

Aus dem CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit
Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. U. Wahn)

Habilitationsschrift

Immunregulation bei Th2 gerichteten Erkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Kinder- und Jugendmedizin
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin
von
Dr. med. Philippe Stock

Eingereicht: Dezember 2007

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. F. Zepp, Mainz

2. Gutachter: Prof. K.-M. Debatin, Ulm

Inhaltsverzeichnis

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	3
<u>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</u>	4
1.1 ALLERGISCHE ERKRANKUNGEN UND ASTHMA BRONCHIALE	4
1.2 T ZELLEN	5
1.3 IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ	10
<u>ZUSAMMENFASSUNG EIGENER ARBEITEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT</u>	12
2.1 INDUKTION EINER ALLERGISCHEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG DURCH CD4 ⁺ T ZELLEN	12
2.2 CD8 ⁺ T ZELLEN REGULIEREN T _H 2 IMMUNANTWORTEN	21
2.3 ROLLE VON NKT-ZELLEN BEI DER ENTSTEHUNG VON T _H 2 IMMUNANTWORTEN	34
2.4 IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ UND REGULATORISCHE T ZELLEN	90
2.5 KORTIKOSTEROIDE HEMMEN DIE AUSBILDUNG EINER IMMUNTOLERANZ	105
<u>DISKUSSION</u>	114
3.1 INDUKTION ALLERGISCHER ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN	114
3.2 IMMUNMODULATION ALLERGISCHER ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN DURCH NKT ZELLEN	116
3.3 REGULATORISCHE T ZELLEN IN ALLERGISCHEN ERKRANKUNGEN	118
3.4 EINFLUSS VON KORTIKOSTEROIDEN AUF DIE ENTSTEHUNG EINER IMMUNOLOGISCHEN TOLERANZ	120
<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	123
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	124
<u>DANKSAGUNG</u>	132
<u>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG</u>	133

Abkürzungsverzeichnis

α -GalCer	α -Galactosylceramid
Ag	Antigen
AHR	Atemwegshyperreaktivität
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	Dendritische Zelle
DEX	Dexamethason
DN	Doppelnegativ
HKL	Hitze-inaktivierte <i>Listeria monocytogenes</i>
ICOS	inducible costimulator
IFN	Interferon
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IPEX	Immundefizienz, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Syndrom
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex (antigen)
MyD88	Myeloid differentiation factor-88
NK	Natürliche Killer (-Zelle)
OVA	Ovalbumin
TCR	T-Zell Rezeptor
T _H	T-Helfer (-Zelle)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T _{Reg}	Regulatorische T (-Zelle)

1 Einführung in die Thematik

Höhere Organismen verfügen als Schutz vor fremden Antigenen über ein zweigliedriges Immunsystem. Dem zwar schnellen, jedoch weitgehend unspezifischen angeborenen Immunsystem steht ein erworbenes adaptives System gegenüber, dessen Effekte nach primärem Antigenkontakt langsamer eintreten. Es verfügt jedoch über die großen Vorteile von a) Antigen-spezifität und b) immunologischem Gedächtnis. Bei Reexposition mit einem bereits bekannten Antigen vermag das adaptive System schnell und mit Hilfe klonal selektionierter Rezeptoren (T-Zellrezeptoren, TCR) hochspezifisch zu reagieren. Dies betrifft sowohl infektiöse Organismen als auch nicht infektiöse körperfremde Antigene oder Gewebe. Unter bestimmten Umständen können diese Abwehrmechanismen übersteigert (Allergie) oder fehlgeleitet (autoimmune Erkrankungen) sein.

1.1 Allergische Erkrankungen und Asthma Bronchiale

Bronchiales Asthma ist eine chronische Atemwegserkrankung, die durch Atemwegsentzündung, reversible Atemwegsobstruktion und eine unspezifische Atemwegshyperreaktivität (AHR) gekennzeichnet ist. Während der letzten 15 bis 20 Jahre ist die Prävalenz von Asthma deutlich gestiegen und betrifft inzwischen etwa 10% aller Individuen in Industrienationen (1). Heutige Therapieformen basieren im Wesentlichen darauf, die zugrunde liegende Entzündung mit Kortikosteroiden zu reduzieren. Diese Strategien sind nicht kurativ und können den Verlauf der Erkrankung nicht beeinflussen (2-6). Eine Therapie der zugrunde liegenden allergischen Erkrankung erscheint demnach sinnvoller und langfristig effektiver.

Bei der Pathogenese von Allergien und Asthma bronchiale nimmt die inadäquate Überproduktion von T_H2 Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-13 aber nicht IL-2 oder IFN- γ) eine zentrale Rolle ein und ist Ausdruck einer unangemessenen adaptiven Immunantwort auf Umweltantigene. T_H2 Zytokine verursachen einen Anstieg der IgE Synthese, steigern die Proliferation von eosinophilen und basophilen Granulozyten und Mastzellen, und induzieren deren Chemotaxis in allergisch entzündliche Gewebe. Hierdurch werden Reaktionen vom Soforttyp und vom verzögerten Typ, beide assoziiert mit Atemwegshyperreaktivität (AHR), einem Hauptcharakteristikum von allergischem Bronchialasthma, nicht nur verstärkt sondern auch verlängert.

1.2 T Zellen

Die wichtigsten Zellen des spezifischen Immunsystems höherer Organismen sind die T-Lymphozyten, welche sich im Thymus entwickeln.

Neben den zytotoxischen T-Zellen, welche CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere auf ihrer Zelloberfläche tragen, Antigene über eine MHC I-Präsentation erkennen und für die Erkennung und Beseitigung von Virus-infizierten Zellen entscheidend sind, spielen T-Helferzellen für die adaptive Immunantwort eine wichtige Rolle. T-Helferzellen erkennen Antigene über eine MHC II-Präsentation und tragen als Ko-Rezeptor CD4 auf ihrer Zelloberfläche.

1.2.1 T-Helferzellen

Ausgehend vom Maussystem (7, 8) belegten Untersuchungen der frühen 90er Jahre auch für das Humansystem (9, 10), dass die Mehrzahl der antigenstimulierten T-Helferzellen zwei klassischen Effektor Typen zugeordnet werden kann. Die Unterteilung basiert im Wesentlichen auf der Analyse des Profils der vom aktivierten T-Helferlymphozyten freigesetzten Zytokine. Obwohl sich herauskristallisiert hat, dass sehr viele Zwischenformen existieren, unterscheidet man zwischen zwei „Extremtypen“ der Zytokinausprägung.

Die so genannte „Typ 1 T-Helferzelle“ (T_{H1}) ist durch die Sekretion der Zytokine Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- β charakterisiert. Demgegenüber stehen „Typ 2 T-Helferzellen“ (T_{H2}), die durch die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 gekennzeichnet sind. T_{H1}- und T_{H2}-Zellen entwickeln sich aus T_{H0}-Zellen, die sowohl Typ 1- als auch Typ 2-Zytokine sezernieren.

T_{H1}-Zellen sind an der Abwehr von Infektionserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen beteiligt. Das von ihnen sezernierte IFN- γ ist ein potenter Makrophagenaktivator und stimuliert B-Zellen zur IgG-Produktion. T_{H2}-Zellen sind wesentlich beteiligt bei der Ausbildung der humoralen Immunantwort einschließlich der IgE-Produktion. Sie spielen bei der Abwehr von Helmintheninfektionen und bei Allergien vom Soforttyp eine zentrale Rolle (11). Die von den T_{H2}-Zellen sezernierten Zytokine IL-4 und IL-13 wirken synergistisch auf die IgE-vermittelte Typ I-Reaktion; so induzieren beide den IgE-Isotypenwechsel in B-Zellen, während IL-4 zudem noch ein Mastzellaktivator ist. IL-5, ebenfalls ein T_{H2}-Zytokin, ist ein wichtiger Mediator für die Amplifikation und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Zu den T_{H2}-

Zytokinen gehört auch IL-9, das unterschiedliche Zelltypen wie T- und B-Zellen, Mastzellen und Eosinophile aktivieren kann und wahrscheinlich an der Entstehung und Persistenz allergischer und asthmatischer Erkrankungen beteiligt ist (12).

Über die sezernierten Zytokine beeinflussen sich die beiden Th-Subpopulationen gegenseitig. So inhibiert das T_H1-Zytokin IFN- γ die Proliferation von T_H2-Zellen, und das T_H2-Zytokin IL-4 inhibiert die Differenzierung von T_H1-Zellen.

1.2.2 Regulatorische T Zellen

Obwohl neben den T-Helferzellen schon in den 70er Jahren die Funktion von T-Suppressorzellen diskutiert wurde, kristallisierte sich erst ab Mitte der 90er Jahre die Bedeutung von regulatorischen T Zellen (T_{Reg}) heraus, die das T_H1/T_H2-Konzept deutlich erweiterten (13-15). Die Hauptaufgabe der T_{Reg} besteht darin, die körpereigenen Abwehrreaktionen im Gleichgewicht zu halten, d. h. körpereigenes Gewebe und Umweltreize (u. a. Allergene) zu tolerieren und die Bekämpfung von Krankheitserregern rechtzeitig zu beenden.

