-37.
103. Kay, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 344:109-113.
104. Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn, and A. S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J.Exp.Med.* 163:1037-1050.
105. Kelly, D. A. 2002. Optimal immunosuppression in teenagers. *Pediatr.Transplant.* 6:480-487.
106. Kilpelainen, M., E. O. Terho, H. Helenius, and M. Koskenvuo. 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin.Exp.Allergy* 30:201-208.
107. Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu.Rev.Immunol.* 17:931-972.
108. Kino, T., H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki, and H. Imanaka. 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J.Antibiot.(Tokyo)* 40:1249-1255.

109. Klein, L., K. Khazaie, and H. von Boehmer. 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 100:8886-8891.
110. Kullberg, M. C., V. Hay, A. W. Cheever, M. Mamura, A. Sher, J. J. Letterio, E. M. Shevach, and C. A. Piccirillo. 2005. TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur.J.Immunol.* 35:2886-2895.
111. Lacaille, F., J. Laurent, and J. Bousquet. 1997. Life-threatening food allergy in a child treated with FK506. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 25:228-229.
112. Larche, M., C. A. Akdis, and R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* 6:761-771.
113. Laurence, A., C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach, and J. J. O'shea. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 26:371-381.
114. Legendre, C., S. Caillat-Zucman, D. Samuel, S. Morelon, H. Bismuth, J. F. Bach, and H. Kreis. 1997. Transfer of symptomatic peanut allergy to the recipient of a combined liver-and-kidney transplant. *N.Engl.J.Med.* 337:822-824.
115. Letterio, J. J. and A. B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.* 16:137-161.
116. Levings, M. K., R. Bacchetta, U. Schulz, and M. G. Roncarolo. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 129:263-276.
117. Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 24:99-146.
118. Liblau, R. S., S. M. Singer, and H. O. McDevitt. 1995. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol.Today* 16:34-38.
119. Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, and T. I. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54:92-99.
120. Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.
121. Ludviksson, B. R., D. Seegers, A. S. Resnick, and W. Strober. 2000. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur.J.Immunol.* 30:2101-2111.
122. Lykavieris, P., E. Frauger, D. Habes, O. Bernard, and D. Debray. 2003. Angioedema in pediatric liver transplant recipients under tacrolimus immunosuppression. *Transplantation* 75:152-155.
123. Lyons, A. B. and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 171:131-137.
124. Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 17:167-178.

125. Malek, T. R. 2003. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J.Leukoc.Biol.* 74:961-965.
126. Margreiter, R., C. Huber, and J. F. Borel. 1983. [Cyclosporin A--new perspectives in transplantation surgery]. *Wien.Med.Wochenschr.* 133 Suppl 1:37-42.
127. Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu.Rev.Immunol.* 12:991-1045.
128. Matzinger, P. 1998. An innate sense of danger. *Semin.Immunol.* 10:399-415.
129. Maziak, W., T. Behrens, T. M. Brasky, H. Duhme, P. Rzehak, S. K. Weiland, and U. Keil. 2003. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy* 58:572-579.
130. McGuirk, P., C. McCann, and K. H. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J.Exp.Med.* 195:221-231.
131. Mempel, T. R., M. J. Pittet, K. Khazaie, W. Weninger, R. Weissleder, H. von Boehmer, and U. H. von Andrian. 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity.* 25:129-141.
132. Mielke, M. E., S. Ehlers, and H. Hahn. 1988. T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection, and granuloma formation in primary and secondary *Listeria* infection in mice: superior role of Lyt-2+ cells in acquired immunity. *Infect.Immun.* 56:1920-1925.
133. Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
134. Miyaura, H. and M. Iwata. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J.Immunol.* 168:1087-1094.
135. Moller, C., S. Dreborg, H. A. Ferdousi, S. Halken, A. Host, L. Jacobsen, A. Koivikko, D. Y. Koller, B. Niggemann, L. A. Norberg, R. Urbanek, E. Valovirta, and U. Wahn. 2002. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J.Allergy Clin.Immunol.* 109:251-256.
136. Moller, G. 1988. Do suppressor T cells exist? *Scand.J.Immunol.* 27:247-250.
137. Moore, K. W., P. Vieira, D. F. Fiorentino, M. L. Trounstein, T. A. Khan, and T. R. Mosmann. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-1234.
138. Moore, K. W., M. R. de Waal, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.
139. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136:2348-2357.
140. Mosmann, T. R. and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7:145-173.