Der Begriff "regulatorische T Zelle" bezeichnet Zellen, die die Funktionen anderer Zellen aktiv kontrollieren beziehungsweise blockieren. Regulatorische T Zellen verhindern die Entstehung von Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßungen und verhindern in gesunden Individuen wahrscheinlich auch die Entstehung allergischer Erkrankungen. Die genauen Mechanismen, wie diese Zellen solche Funktionen ausüben oder die spezifischen Charakteristika dieser Zellen, sind weitgehend unbekannt und Gegenstand intensiver vorklinischer und klinischer Forschung. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Gruppen regulatorischer T Zellen unterscheiden. Die erste Gruppe entsteht in dem für T Zellen herkömmlichen Weg der Reifung und Selektion im Thymus und stellt somit eine endogene, natürliche vorkommende Population regulatorischer T Zellen dar. Diese Zellen existieren dauerhaft in der Peripherie und haben zur Aufgabe, potentiell pathologische Autoimmunreaktionen kontinuierlich zu verhindern („natürliche“ CD4⁺CD25⁺ T_{Reg} Zellen, Suppression zytokinunabhängig durch direkten Zellkontakt). Die zweite Gruppe regulatorischer T Zellen entsteht in Folge einer T Zellaktivierung im Kontext spezifischer kostimulatorischer Signale oder nach sub-optimaler Antigenexposition („adaptive“ T_{Reg}, Suppression v.a. durch Zytokinsekretion). Adaptive T_{Reg} Zellen beinhalten die bereits vor vielen Jahren beschriebenen T_H3 Zellen (Suppression durch TGF- β) sowie eine inhomogene Gruppe IL-10 sezernierender regulatorischer T

Zellen (T_{H1} , T_{H1} -like und T_{H2} -like T_{Reg} Zellen). Im Folgenden werden die angesprochenen Subpopulationen regulatorischer T Zellen einzeln dargestellt.

Natürlich vorkommende T_{Reg}

Natürlich vorkommende T_{Reg} Zellen, erstmals von Sakaguchi et al. beschrieben, machen etwa 5-10% aller $CD4^+$ T Zellen aus und sind wesentlich an der Prävention organspezifischer Autoimmunerkrankungen und an der Erhaltung immunologischer Selbsttoleranz beteiligt (16). Diese Zellen exprimieren die α -Kette des IL-2 Rezeptors konstitutiv und reifen im Thymus als T Zellsubpopulation heran. Die Depletion von $CD25^+$ regulatorischen T Zellen führt zur Entstehung von autoimmun-bedingter Thyroiditis und Gastritis, aber auch Diabetes mellitus Typ I und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Andererseits führte die Depletion von $CD25^+$ Zellen zu einer verstärkten Tumorabwehr, was deutlich macht, dass diese regulatorischen Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher Immunantworten supprimieren können. $CD25^+$ T Zellen supprimieren Immunantworten durch direkten Zellkontakt in Abhängigkeit von CTLA-4 und TGF- β . Unklar ist, inwieweit $CD25^+$ T Zellen antigenspezifisch sind, aber Untersuchungen in TCR transgenen Mäusen legen die Vermutung nahe, dass diese Zellen im Thymus selektioniert werden und einen hochaffinen T Zellrezeptor gegen Selbstpeptide tragen. Die suppressiven Effekte von $CD25^+$ T Zellen können durch IL-6 blockiert werden, welches von dendritischen Zellen nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) produziert wird. Alternativ könnten die Effekte von $CD25^+$ T Zellen darin begründet liegen, dass diese Zellen – unabhängig ihrer Spezifität – Ressourcen wie z.B. IL-2 verbrauchen.

Insgesamt muss jedoch beachtet werden, dass CD25 von allen aktivierten T Zellen exprimiert wird und somit einen äußerst unzuverlässigen Marker für regulatorische T Zellen darstellt. Die Untersuchung dieser regulatorischen Zellen hängt davon ab, inwiefern spezifische Marker für diesen Zelltyp gefunden werden. Derzeit äußerst vielversprechend ist der Transkriptionsfaktor Foxp3, der hochspezifisch für $CD25^+$ regulatorische T Zellen zu sein scheint, als auch der Glukokortikoid-induzierte TNF Rezeptor (GITR).

Adaptive T_{Reg}

T_{H3} Zellen wurden von Weiner et al. als $CD4^+$ T Zellen beschrieben, welche nach oraler Antigenexposition in den mesenterialen Lymphknoten entstehen und TGF- β sowie unterschiedliche Mengen an IL-4 und IL-10 synthetisieren (17). Diese T Zellen

supprimierten die Entstehung einer experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) und waren somit ein früher Hinweis darauf, dass TGF- β oder IL-10 produzierende T Zellen regulatorische oder suppressive Fähigkeiten haben und somit die Entstehung pathogener autoreaktive T Zellen inhibieren.

Adaptive, IL-10 sezernierende regulatorische T Zellen (T_{Reg}): Roncarolo et al. konnten zeigen, dass die chronische Aktivierung von CD4⁺ T Zellen in Gegenwart von IL-10 zu deren Differenzierung in TR1 Zellen führte, sowohl im Menschen als auch in der Maus. TR1 Zellen zeigen ein schwaches Proliferationsverhalten und produzieren deutliche Mengen an IL-10, wenig IL-2 und kein IL-4 (18). Diese antigenspezifischen T Zellen supprimieren die Proliferation von CD4⁺ T Zellen und verhindern die Entwicklung einer experimentellen Kolitis in SCID Mäusen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TR1 Zellen antigenspezifische Immunantworten verhindern können und die Funktion sowohl von pathologische autoantigen-spezifischen T Zellen, als auch von T_H2 Zellen verhindern.

Andere Untersuchungen belegen, dass eine respiratorische Allergenexposition in den peribronchialen Lymphknoten zur Heranreifung so genannter tolerogener dendritischer Zellen (DC) führt, welche ihrerseits die Aktivierung von T_H2-like T_{Reg} Zellen induziert (19). Diese regulatorischen T Zellen synthetisierten große Mengen an IL-10 (in frühen Phasen auch IL-4) und exprimierten GATA-3 (Faktor zur Differenzierung von T_H2 Zellen) und den in CD4⁺CD25⁺ T Zellen beschriebenen Transkriptionsfaktor FoxP3 (20). T_H2-like T_{Reg} inhibieren die Proliferation von T Zellen und die Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung in Mäusen. Essentiell hierfür scheint die Aktivierung der kostimulatorischen Signale ICOS-ICOS-Ligand zu sein.

1.2.3 T_H17 Zellen

Bei den T_H17-Zellen handelt es sich um einen eigenen Differenzierungsweg, der zusätzlich zu den T_H1-, T_H2- und T_{Reg}-Zellen existiert. Neben IL-17 produzieren T_H17-Zellen weitere Zytokine wie TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-23 und scheinen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten, u. a. der rheumatoiden Arthritis, zu spielen (21). Insbesondere IL-23, ein heterodimeres Molekül (das zur IL-12-Familie gehört aus der p40 Untereinheit analog zum IL-12 und der p19-Untereinheit aufgebaut ist), ist ein wichtiger Überlebensfaktor für T_H17-Zellen, während IL-6 und TGF- β wichtig für die Ausbildung des T_H17-Phänotyps sind.

Der Transkriptionsfaktor ROR γ t wurde als wesentlicher Hauptschalter für die T_H17-Zellentwicklung identifiziert.

1.2.4 NKT-Zellen

Natürliche - Killer T- (NKT-) Zellen wurden erstmals als eigenständige Population erkannt, als auf einer Population CD4 und CD8 negativer (DN) $\alpha\beta$ T - Zellen (22-24) die Expression des NK - Markers NK1.1 nachgewiesen wurde (25, 26). Die Koexpression des TCR/CD3 - Komplexes und des NK1.1 Markers diente seitdem als Surrogatmarker zur Detektion von NKT - Zellen. Folglich stehen die NKT - Zellen sowohl hinsichtlich ihrer phänotypischen, als auch ihrer morphologischen (27, 28) Erscheinung zwischen klassischen T- und NK - Zellen.

Die meisten NKT Zellen exprimieren einen hochkonservierten (invariant, i) T Zellrezeptor (TCR) (V α 14 murin, und V α 24 human). NKT - Zellen produzieren rasch, in weniger als einer Stunde, nach einer Stimulation über den TCR/CD3 - Komplex, entweder durch α -CD3 ϵ Antikörper (29-32) oder durch den Liganden α -Galactosylceramid (α -GalCer) (33), große Mengen Zytokine und entwickeln Zellzytotoxizität. Da hierbei sowohl T_H1 Zytokine, wie z.B. IFN- γ und TNF- α , als auch T_H2 Zytokine, wie z.B. IL-4 und IL-10, freigesetzt werden (30-32), wurde bereits früh eine Beteiligung der NKT - Zellen sowohl bei T_H1, als auch bei T_H2 vermittelten Immunreaktionen vermutet.

Nach ersten Hinweisen (34-38) erwies sich, dass diese V α 14i NKT - Zellen weder auf MHC I oder II, sondern auf das nicht - polymorphe MHC I homologe Molekül CD1d selektiert werden (39, 40), und deshalb in CD1d defizienten Tieren nicht vorhanden sind (33, 41, 42). Die Gensequenzen für CD1d sind zwischen Maus und Mensch hoch konserviert (> 60%) und das Genprodukt findet sich neben hämatopoetischen Zellen, wie B-, T-, Dendritischen Zellen und Macrophagen (43, 44), auf intestinalen Epithelzellen (45), Hepatozyten (43) und auf Keratinozyten (46).

Bei den an CD1d gebundenen Antigenen handelt es sich interessanterweise nicht, wie bei MHC I oder II, um Peptidfragmente, sondern um Glycolipide (33, 44, 47). Diese binden mit ihren hydrophoben Seitenketten an CD1d (48). Das bekannteste Beispiel eines entsprechenden Glycolipids ist das, ursprünglich aus einem Schwamm (*agelas mauritanicus*) aufgereinigte, α -Galactosylceramid (α -GalCer) (49). α -GalCer bindet sowohl an murines, als auch an humanes CD1d und stimuliert offensichtlich alle NKT - Zellen mit dem invarianten T - Zellrezeptor (V α 14J α 281 oder V α 24J α Q)

(33, 43, 50-52). Diese hochspezialisierte Interaktion zwischen CD1d und Va14/24i NKT - Zellen erlaubt es dem Immunsystem somit innerhalb einer weiteren Stoffklasse, den Lipiden, nach Anzeichen von Pathogenen zu suchen. Weitere Glyco- und Phospholipide wurden als aktivierende CD1d Liganden vorgeschlagen (50, 53-55), doch konnte bislang keiner dieser Liganden einem einzelnen T - Zellrezeptor zugeordnet werden. Deshalb wird derzeit in den meisten Untersuchungen α -GalCer zur NKT - Zellaktivierung verwendet.

1.3 Immunologische Toleranz

Bislang unklar ist, welche Mechanismen nichtatopische Individuen vor der Entwicklung allergischer Erkrankungen schützen und zur kausalen Therapie atopischer Individuen eingesetzt werden könnten. Die Symptomfreiheit gesunder Individuen wurde bis vor kurzem durch ein Fehlen allergenspezifischer Immunantworten erklärt, doch in neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass die Allergenexposition nichtatopischer Individuen zu Immunantworten führte, welche mit antigenspezifischer IgG Synthese und T Zellproliferation einher gingen (56-58). Somit resultiert die Symptomfreiheit nichtallergischer Individuen aus einer spezifischen Form der Immunantwort, welche die allergische Entzündung supprimiert.

Die Tatsache, dass T_H1 Zellen in manchen Systemen T_H2 Zellen gegenregulieren können (7) hat zu der Vermutung geführt, dass allergenspezifische T_H1 Zellen das Auftreten allergischer Erkrankungen und Asthma in gesunden Individuen verhindern. Neuere Studien zeigen jedoch, dass dies nicht zutrifft. Zunächst wurde beschrieben, dass allergenspezifische T Zellen im Blut und in der Lunge asthmatischer Patienten hohe Mengen an T_H1 Zytokinen produzieren, und dies scheint die Erkrankung eher zu verstärken als zu verbessern (59, 60). Außerdem hat die Umetsu Gruppe, wie andere Untersucher auch, gezeigt, dass der adoptive Transfer von T_H1 Zellen im Mausmodell T_H2 Effektorzellen nicht etwa blockiert, sondern die Atemwegsentzündung noch verstärkt (61). Zusätzlich gilt zu beachten, dass in den Lungen nichtallergischer Individuen keine allergenspezifischen T Zellen nachweisbar sind, auch keine T_H1 Zellen. Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass gezielte Regulationsmechanismen existieren, die vor der Entwicklung

allergischer Erkrankungen und Asthma schützen, ohne dass es zu einer Infiltration T_H1 polarisierter Entzündungszellen kommt.

Ein viel wahrscheinlicherer Schutzmechanismus gesunder Individuen ist eine allergenspezifische Toleranz, die nach respiratorischer Aufnahme des Allergens oder nach Allergenexposition in Verbindung mit spezifischen Zusatzsignalen die Entwicklung allergischer Erkrankungen und Asthma verhindert. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass „tolerante“ T Zellen eine aktive regulatorische Rolle spielen. Diese kann über (i) Ausschüttung inhibitorischer Zytokine, (ii) direkte Inhibition von T Zellen oder (iii) direkten Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen erklärt werden. Die Signale, die die Differenzierung von T Zellen in eine aktivierende oder in eine regulatorische Funktion polarisieren sind jedoch ungeklärt und es ist bisher nicht bekannt, ob T_R Zellen einen grundsätzlich eigenständigen Zelltyp darstellen, oder ob herkömmliche T Zellen je nach Stärke und Qualität des Signals entweder aktive Effektoren oder Regulatoren des Immunsystems werden.

2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext

2.1 Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CD4⁺ T Zellen

P1 Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, Lohning M, Wahn U, Hamelmann E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(1)

Es wird heute davon ausgegangen, dass T-Zellen wesentlich den Verlauf einer allergischen Atemwegserkrankung orchestrieren. Dendritische Zellen (DC) der Lunge präsentieren CD4⁺ T-Helferzellen Antigene (Ag). Folgen der Bindung zwischen DC und T-Zelle sind a) Proliferation von CD4⁺ T-Zellen, b) Expression spezifischer Moleküle auf der Oberfläche dieser T-Zellen, was sie zur Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems (z.B. B-Zellen) befähigt und c) die Synthese von Zytokinen und Chemokinen, was zur Rekrutierung und Maturation weiterer Zellen des adaptiven Immunsystems führt (62). Die Anzahl von T-Zellen in broncho-alveolären Lavagen (BAL) und in bronchialen Biopsien asthmatischer Patienten ist signifikant erhöht und korreliert direkt mit der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge und mit dem Schweregrad der Erkrankung (63, 64). Solche T-Zellen sind typischerweise deutlich aktiviert (CD25⁺) (65) und sezernieren vermehrt Zytokine wie IL-4, IL-13, IL-5 und GM-CSF (66, 67). Die Expression von IL-4 und IL-5 mRNA korreliert hierbei mit dem Grad der eosinophilen Infiltration (68, 69).

Insbesondere ihre Fähigkeiten, IgE-Synthese zu stimulieren und eosinophile Granulozyten zu regulieren haben die T_H2-Zelle in der allergisch-entzündlichen Kaskade in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen asthmatischer Patienten vorwiegend ein T_H2-Zytokinprofil synthetisieren (70, 71). Auch im murinen Modell allergischer Atemwegsinfammation konnte die Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Entstehung von AHR und eosinophiler Atemwegsentzündung nach Sensibilisierung (i.p.) und Provokation (Aerosol) mit Ovalbumin (OVA) konnte in diesem Modell durch Depletion von CD4⁺ T-Zellen verhindert werden (72, 73).

Allergisches Asthma bronchiale stellt die häufigste chronische Erkrankung der Atemwege dar und nimmt in den letzten beiden Jahrzehnten weiter an Inzidenz, Prävalenz und Mortalität zu (1). Aufgrund des kurzen Zeitraumes können allein genetische Faktoren nicht für die rasche Zunahme von Allergien verantwortlich gemacht werden, so dass vor allem Umweltfaktoren als Ursache diskutiert werden. Epidemiologische Studien der letzten Jahre liefern Hinweise dafür, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, deutlich seltener allergische Erkrankungen entwickeln (74). Der Kontakt mit bakteriellen oder anderen Erregern oder deren Bestandteilen wie Endotoxine könnten eine anti-allergische Wirkung auf das Immunsystem dieser Kinder ausüben (75). Für die Entwicklung und Validierung neuer immunmodulierender Strategien für die Prävention und Behandlung von Asthma bronchiale sind Untersuchungen der grundlegenden Mechanismen notwendig, die zur allergischen Sensibilisierung und Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität führen. Daher untersuchten wir in einem Asthma-Mausmodell, inwieweit durch die Beeinflussung des ersten Schrittes der allergischen Sensibilisierung, der Antigen-Präsentation, z.B. durch Endotoxine eine immunmodulierende oder präventive Wirkung auf die Entwicklung von asthmatischen Symptomen erreicht werden kann. Wir konnten zeigen, dass bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid (LPS) die systemischen T_H1/T_H2 Polarisierungen beeinflusst und die Entwicklung einer allergischen Atemwegsinfektion verhindern kann (76, 77).