141. Mosmann, T. R. and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* 17:138-146.
142. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* 194:629-644.
143. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J.Immunol.* 172:834-842.
144. Nowak-Wegrzyn, A. H., S. H. Sicherer, M. K. Conover-Walker, and R. A. Wood. 2001. Food allergy after pediatric organ transplantation with tacrolimus immunosuppression. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108:146-147.
145. Nusslein, H. G., G. Weber, and J. R. Kalden. 1994. Synthetic glucocorticoids potentiate IgE synthesis. Influence of steroid and nonsteroid hormones on human in vitro IgE secretion. *Allergy* 49:365-370.
146. O'Garra, A., L. Steinman, and K. Gijbels. 1997. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 9:872-883.
147. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8:275-283.
148. O'Garra, A., P. L. Vieira, P. Vieira, and A. E. Goldfeld. 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J.Clin.Invest* 114:1372-1378.
149. O'Garra, A. and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat.Med.* 10:801-805.
150. Ownby, D. R., C. C. Johnson, and E. L. Peterson. 2002. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA* 288:963-972.
151. Pacifico, L., T. Frediani, A. Simonetti, C. Chiesa, and S. Cucchiara. 2003. Tacrolimus and food allergy. *Transplantation* 76:1778.
152. Paller, A. S., M. Lebwohl, A. B. Fleischer, Jr., R. Antaya, R. G. Langley, R. S. Kirsner, R. R. Blum, M. J. Rico, E. Jaracz, A. Crowe, and G. J. Linowski. 2005. Tacrolimus ointment is more effective than pimecrolimus cream with a similar safety profile in the treatment of atopic dermatitis: results from 3 randomized, comparative studies. *J.Am.Acad.Dermatol.* 52:810-822.
153. Papiernik, M., M. L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int.Immunol.* 10:371-378.
154. Parish, C. R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol.Cell Biol.* 77:499-508.
155. Patarca, R., R. P. Singh, F. Y. Wei, M. V. Iregui, P. Singh, J. Schwartz, and H. Cantor. 1990. Alternative pathways of T-cell activation and positive clonal selection. *Immunol.Rev.* 116:85-100.
156. Paul, W. E. and R. A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76:241-251.
157. Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the

- absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 196:237-246.
158. Platts-Mills, T., J. Vaughan, S. Squillace, J. Woodfolk, and R. Sporik. 2001. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357:752-756.
159. Portnoy, D. A. 1992. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr.Opin.Immunol.* 4:20-24.
160. Powrie, F., S. Menon, and R. L. Coffman. 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur.J.Immunol.* 23:3043-3049.
161. Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 183:2669-2674.
162. Randolph, D. A., C. J. Carruthers, S. J. Szabo, K. M. Murphy, and D. D. Chaplin. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J.Immunol.* 162:2375-2383.
163. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 192:295-302.
164. Riedler, J., W. Eder, G. Oberfeld, and M. Schreuer. 2000. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin.Exp.Allergy* 30:194-200.
165. Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358:1129-1133.
166. Romagnani, S. 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr.Opin.Immunol.* 6:838-846.
167. Romagnani, S. 2004. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:395-400.
168. Romagnani, S. 2006. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 61:3-14.
169. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol.Rev.* 212:28-50.
170. Rosloniec, E. F., K. Latham, and Y. B. Guedez. 2002. Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res.* 4:333-336.
171. Rowbottom, A. W., M. A. Lepper, R. J. Garland, C. V. Cox, and E. G. Corley. 1999. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* 98:80-89.
172. Rubtsov, Y. P. and A. Y. Rudensky. 2007. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat.Rev.Immunol.* 7:443-453.
173. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a