2.2 CD8⁺ T Zellen regulieren T_H2 Immunantworten

P2 Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D, Gerhold K, Wahn U, Umetsu DT, Hamelmann E: CD8⁺ T Cells Regulate Immune Responses. *Eur J Immunol* 2004; 34

Weitaus weniger klar ist die Funktion von CD8⁺ T-Zellen in diesem Zusammenhang. Diesen, nach klassischer Sichtweise reinen Effektorzellen (zytotoxische T-Lymphozyten, CTL), werden immer häufiger immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben. Naive CD8⁺ T-Zellen ähneln morphologisch naiven CD4⁺ T-Zellen und können *in vitro* durch spezifische Stimulation zur Synthese von T_H1-, aber auch T_H2-Zytokinmustern angeregt werden (78, 79). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen scheinbar widersprüchliche Ergebnisse. Im Modell der Ratte konnten Hsu et al. zeigen, dass der protektive Effekt allergenspezifischer DNA-Vakzinierung mit dem Transfer von CD8⁺ T-Zellen übertragen werden konnte (80). Einige Autoren konnten im Mausmodell allergischer Sensibilisierung durch inhalatives OVA zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen die IgE Produktion und eine allergeninduzierte AHR verhinderten (81, 82). Im Gegensatz hierzu lassen andere Untersuchungen vermuten, dass CD8⁺ Zellen für die Ausbildung allergischer Atemwegsinflammation der Maus notwendig sind: die Depletion von CD8⁺ T-Zellen vor inhalativer OVA-Sensibilisierung verhinderte sowohl die Entwicklung einer AHR und einer eosinophilen Infiltration der Lunge, als auch die IL-5 Synthese von T-Zellen (83). In dieser Untersuchung waren nicht CD4⁺ T-Zellen, sondern vor allem CD8⁺ T-Zellen Hauptproduzenten von IL-5 in peribronchialen Lymphknoten. Ähnliche Ergebnisse lieferte ein Mausmodell für IL-5 vermittelte Eosinophilie und AHR nach Virusinfektion (respiratory syncytial virus, RSV) (84).

Um die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich CD8⁺ T Zellen aufzuklären untersuchten wir die Funktion von CD8⁺ Zellen in sensibilisierten und naiven Tieren in unterschiedlichen Geweben. CD8⁺ Zellen der Lunge sensibilisierter Tiere produzierten hohe Mengen an T_H2 Zytokinen und IL-10, wohingegen CD8⁺ Zellen der Milz T_H1 Zytokine produzierten. Dies zeigt, dass CD8⁺ Zellen eine heterogene Gruppe von Zellen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen darstellen.

In weiteren Untersuchungen analysierten wir die Funktion von CD8⁺ T Zellen während der Entwicklung einer AHR und zeigten einen protektiven Effekt von CD8⁺ T Zellen. Depletion von CD8⁺ T Zellen vor der systemischen Immunisierung resultierte in verstärkten T_H2 Immunreaktionen und in verstärkter allergischer Atemwegsinfammation. Die Depletion von CD8⁺ T Zellen resultierte in einer durchschnittlich 9fach erhöhten Anzahl eosinophiler Granulozyten in bronchoalveolärer Lavage (BAL).

2.3 Rolle von NKT-Zellen bei der Entstehung von T_H2 Immunantworten

P3 Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Essential Role of NKT Cells Producing IL-4 and IL-13 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperreactivity. *Nature Medicine* 2003; 9(5)

P4 Stock P, Akbari O. Recent Advances on the Role of NKT Cells in Allergic Diseases and Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* 2008, 8 (2) (in press)

P5 Akbari O, Stock P, Meyer EH, Freeman GJ, Sharpe AH, Umetsu DT, DeKruyff R: ICOS/ICOSL interaction is required for CD4⁺ iNKT cell homeostatic survival and function. 2007 (*submitted*)

Um die Rolle von NKT-Zellen in einem Tiermodell zur allergischen Atemwegserkrankung genauer zu untersuchen verwendeten wir Mäuse, denen durch CD1d-knockout die Fähigkeit zur Ausbildung von NKT-Zellen genommen wurde. Nach systemischer Sensibilisierung und lokaler Provokation mit Ovalbumin (OVA) verglichen wir die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung zwischen NKT-Zell-defizienten CD1d-knockout Mäusen mit Wildtyp BALB/c Tieren. Während Wildtyp BALB/c nach dieser Behandlung eine starke Inflammation und Hyperreaktivität der Atemwege zeigten, entwickelten CD1d knockout Tiere keine der beschriebenen Symptome (85). Wir konnten zeigen, dass neben OVA eine Reihe weiterer Antigene (bovines Serumalbumin, Aspergillus Antigen) in Wildtyp BALB/c eine starke allergische Atemwegserkrankung induzierte. Im Unterschied hierzu waren NKT-Zell-defiziente Tiere jedoch vor der Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung auf jedes dieser Antigene geschützt.

Wir etablierten drei verschiedene Versuchansätze um die Hypothese zu stützen, dass NKT Zellen bei der Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung notwendig sind. Als erstes induzierten wir in Wildtyp BALB/c Mäusen durch Injektion von depletierenden anti-CD1d mAbs eine Depletion von NKT-Zellen. In derart behandelten Tieren konnte durch systemische und inhalative Gabe von OVA keine allergische Atemwegserkrankung hervorgerufen werden (86). Als zweites untersuchten wir J α 281-knockout Mäuse, einen experimentellen Zuchstamm welcher keine α -Kette des invarianten TCR exprimiert und somit keine V α 14 NKT-Zellen

aufweist (87). Wir konnten zeigen, dass $J\alpha 281$ -knockout Tiere, ähnlich den CD1d-knockout Tieren, keine allergische Atemwegserkrankung nach systemischer Sensibilisierung und lokaler Provokation entwickelten. Wir konnten außerdem zeigen, dass nach adoptivem Transfer von Wildtyp NKT Zellen in $J\alpha 281$ -knockout Mäuse eine allergische Inflammation und Hyperreaktivität der Atemwege auslösbar war. Dies war nicht der Fall in Versuchen, in denen die transferierten NKT-Zellen aus IL-4 und IL-13 knockout Mäusen stammten was vermuten lässt, dass die Sekretion von IL-4 und IL-13 durch NKT Zellen für die beschriebenen Effekte von entscheidender Bedeutung ist (85). In einem dritten Versuchsansatz konnten wir zeigen, dass die alleinige Aktivierung von NKT-Zellen in BALB/c Mäusen eine allergische Atemwegserkrankung induziert. Die direkte Aktivierung von pulmonalen NKT-Zellen durch intranasale Gabe von α -GalCer induzierte eine deutliche eosinophile Inflammation und Hyperreaktivität der Atemwege. Dies war selbst in Tieren ohne endogene B- oder T-Zellen der Fall (86).

Die beschriebenen Effekte von NKT-Zellen auf die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung von Mäusen sind abhängig von der Expression des kostimulatorischen Moleküls ICOS (*ICOS, inducible costimulator*). Wir konnten zeigen, dass NKT-Zellen von ICOS-knockout Mäusen keine Fähigkeiten besitzen, eine allergische Atemwegserkrankung in Mäuse zu induzieren (P7, submitted).

Die oben genannten Untersuchungen zeigen, dass NKT-Zellen hochpotente proinflammatorische Effektorzellen in der Lunge sind. NKT-Zellen scheinen hiernach auch ohne konventionelle B- oder T-Zellen in der Lage zu sein, eine allergische Atemwegserkrankung in Mäusen zu induzieren.

2.4 Immunologische Toleranz und regulatorische T Zellen

P6 Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol.* 2004; 5(11):1149-56.

P7 Stock P, Dekruyff RH, Umetsu DT Inhibition of the Allergic Response by Regulatory T Cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006, 6:12–16

Unter Verwendung eines speziellen Immunadjuvans (hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes*, HKL) konnten wir zeigen, dass $CD8\alpha^+$ dendritische Zellen einen weiteren Typ regulatorischer T Zellen induzieren können, welcher große Mengen an IL-10 synthetisiert (20).

Da es sich hier um eine neue Form der Induktion regulatorischer T Zellen *in vivo* handelte wollten wir untersuchen, ob die entstandenen T_{Reg} Zellen Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Formen regulatorischer T Zellen aufweisen. Die durch HKL und $CD8\alpha^+$ DC induzierten T_R exprimierten ICOS, ein kostimulatorisches Molekül, das mit der Sekretion von IL-10 assoziiert ist (88) und von T_{Reg} exprimiert wird, die durch respiratorische Antigenexposition entstehen (89). Die durch HKL und $CD8\alpha^+$ DC induzierten T_R exprimierten außerdem mRNA für den Transkriptionsfaktor foxp3, der bisher nur in natürlichen $CD4^+CD25^+$ T_{Reg} dargestellt werden konnte. Weiterhin konnten wir zeigen, dass T_{Reg} Zellen die durch respiratorische Antigenexposition entstehen (89), ebenfalls foxp3 exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl durch HKL und $CD8\alpha^+$ DC induzierte, als auch nach respiratorischer Antigenexposition entstehende T_{Reg} Zellen Ähnlichkeiten mit natürlichen $CD4^+CD25^+$ T_{Reg} aufweisen. Dies lässt vermuten, dass der foxp3 Transkriptionsweg für die regulatorischen Effekte sowohl natürlicher als auch adaptiver T_{Reg} von Bedeutung ist. Der adoptive Transfer dieser *in vivo* generierten T_{Reg} Zellen reduzierte die Entwicklung einer allergischen Atemwegsinfektion in Mäusen. Diese Zellen exprimieren außerdem IFN- γ und T-bet (Faktor zur Differenzierung von T_H1 Zellen), sowie FoxP3 (*T_H1-like T_{Reg} Zellen*).

Zusammenfassend konnten wir also zeigen, dass adaptive antigenspezifische T_{Reg} Zellen *in vivo* mit Hilfe eines neuartigen Mechanismus hergestellt werden können,

welcher ausgereifte $CD8\alpha^+$ DCs beinhaltet. Unsere Ergebnisse zeigen außerdem, dass antigen-induzierte adaptive T_{Reg} Zellen mit natürlichen $CD4^+ CD25^+$ T_{Reg} Zellen verwandt sind, da beide IL-10 produzieren und einen Transkriptionsweg verwenden, der *foxp3* beinhaltet. Unter Verwendung dieses Modellsystems können wir nun versuchen, die bislang ungeklärten Fragen zu den Entstehungs- und Funktionsmechanismen von T_{Reg} Zellen *in vivo* zu beantworten.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, dass sowohl durch das Adjuvans HKL und $CD8\alpha^+$ DC induzierte, als auch nach respiratorischer Antigenexposition entstehende T_{Reg} Zellen Ähnlichkeiten mit natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+$ T_{Reg} Zellen aufweisen (IL-10 Sekretion, Expression von FoxP3). Dies lässt vermuten, dass sowohl IL-10, also auch der FoxP3 Transkriptionsweg für die regulatorischen Effekte sowohl natürlicher als auch adaptiver T_{Reg} von Bedeutung ist.

2.5 Kortikosteroide hemmen die Ausbildung einer Immuntoleranz

P8 Stock P, Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Respiratory Tolerance is Inhibited by the Administration of Corticosteroids. *J Immunol* 2005, 175: 7380-7387

Aufgrund der umfangreichen Verwendung von Kortikosteroiden zur Behandlung allergischer Erkrankungen stellten wir die Frage, ob die Applikation von Kortikosteroiden Einfluss auf die Ausbildung einer protektiven Immuntoleranz hat. Mäuse wurden wie beschrieben intranasal immunisiert um eine antigenspezifische Immuntoleranz zu induzieren (89). Zur gleichen Zeit wurde den Tieren Dexamethason injiziert. Nach 8 Tagen wurden die Tiere systemisch sensibilisiert und nach weiteren 8 Tagen wurde die Milz der Tiere entnommen. Lymphozyten wurden *in vitro* restimuliert und die Proliferation wurde mittels Thymidin-Inkorporation analysiert. Wir konnten zeigen, dass die Injektion von Dexamethason (Dex) die Ausbildung einer Protektiven Immuntoleranz verhinderte. Bei einer Gruppe von Tieren wurde nach beschriebenem Behandlungsschema die Atemwegshyperreaktivität (AHR) gemessen. Die Gabe von Dexamethason verhinderte auch hier die Entstehung einer Immuntoleranz. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von Kortikosteroiden nicht nur die allergische Entzündungsreaktion, sondern auch die Entstehung einer Immuntoleranz verhindert. Dies belegt die Schwäche gegenwärtiger Therapien allergischer Erkrankungen.

3 Diskussion

3.1 Induktion allergischer Entzündungsreaktionen

Wir wissen heute, dass $CD4^+$ T Zellen bei Induktion einer allergischen Immunreaktion eine wesentliche Rolle spielen. Wie bereits dargestellt, ist die Funktion von $CD8^+$ T Zellen weitaus undeutlicher, und wird kontrovers diskutiert. Um dies genauer zu analysieren untersuchten wir die Funktion von $CD8^+$ T Zellen sowohl in frühen als auch in späten Stadien einer allergeninduzierten Atemwegshyperreaktivität. Wir konnten zeigen, dass $CD8^+$ T Zellen während der Induktionsphase der Sensibilisierung eine inhibitorische Funktion übernehmen. Der Einfluß von $CD8^+$ T Zellen in späteren Phasen der Atemwegsinfammation schien limitiert zu sein.

Unsere Ergebnisse stellen einen protektiven Effekt von $CD8\alpha^+$ Zellen dar, die allergische Immunreaktionen deutlich reduzieren können. Wir untersuchten unterschiedliche Zeitpunkte der Depletion von $CD8\alpha^+$ Zellen im Verlauf einer allergischen Sensibilisierung, doch das regulatorische Potenzial von $CD8^+$ T Zellen erschien nur zu frühen Zeitpunkten der Sensibilisierung besonders effektiv, zum Zeitpunkt der Expansion spezifischer $CD4^+$ T Zellen.

$CD8^+$ T Zellen scheinen in frühen Phasen der Sensibilisierung die Proliferation von $CD4^+$ T Zellen zu blockieren und resultierenden T_H2 Immunreaktionen somit entgegen zu wirken. Diese Vorstellung entspricht Beobachtungen, die $CD8^+$ T Zellen in der allergischen Sensibilisierung eine eher suppressive Funktion einräumen (90, 91). Diese Untersuchungen wurden unter Verwendung depletierender anti- $CD8\alpha$ Antikörper durchgeführt. Im Hinblick auf unsere Ergebnisse die belegen, dass $CD8\alpha^+$ DCs unter gewissen Umständen immunsuppressiv wirken können besteht die Möglichkeit, dass die Effekte der Depletion $CD8\alpha^+$ Zellen zumindest teilweise auf der Depletion $CD8\alpha^+$ DCs beruhen. Dies ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Um der Frage nachzugehen, ob $CD8^+$ T Zellen je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen ausüben verglichen wir $CD8^+$ T Zellen der Lunge aus sensibilisierten und lokal provozierten Tieren mit $CD8^+$ T Zellen aus der Milz derselben Tiere. Wir konnten beobachten, dass $CD8^+$ T Zellen der Lunge große Mengen an T_H2 Zytokinen (IL-4 und IL-5), viel IL-10 aber nur sehr geringe Mengen an IFN-g

produzierten. CD8⁺ T Zellen der Lunge zeigten außerdem nur eine geringe Expression zytolytischer Proteine. Im Gegensatz hierzu wiesen CD8⁺ T Zellen der Milz ein T_H1 dominiertes Expressionsprofil auf (hohe IFN- γ Produktion) und zeigten ein starkes zytolytisches Potential. Die starke IL-10 Sekretion durch CD8⁺ T Zellen der Lunge von sensibilisierten Mäusen kann durch eine Vielzahl von Mechanismen erklärt werden. Zum einen ist bekannt, dass IL-10 während T_H2 polarisierten Immunantworten eine wichtige regulatorische Rolle spielt (92-95). Wir wissen heute, dass die Gabe von IL-10 eine allergische Atemwegserkrankung in Mäusen verhindert. Ähnliches wird durch adoptiven Transfer von IL-10 produzierenden regulatorischen T Zellen erreicht (96).

Die Tatsache, dass in verschiedenen Organsystemen eines Tieres unterschiedliche Subpopulationen antigenspezifischer CD8⁺ T Zellen existieren kann durch mindestens zwei mögliche Mechanismen erklärt werden. Zunächst ist denkbar, dass durch die T_H2 polarisierte Umgebung im Lungengewebe eine spezifische Subpopulation von CD8⁺ T Zellen angezogen wird. Veränderte Adhäsionsmoleküle könnten dafür verantwortlich sein, dass bestimmte Populationen von CD8⁺ T Zellen präferentiell die entzündlichen Bereiche einer allergisch veränderten Lunge infiltrieren. Dazu passend konnte kürzlich gezeigt werden, dass CD8⁺ T Zellen je nach Phänotyp verschiedene Migrationsverhalten aufwiesen (97). Als zweites besteht die Möglichkeit, dass CD8⁺ T Zellen in der Lunge lokal polarisiert werden. Diese Sichtweise wird durch die Tatsache unterstützt, dass CD8⁺ T Zellen nach entsprechender Stimulation in vitro ein T_H2 Sekretionsprofil entwickeln können (79, 98).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass CD8⁺ T Zellen sowohl zeit- als auch lokalisationsabhängig unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können. CD8⁺ T Zellen scheinen den Organismus zu frühen Zeitpunkten vor einer allergischen Sensibilisierung zu schützen, dies geschieht wahrscheinlich durch Sekretion von IFN- γ . Hat sich eine systemische Sensibilisierung ausgebildet spielen CD8⁺ T Zellen unter Umständen nur eine untergeordnete Rolle. Außerdem zeigen sich je nach Lokalisation unterschiedliche Phänotypen von CD8⁺ T Zellen mit jeweils verschiedenen Funktionen. Diese Informationen zeigen, dass CD8⁺ T Zellen eine äußerst heterogene Gruppe darstellen. Auch die Regulation dieses Zelltyps auf molekularer Ebene ist bisher nicht geklärt. Es erscheint wahrscheinlich, dass CD8⁺

T-Zellen grundsätzlich in der Lage sind, verschiedene Funktionen zu entfalten und Immunreaktionen in vielfältiger Weise zu modulieren vermögen.