- single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151-1164.
174. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 22:531-562.
175. Schimpl, A. and E. Wecker. 1972. Replacement of T-cell function by a T-cell product. *Nat.New Biol.* 237:15-17.
176. Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol.Today* 13:136-142.
177. Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce, and A. Sher. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.* 168:1675-1684.
178. Scott, P., E. Pearce, A. W. Cheever, R. L. Coffman, and A. Sher. 1989. Role of cytokines and CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol.Rev.* 112:161-182.
179. Scott, P. and S. H. Kaufmann. 1991. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol.Today* 12:346-348.
180. Seymour, B. W., L. J. Gershwin, and R. L. Coffman. 1998. Aerosol-induced immunoglobulin (Ig)-E unresponsiveness to ovalbumin does not require CD8<sup>+</sup> or T cell receptor (TCR)-gamma/delta<sup>+</sup> T cells or interferon (IFN)-gamma in a murine model of allergen sensitization. *J.Exp.Med.* 187:721-731.
181. Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thornton. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 212:60-73.
182. Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, N. Annunziata, and T. Doetschman. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
183. Smith, K. A. and D. A. Cantrell. 1985. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 82:864-868.
184. Stock, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat.Immunol.* 5:1149-1156.
185. Stock, P., O. Akbari, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2005. Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J.Immunol.* 175:7380-7387.
186. Stock, P., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2006. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 6:12-16.
187. Stockinger, B., G. Kassiotis, and C. Bourgeois. 2004. Homeostasis and T cell regulation. *Curr.Opin.Immunol.* 16:775-779.
188. Stockinger, B., T. Barthlott, and G. Kassiotis. 2004. The concept of space and competition in immune regulation. *Immunology* 111:241-247.

189. Suzuki, H., T. M. Kundig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J. J. Simard, P. S. Ohashi, H. Griesser, and . 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268:1472-1476.
190. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J.Exp.Med.* 185:817-824.
191. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
192. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int.Immunol.* 10:1969-1980.
193. Thornton, A. M. and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 188:287-296.
194. Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008-4027.
195. Tsitoura, D. C., S. Kim, K. Dabbagh, G. Berry, D. B. Lewis, and D. T. Umetsu. 2000. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. *J.Immunol.* 165:3484-3491.
196. Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R. H. DeKruyff. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat.Immunol.* 3:715-720.
197. Umetsu, D. T., O. Akbari, and R. H. DeKruyff. 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112:480-487.
198. Umetsu, D. T. and R. H. DeKruyff. 2006. The regulation of allergy and asthma. *Immunol.Rev.* 212:238-255.
199. van den Biggelaar, A. H., R. van Ree, L. C. Rodrigues, B. Lell, A. M. Deelder, P. G. Kremsner, and M. Yazdanbakhsh. 2000. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 356:1723-1727.
200. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24:179-189.
201. Verhagen, J., A. Taylor, K. Blaser, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2005. T regulatory cells in allergen-specific immunotherapy. *Int.Rev.Immunol.* 24:533-548.
202. Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 172:5986-5993.
203. Von Ehrenstein, O. S., E. von Mutius, S. Illi, L. Baumann, O. Bohm, and R. von Kries. 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin.Exp.Allergy* 30:187-193.