In weiteren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass das Endotoxin LPS systemische IgE und Th2 Antworten verhindern konnte. Eine eosinophile Infiltration der Atemwege konnte somit IL-12 abhängig verhindert werden. Dies betraf auch bereits sensibilisierte Tiere, sodass nicht nur von einem protektiven, sondern auch von einem therapeutischen Effekt von LPS ausgegangen werden kann. Die therapeutische Verwendung von LPS zur Behandlung bereits ausgebildeter allergischer Erkrankungen erscheint jedoch aufgrund von zwei Beobachtungen schwierig. Erstens war LPS in sensibilisierten Tieren nicht in der Lage, die Hyperreaktivität der Atemwege zu beeinflussen. Zweitens ist aus vielen Untersuchungen bekannt, dass LPS – bei Mensch und Tier – die Symptome allergischen vermittelten Bronchialasthmas verstärken kann. Es erscheint jedoch möglich, die protektiven Effekte von LPS dafür zu nutzen, Kinder mit hohem Allergierisiko präventiv zu behandeln und somit vor der Ausbildung allergischer Erkrankungen zu schützen. So konnte die Exposition von neugeborenen Mäusen mit LPS die Entwicklung von T_H2 polarisierten Immunantworten verhindern, wahrscheinlich durch Induktion einer T-Zell-Toleranz. Diese Strategie könnte somit für Kinder, die aufgrund einer genetischen Prädisposition ein hohes Risiko für die Entwicklung allergischer Erkrankungen aufweisen, außerordentlich hilfreich sein.

3.2 Immunmodulation allergischer Entzündungsreaktionen durch NKT Zellen

Wir konnten zeigen, dass zusätzlich zu konventionellen CD4⁺ T Zellen auch V α 14 NKT Zellen für die Ausbildung einer allergisch vermittelten Atemwegsinflammation verantwortlich sind. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass CD1d^{-/-} Mäuse nach Immunisierung normale Mengen an IgE produzierten (99), und dass CD1d^{-/-} Mäuse eine Eosinophilie der Atemwege aufwiesen (100). Wir konnten diese Ergebnisse in unseren Versuchen reproduzieren und wir konnten zeigen, dass NKT Zell defiziente Mäuse nach Sensibilisierung normale Mengen von IL-4 und IL-13 produzieren. Unsere Untersuchungen zeigen dennoch erstmalig, dass eine Atemwegshyperreaktivität in NKT Zell defizienten Mäusen nicht zu induzieren ist. Dies entspricht Untersuchungen die belegen, dass eine Hyperreaktivität und eine Eosinophile der Atemwege nicht notwendigerweise miteinander korrelieren (101, 102). Es ist bekannt, dass β 2 Mikroglobulin-defiziente Mäuse, denen sämtliche MHC

I Moleküle (inklusive CD1d) fehlen, sowohl eine Eosinophilie (103) als auch eine Hyperreaktivität (104) der Atemwege aufweisen. Da diesen Tieren jedoch auch CD8⁺ T Zellen fehlen, was eine Immundysregulation in verschiedenen Organsystemen zur Folge haben könnte, sind diese Daten schwer zu interpretieren. Dennoch zeigen diese Daten, dass T_H2 polarisierte Immunantworten in NKT Zell defizienten Mäusen induziert werden können, und dass eine IgE Synthese auch ohne NKT Zellen stattfinden kann. Andererseits sollte bedacht werden, dass eine T_H2 Antwort alleine nicht ausreicht, ein allergisches Asthma zu induzieren, denn T_H2 Immunantworten in peripheren Lymphknoten oder in den oberen Atemwegen führt nicht notwendigerweise zur allergischen Atemwegsinflammation (105, 106). NKT Zellen müssen daher zusätzliche Mechanismen in den tiefen Atemwegen induzieren, die zur allergischen Atemwegshyperreaktivität führt. Oder anders ausgedrückt, pulmonale NKT Zellen, welche ca. 3% aller mononukleärer Zellen der Lunge ausmachen und eine wesentliche Funktion bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen in den Atemwegen einnehmen (107) werden nach Antigenkontakt in der Lunge aktiviert und schaffen die Voraussetzung dafür, dass eine Atemwegshyperreaktivität entstehen kann.

Die genauen Mechanismen, wodurch NKT Zellen nach Antigenkontakt in der Lunge eine AHR induzieren, sind unklar. Wir konnten zeigen, dass die Kombination von CD4⁺ T Zellen von NKT Zell defizienten Mäusen mit NKT Zellen eine AHR in SCID-Mäusen induzieren konnte, wohingegen die beiden Zellpopulationen einzeln keine AHR in den Empfängertieren verursachten. Dies legt die Vermutung nahe, dass NKT Zellen die simultan transferierten T_H2 Zellen insofern beeinflussen können, als dass diese die Atemwege infiltrieren und dort eine allergische Hyperreaktivität induzieren können. Die genauen Signale jedoch, mit denen NKT Zellen auf die Funktion von CD4⁺ T Zellen Einfluss nehmen, sind nicht bekannt.

Zusammenfassend haben wir eine neuartige Funktion von V α 14i NKT Zellen bei der Regulation einer allergeninduzierten Atemwegsinflammation identifiziert. Wir konnten zeigen, dass IL-4 und IL-13 produzierende NKT Zellen für die Ausbildung einer allergischen Atemwegshyperreaktivität verantwortlich sind. Außerdem lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass pulmonale NKT Zellen intrinsische Elemente in der Lunge darstellen, welche T_H2 polarisierte Immunantworten erlauben und die Entwicklung von AHR und Asthma ermöglichen.

3.3 Regulatorische T Zellen in allergischen Erkrankungen

Regulatorische T Zellen wurden bisher vorwiegend im Kontext von Immuntoleranz gegen Selbstantigene untersucht. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass Immuntoleranz auch im peripheren Immunsystem (im Rahmen von Immunantworten auf Antigenkontakt in den Atemwegen und im Darm) von größter Bedeutung ist. Diese Orte der vordersten Immunabwehr sind dauerhaft einer Vielzahl nichtpathogener Umweltantigene ausgesetzt, welche im Normalfall eine Immuntoleranz induzieren. So reduziert der Kontakt mit Katzen oder Hunden im ersten Lebensjahr das Risiko einer allergischen Sensibilisierung gegen unterschiedlichste Allergene (108, 109). Andere Untersucher konnten zeigen, dass Kinder, die auf Bauernhöfen und mit direktem Kontakt zu Tieren aufwachsen, ein deutlich niedrigeres Risiko zur Entwicklung allergischer Erkrankungen aufweisen als Kinder aus städtischen Umgebungen (74, 110), möglicherweise durch Exposition mit Endotoxinen (75). In jedem Falle ist wahrscheinlich, dass der Kontakt mit Umweltantigenen auf mukosalen Oberflächen wie der Lunge oder dem Darm zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt, welche durch regulatorische T Zellen vermittelt wird. Ein weiterer Hinweis hierfür ist, dass eine Defizienz an CD25⁺ regulatorischen T Zellen (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Syndrom, **IPEX** durch Mutation von *Foxp3*) zur Ausbildung eines schweren Ekzems, hohen IgE Konzentrationen, Eosinophilie und Nahrungsmittelallergien führt. CD25⁺CD4⁺ T Zellen scheinen somit nicht nur an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen durch den Erhalt einer immunologischen Selbsttoleranz beteiligt zu sein, sondern verhindern wahrscheinlich auch die Entwicklung allergischer Erkrankungen wie Asthma Bronchiale (111).

So konnte gezeigt werden, dass T Zellen mit experimentell gesteigerter TGF- β Sekretion, nicht jedoch IFN- γ sezernierende T_H1 Zellen, die Entstehung von allergischer Atemwegsinfektion und Atemwegshyperreagibilität (AHR) inhibieren (112). Außerdem verstärkte die Blockade von TGF- β allergische Atemwegsinfektionen und AHR, ein weiterer Hinweis darauf, dass TGF- β sezernierende T Zellen allergisch-entzündliche Atemwegsinfektionen verhindern. (113). Doch entzündlichen Reaktionen bei allergischem Asthma bronchiale können nicht nur durch TGF- β , sondern auch durch IL-10 sezernierende Zellen reduziert werden. So konnte analog hierzu gezeigt werden, dass T Zellen mit experimentell

gesteigerter IL-10 Sekretion die Ausbildung von allergischer Atemwegsinfektion und AHR deutlich hemmen können (95, 114).

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass bestimmte Zellpopulationen, die sich von T_H1 Zellen unterscheiden, die Atemwegsinfektion bei Asthma bronchiale verhindern können, und dass TGF- β und IL-10 die Entstehung dieser Erkrankungen inhibieren. Diese Untersuchungen unterstützen somit die Vorstellung, dass immunologische Toleranz, abhängig von TGF- β und IL-10, an dem Schutz gesunder Individuen, an Asthma bronchiale zu erkranken, wesentlich beteiligt ist. Unklar ist jedoch, welche der bekannten regulatorischen T Zellen die Entstehung dieser Krankheiten kontrollieren (115).

Wahrscheinlich sind T_H3 Zellen vorwiegend an der Regulation gastrointestinaler Erkrankungen beteiligt, während T_R1 Zellen bei respiratorischen Erkrankungen eine vornehmliche Rolle spielen (116). So konnte gezeigt werden, dass DCs der Atemwege in entscheidendem Maße IL-10 produzieren (Entstehung von T_R1 Zellen), wohingegen gastrointestinale DCs sowohl IL-10 als auch TGF- β synthetisieren (Entstehung von T_H3 Zellen) (19). T_R1 sowie adaptive regulatorische T Zellen verhindern T_H1 und T_H2 polarisierte Immunantworten (117) und Atemwegshyperreaktivität in Mäusen (96). In Mäusen inhibieren $CD4^+CD25^+$ Zellen eine Eosinophilie der Atemwege (118), aber verhindern nicht die Entstehung einer AHR (119). Beim Menschen induziert eine konventionelle Hyposensibilisierungstherapie $CD4^+CD25^+$ T Zellen (120), doch es ist bisher nicht eindeutig zu unterscheiden, ob diese $CD25^+$ Zellen wirklich regulatorische oder lediglich aktivierte T Zellen sind. Schließlich scheinen NKT Zellen bei der Entstehung allergischer Atemwegserkrankungen in Mäusen eine wichtige Rolle zu spielen (85), doch die Bedeutung dieser Zellen in menschlichem Asthma bronchiale ist derzeit noch unklar. Sicher ist, dass für das Verständnis regulatorischer T Zellen in allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale noch eine Vielzahl an weiterführenden Untersuchungen wichtig sind.

3.4 Einfluss von Kortikosteroiden auf die Entstehung einer immunologischen Toleranz

Die normale Reaktion des Immunsystems der Lunge auf inhalierte Antigene ist die Ausbildung einer mukosalen Toleranz, welche eine allergische Atemwegsinflammation verhindert (19, 58, 121-123). Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit Kortikosteroiden die Ausbildung einer solchen Toleranz verhindert. Die Behandlung mit Dexamethason blockierte ebenso die Produktion von IL-10 in pulmonalen DCs, welche keine Toleranz oder die Entstehung von regulatorischen T Zellen mehr induzieren konnten. Während Kortikosteroide während ihrer Applikation proinflammatorische Immunantworten effektiv unterdrücken können (124), so verhindern sie gleichzeitig die Entstehung protektiver Immunantworten und die Ausbildung einer immunologischen Toleranz.

Kortikosteroide sind stark wirksame antientzündliche Medikamente, die bei vielen Krankheiten die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Funktion von Effektorzellen blockieren. Im Falle einer allergischen Atemwegsinflammation in Mäusen und beim Menschen konnte gezeigt werden (125), dass die akute allergische Entzündung durch Kortikoidgabe verhindert, und somit die Atemwegsreaktivität verbessert werden konnte. Ursache hierfür war eine reduzierte Zytokinproduktion von T Zellen und Epithelzellen, was eine verminderte Infiltration von eosinophilen Granulozyten zur Folge hatte (124, 126). Aufgrund dieser Effekte sind Kortikosteroide die Therapie der Wahl bei akutem und chronischen Bronchialasthma (127, 128).

Die Therapie mit Kortikosteroiden hat jedoch auch Nachteile. Trotz der weit verbreiteten Verwendung von Kortikosteroiden ist die Prävalenz von Asthma und allergischen Erkrankungen in den letzten Dekaden dramatisch gestiegen. Kortikosteroide nehmen keinen Einfluss auf die zugrunde liegende Pathophysiologie allergischer Erkrankungen, und nach Beendigung der Kortikosteroidtherapie flammen die Symptome rasch wieder auf (5). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Kortikosteroiden während einer Exposition mit Allergenen die Sensibilisierung nicht verhindert, sondern diese noch verstärkt (129).

Kortikosteroide können T_H2 polarisierte Immunantworten mit Hilfe verschiedener Mechanismen verstärken. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Kortikosteroide die IL-4 vermittelte Produktion von IgE durch periphere B Zellen in vitro verstärken kann

(130-134). Auch in vivo verursacht die Gabe von Kortikosteroiden eine transiente IgE Erhöhung (135, 136). Kortikosteroide inhibieren die IL-12 Sekretion durch antigenpräsentierende Zellen (6, 137-143) und supprimieren direkt die Differenzierung von T_H1 Zellen (144). Unsere Untersuchungen belegen, dass noch ein weiterer Mechanismus zur Verstärkung der allergischen Sensibilisierung beitragen könnte: die Inhibition einer Entwicklung von immunologischer Toleranz und regulatorischen T Zellen. Wir konnten zeigen, dass Kortikosteroide die Produktion von IL-10 durch DCs blockierten, einem für die Induktion einer mukosalen Toleranz essentiellen Mechanismus (19). Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Entwicklung von regulatorischen T Zellen durch die Gabe von Kortikosteroiden stärker beeinflusst wird als die Entstehung von T_H2 Zellen (145). Dies führte zu einer verminderten Entstehung von regulatorischen, und zu einer vermehrten Generation von T_H2 Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kortikosteroide eine Gruppe von hochpotenten anti-entzündlichen Medikamenten darstellt, welche für die Therapie akut entzündlicher Zustände beim Asthma bronchiale von unschätzbarem Wert sind. Die Verhinderung protektiver Immunantworten jedoch ist auf längere Sicht hin besorgniserregend. Allergenspezifische regulatorische T Zellen finden sich in höherer Anzahl in gesunden im Vergleich zu atopischen Individuen und sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass gesunde Individuen keine allergischen Krankheiten entwickeln (58). Die immunmodulatorischen, und auch langfristig wirksamen Eigenschaften einer spezifischen Immuntherapie scheinen auf der Induktion von regulatorischen T Zellen zu beruhen (146, 147). Eine Blockade solcher protektiver Immunantworten durch Kortikosteroide ist langfristig nicht wünschenswert. Da Kortikosteroide eine T_H2 Polarisierung verstärken (6, 129, 133, 142), die Entstehung regulatorischer T Zellen jedoch blockieren können, würde eine wiederholte Allergenexposition ohne die Existenz schützender T_{Reg} Zellen stärkere T_H2 Immunantworten zur Folge haben. Hierfür gibt es Hinweise aus klinischen Untersuchungen von Kindern, welche mit inhalativen Kortikosteroiden über längere Zeit behandelt wurden (148).

Es kann spekuliert werden, dass die zunehmende Verwendung von Kortikosteroiden zur Behandlung allergischer Krankheiten in den letzten Dekaden zu der steigenden Prävalenz atopischer Erkrankungen (149) beigetragen hat. Da Kortikosteroide jedoch die derzeit effektivsten Arzneimittel zur Blockade allergischer Entzündungsprozesse

darstellen, kann auf ihre Verwendung nicht verzichtet werden. Kortikosteroide sollten jedoch mit Bedacht angewendet werden, und sollten in der niedrigst möglichen Dosis und für die kürzest mögliche Dauer verschrieben werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Allergische Erkrankungen wie Asthma Bronchiale sind weit verbreitet und es gibt gegenwärtig keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten. Heutige Therapien sind rein symptomatisch orientiert und basieren auf einer chronischen Erhaltungstherapie. Im Gegensatz dazu würden kurative Therapieformen nicht nur die zugrunde liegende Entzündungsreaktion eliminieren, sondern eine „protektive“ Immunität induzieren. Dies scheint möglich, da neuere epidemiologische Studien zeigen, dass der direkte Kontakt mit Tieren auf Bauernhöfen (150) oder das Auftreten bestimmter Infektionen (151-153) stark mit dem Schutz vor allergischen Erkrankungen und Asthma korreliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass konventionelle Hyposensibilisierungstherapien im frühen Kindesalter eine protektive Immunantwort induzieren (154).

Das Auftreten protektiver oder regulatorischer T Zellen wurde mehrfach beschrieben, doch die biologischen Funktionen dieser T_{Reg} Zellen sind bislang ungeklärt. Dies liegt erstens daran, dass keine spezifischen Oberflächenmerkmale von T_{Reg} Zellen bekannt sind. Zweitens existieren derzeit kaum Möglichkeiten, T_{Reg} Zellen gezielt in vivo zu induzieren. Wir haben im Mausmodell Verfahren entwickelt, T_{Reg} Zellen in Mäusen systematisch herzustellen und diese zu untersuchen.

Ziel meiner Arbeiten ist es, die Zusammenhänge zu verstehen, die allergische Entzündungsreaktionen induzieren. Wesentliches Ziel hierbei ist es zu verstehen, welche immunologischen Mechanismen gesunde Individuen vor der Ausbildung allergischer Erkrankungen schützen. Immunologische Toleranz, und insbesondere regulatorische T Zellen scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen. Je besser wir die biologischen Funktionen von T_{Reg} Zellen kennen, und je genauer wir verstehen, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass aus naiven T Zellen Regulatoren und nicht Effektoren des Immunsystems werden, desto rascher können wir die Eignung dieser Zellen in zukünftigen, kurativ orientierten, Therapieformen analysieren.