204. von Mutius, E., C. Fritsch, S. K. Weiland, G. Roll, and H. Magnussen. 1992. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 305:1395-1399.
205. von Mutius, E., F. D. Martinez, C. Fritsch, T. Nicolai, P. Reitmeir, and H. H. Thiemann. 1994. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 308:692-695.
206. von Mutius, E., S. K. Weiland, C. Fritsch, H. Duhme, and U. Keil. 1998. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 351:862-866.
207. von Mutius, E. 1998. The rising trends in asthma and allergic disease. *Clin.Exp.Allergy* 28 Suppl 5:45-49.
208. WAGNER, R. 1963. [Clemens von PIRQUET.]. *Wien.Klin.Wochenschr.* 75:241-243.
209. Wahl, S. M. 1994. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J.Exp.Med.* 180:1587-1590.
210. Wan, Y. Y. and R. A. Flavell. 2005. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 102:5126-5131.
211. Wan, Y. Y. and R. A. Flavell. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 212:114-130.
212. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* 182:207-214.
213. Wenger, R. M. 1986. Synthesis of ciclosporin and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog.Allergy* 38:46-64.
214. Wiederrecht, G., E. Lam, S. Hung, M. Martin, and N. Sigal. 1993. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 696:9-19.
215. Wiley, R. E., M. Cwiartka, D. Alvarez, D. C. Mackenzie, J. R. Johnson, S. Goncharova, L. Lundblad, and M. Jordana. 2004. Transient corticosteroid treatment permanently amplifies the Th2 response in a murine model of asthma. *J.Immunol.* 172:4995-5005.
216. Williams, A. P., M. T. Krishna, and A. J. Frew. 2004. The safety of immunotherapy. *Clin.Exp.Allergy* 34:513-514.
217. Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu.Rev.Immunol.* 17:255-281.
218. Wilson, M. S., M. D. Taylor, A. Balic, C. A. Finney, J. R. Lamb, and R. M. Maizels. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 202:1199-1212.
219. Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, and R. van Ree. 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296:490-494.
220. Yeung, V. P., R. S. Gieni, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 1998. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J.Immunol.* 161:4146-4152.

221. Zhang, D. H., L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray. 1997. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J.Biol.Chem.* 272:21597-21603.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Die angeborene (natürliche) und die adaptive (erworbene) Immunität	8
<b>Abb. 2:</b>	Die vier Typen der Hypersensitivitätsreaktion nach Coombs und Gell	10
<b>Abb. 3:</b>	Sensibilisierungsphase und Gedächtniszellinduktion	12
<b>Abb. 4:</b>	Sofortreaktion der Typ I Reaktion	13
<b>Abb. 5:</b>	Spätreaktion der allergischen Entzündungsreaktion	14
<b>Abb. 6:</b>	Das T <sub>H</sub> 1 / T <sub>H</sub> 2 Paradigma	16
<b>Abb. 7:</b>	Effekte regulatorischer T Zellen	18
<b>Abb. 8:</b>	Schematische Darstellung verschiedener regulatorischer T Zellen	20
<b>Abb. 9:</b>	Effekte der allergen-spezifischen Immuntherapie	22
<b>Abb. 10:</b>	Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA	31
<b>Abb. 11:</b>	Schematische Darstellung der Ansätze mit und ohne Transwell	37
<b>Abb. 12:</b>	Analyse der Funktionsweise regulatorischer T Zellen	38
<b>Abb. 13:</b>	Behandlungsprotokoll zur Induktion einer respiratorischen Toleranz und der Intervention durch die systemische Gabe von Immunsuppressiva	40
<b>Abb. 14:</b>	Induktion humaner regulatorischer T Zellen durch HKL eines Atopikers	42
<b>Abb. 15:</b>	Zytokinproduktion von poplitealen und inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung mit HKL	44
<b>Abb. 16:</b>	Zytokinproduktion von Milzzellen nach Immunisierung mit HKL	46
<b>Abb. 17:</b>	Flussdiagramm der Co-Kultur	48
<b>Abb. 18:</b>	Reinheit der CD8a <sup>+</sup> DCs	49
<b>Abb. 19:</b>	Reinheit der Knochenmarks-DCs	50
<b>Abb. 20:</b>	Kontrolle der CFSE gefärbten naiven T Zellen	50
<b>Abb. 21:</b>	Proliferation CFSE markierter CD4 <sup>+</sup> T Zellen – mit und ohne Transwell	52
<b>Abb. 22:</b>	Proliferation CFSE markierter CD4 <sup>+</sup> T Zellen – Positiv- und Negativkontrolle	53

---

<b>Abb. 23:</b>	Konzentrationen der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$ mit und ohne Anwesenheit von T <sub>reg</sub> Zellen	54
<b>Abb. 24:</b>	Deutliche Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen von IL-2 und TGF- $\beta$ bei An- und Abwesenheit von T <sub>reg</sub> Zellen	55
<b>Abb. 25:</b>	Antiphlogistische Wirkung von Corticosteroiden	57
<b>Abb. 26:</b>	Molekularer Wirkmechanismus von Corticosteroiden	58
<b>Abb. 27:</b>	Corticosteroide heben die Entwicklung einer T Zell Toleranz auf	59
<b>Abb. 28:</b>	Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus auf Immunzellen	60
<b>Abb. 29:</b>	Wirkmechanismus von Cyclosporin A und Tacrolimus auf molekularer Ebene	61
<b>Abb. 30:</b>	Calcineurininhibitoren hemmen die Entwicklung einer T Zell Toleranz	62
<b>Abb. 31:</b>	HKL induziert im humanen Immunsystem eine Toleranz gegenüber Allergenen	64
<b>Abb. 32:</b>	Gegenüberstellung der Hygiene-Hypothese und des T <sub>H</sub> 1 / T <sub>H</sub> 2 Paradigmas	67

## 8.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreaktivität
Al(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid (Alum)
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	CarboxyFluoroscein Succinimidyl Ester
Cy5	Indodicarbocyanin
DCs	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Deoxyribonuclease
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead box p3
GM-CSF	granulocyte monocyte colony stiumlating factor
HKL	Heat Killed Listeria
ICOS	Inducible Costimulator
ICOSL	Inducible Costimulator-Ligand
i.d.	intradermal
IPEX	immune disregulation, polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
IFA	Feund's Andjuvant Incomplete
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMS	Immunsuppressivum
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal

---

IVC	Individually Ventilated Cages
MACS	Magnetic Activated Cell Sorter
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
NK Zellen	natürliche Killer Zellen
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (periphere mononukleäre Zelle)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
RKI	Robert Koch Institut
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCIT	subcutane Immuntherapie
SI	Stimulationsindex
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T-bet	T-box transcription factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
T <sub>H1reg</sub> Zelle	T <sub>H1</sub> -ähnliche regulatorische T Zelle
T <sub>H</sub> Zellen	T Helferzellen
T <sub>reg</sub> Zelle	regulatorische T Zelle
TZR	T Zell Rezeptor

---

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."



## 8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Philippe Stock, unter dessen hervorragender wissenschaftlicher Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Ich danke ihm für seine vielfache Unterstützung mit großem fachlichem und persönlichem Engagement, die anregenden Diskussionen mit ihm und seinem motivierenden Optimismus, die den Fortgang meiner Forschungen maßgeblich gefördert haben.

Herrn Professor Dr. Ulrich Wahn danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit bei ihm anzufertigen, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Klinik und die stets freundliche und kompetente Unterstützung.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Eckard Hamelmann bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und immer mit großem Interesse und inspirierenden Anregungen meine Arbeit begleitete.

Ein ganz besonderer Dank geht an Viola Kohlrautz und Daniela Wunsch für die bereichernde Zusammenarbeit sowie die stetige Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnenswert ist die hervorragende Hilfe beim FACS von Viola Kohlrautz, oft auch spät in der Nacht und die vielen nützlichen Hinweise und Feinheiten bei der experimentellen Arbeit von Daniela Wunsch.

Mein Dank gilt weiterhin Christine Seib für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und besonders für ihre technische Unterstützung bei dem  $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Proliferationsassay.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die angenehme Atmosphäre bedanken, die den Arbeitstag stets bereicherten.

Herrn Dr. Andreas Hutloff vom Robert-Koch-Institut danke ich für die Bereitstellung der FACS-Antikörper und seine hilfreichen Ratschlägen in dieser Thematik.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Charité für die finanzielle Förderung durch ein Forschungsstipendium für dieses Projekt.

Mein inniger Dank geht an meine Eltern, die mir stets Unterstützung geboten haben und auf die ich mich in jeder Lebenslage verlassen kann.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Stefanie Hein und Dr. Hermann Bauer, die durch Korrekturlesen und vielen Diskussionen maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

### **8.5 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin vorgelegte Dissertation mit dem Titel

#### **Funktion und pharmakologische Beeinflussung regulatorischer T Zellen bei Allergie und Asthma**

selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität einen Antrag um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, 09.09.2011