5 Literaturverzeichnis

1. 1998. Forecasted state-specific estimates of self-reported asthma prevalence--United States, 1998. *Mmwr.Morbidity and Mortality Weekly Report* 47:1022-1025.
2. Murray, C. S., A. Woodcock, S. J. Langley, J. Morris, and A. Custovic. 2006. Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy INfants (IFWIN): double-blind, randomised, controlled study. *Lancet* 368:754-762.
3. Guilbert, T. W., W. J. Morgan, R. S. Zeiger, D. T. Mauger, S. J. Boehmer, S. J. Szeffler, L. B. Bacharier, R. F. Lemanske, Jr., R. C. Strunk, D. B. Allen, G. R. Bloomberg, G. Heldt, M. Krawiec, G. Larsen, A. H. Liu, V. M. Chinchilli, C. A. Sorkness, L. M. Taussig, and F. D. Martinez. 2006. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *The New England journal of medicine* 354:1985-1997.
4. Bisgaard, H., M. N. Hermansen, L. Loland, L. B. Halkjaer, and F. Buchvald. 2006. Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *The New England journal of medicine* 354:1998-2005.
5. 2000. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *The New England journal of medicine* 343:1054-1063.
6. 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 lymphocytes. *J.Immunol.* 158:5589-5595.
7. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann.Rev.Immunol.* 7:145-173.
8. 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.
9. Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann.Rev.Immunol.* 12:227-257.
10. Romagnani, S. 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *Journal of clinical immunology* 15:121-129.
11. Umetsu, D. T., and R. H. DeKruyff. 1997. Th1 and Th2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J.Aller.Clin.Immunol.* 100:1-6.
12. Dumoutier, L., J. Louahed, and J. C. Renauld. 2000. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 164:1814-1819.
13. Goetzl, E. J. 2006. Changing paradigms in the immunologic science of allergy. *Current allergy and asthma reports* 6:1-3.
14. Romagnani, S. 2006. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 61:3-14.
15. Chatila, T. A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116:949-959; quiz 960.
16. 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.
17. 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 (New York, N. Y)* 265:1237-1240.
18. 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.
19. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells secreting IL-10 mediate T cell tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunol.* 2:725-731.
20. 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.
21. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine* 13:139-145.

22. Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, and D. M. Pardoll. 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329:251-254.
23. Crispe, I. N., M. W. Moore, L. A. Husmann, L. Smith, M. J. Bevan, and R. P. Shimonkevitz. 1987. Differentiation potential of subsets of CD4-8- thymocytes. *Nature* 329:336-339.
24. Budd, R. C., G. C. Miescher, R. C. Howe, R. K. Lees, C. Bron, and H. R. MacDonald. 1987. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 166:577-582.
25. Ballas, Z. K., and W. Rasmussen. 1990. NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol* 145:1039-1045.
26. Sykes, M. 1990. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol* 145:3209-3215.
27. Ohteki, T., R. Okuyama, S. Seki, T. Abo, K. Sugiura, A. Kusumi, T. Ohmori, H. Watanabe, and K. Kumagai. 1992. Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* 149:1562-1570.
28. Watanabe, H., C. Miyaji, Y. Kawachi, T. Iiai, K. Ohtsuka, T. Iwanaga, H. Takahashi-Iwanaga, and T. Abo. 1995. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 155:2972-2983.
29. Eberl, G., and H. R. MacDonald. 1998. Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9:345-353.
30. Yoshimoto, T., and W. E. Paul. 1994. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *The Journal of experimental medicine* 179:1285-1295.
31. Yoshimoto, T., A. Bendelac, C. Watson, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1995. Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science (New York, N.Y)* 270:1845-1847.
32. Yoshimoto, T., A. Bendelac, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1995. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11931-11934.
33. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of alpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science (New York, N.Y)* 278:1626-1629.
34. Adachi, Y., H. Koseki, M. Zijlstra, and M. Taniguchi. 1995. Positive selection of invariant V alpha 14+ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:1200-1204.
35. Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *The Journal of experimental medicine* 180:1097-1106.
36. Bendelac, A., N. Killeen, D. R. Littman, and R. H. Schwartz. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science (New York, N.Y)* 263:1774-1778.
37. Bix, M., N. S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch, and D. Raulet. 1991. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349:329-331.
38. Coles, M. C., and D. H. Raulet. 1994. Class I dependence of the development of CD4+ CD8- NK1.1+ thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 180:395-399.
39. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and R. R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science (New York, N.Y)* 268:863-865.
40. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 182:2091-2096.
41. Chen, Y. H., N. M. Chiu, M. Mandal, N. Wang, and C. R. Wang. 1997. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6:459-467.
42. Mendiratta, S. K., W. D. Martin, S. Hong, A. Boesteanu, S. Joyce, and L. Van Kaer. 1997. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6:469-477.
43. Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B. C. Sydora, N. Burdin, R. L. Modlin, and M. Kronenberg. 1997. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* 159:1216-1224.

44. Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annual review of immunology* 17:297-329.
45. Maher, J. K., and M. Kronenberg. 1997. The role of CD1 molecules in immune responses to infection. *Current opinion in immunology* 9:456-461.
46. Bonish, B., D. Jullien, Y. Dutronc, B. B. Huang, R. Modlin, F. M. Spada, S. A. Porcelli, and B. J. Nickoloff. 2000. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 165:4076-4085.
47. Kronenberg, M., and L. Gapin. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nature reviews* 2:557-568.
48. Zeng, Z., A. R. Castano, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. 1997. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science (New York, N.Y)* 277:339-345.
49. Morita, M., K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koezuka, E. Kobayashi, and H. Fukushima. 1995. Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *Journal of medicinal chemistry* 38:2176-2187.
50. Burdin, N., L. Brossay, Y. Koezuka, S. T. Smiley, M. J. Grusby, M. Gui, M. Taniguchi, K. Hayakawa, and M. Kronenberg. 1998. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* 161:3271-3281.
51. Couedel, C., M. A. Peyrat, L. Brossay, Y. Koezuka, S. A. Porcelli, F. Davodeau, and M. Bonneville. 1998. Diverse CD1d-restricted reactivity patterns of human T cells bearing "invariant" AV24BV11 TCR. *European journal of immunology* 28:4391-4397.
52. Spada, F. M., Y. Koezuka, and S. A. Porcelli. 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *The Journal of experimental medicine* 188:1529-1534.
53. Apostolou, I., Y. Takahama, C. Belmant, T. Kawano, M. Huerre, G. Marchal, J. Cui, M. Taniguchi, H. Nakauchi, J. J. Fournie, P. Kourilsky, and G. Gachelin. 1999. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5141-5146.
54. Gumperz, J. E., C. Roy, A. Makowska, D. Lum, M. Sugita, T. Podrebarac, Y. Koezuka, S. A. Porcelli, S. Cardell, M. B. Brenner, and S. M. Behar. 2000. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12:211-221.
55. Schofield, L., M. J. McConville, D. Hansen, A. S. Campbell, B. Fraser-Reid, M. J. Grusby, and S. D. Tachado. 1999. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science (New York, N.Y)* 283:225-229.
56. Kemeny, D. M., R. Urbanek, P. Ewan, S. McHugh, D. Richards, S. Patel, and M. H. Lessof. 1989. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 19:545-549.
57. Till, S., S. Durham, R. Dickason, D. Huston, J. Bungre, S. Walker, D. Robinson, A. B. Kay, and C. Corrigan. 1997. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology* 91:53-57.
58. 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. *The Journal of experimental medicine* 199:1567-1575.
59. Corrigan, C. J., and A. B. Kay. 1990. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141:970-977.
60. Cembrzynska-Nowak, M., E. Szklarz, A. D. Ingot, and J. A. Teodorczyk-Injeyan. 1993. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *The American review of respiratory disease* 147:291-295.
61. 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.
62. Lambrecht, B. N., B. Salomon, D. Klatzmann, and R. A. Pauwels. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 160:4090-4097.
63. Corrigan, C. J., A. Hartnell, and A. B. Kay. 1988. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1:1129-1132.

64. Walker, C., M. K. Kaegi, P. Braun, and K. Blaser. 1991. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 88:935-942.
65. Robinson, D., Q. Hamid, A. Bentley, S. Ying, A. B. Kay, and S. R. Durham. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 92:313-324.
66. Keane-Myers, A. M., W. C. Gause, F. D. Finkelman, X. D. Xhou, and M. Wills-Karp. 1998. Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. *J.Immunol.* 160:1036-1043.
67. Coffman, R. L., B. W. P. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Cherwinski, H. F. J. Savelkoul, F. D. Finkelman, M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol.Rev.* 102:5-28.
68. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N.Engl.J.Med.* 326:298-304.
69. Kay, A. B., S. Ying, V. Varney, M. Gaga, S. R. Durham, R. Moqbel, A. J. Wardlaw, and Q. Hamid. 1991. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J.Exp.Med.* 173:775-778.
70. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England journal of medicine* 326:298-304.
71. Del Prete, G. F., M. De Carli, M. M. D'Elis, P. Maestrelli, M. Ricci, L. Fabbri, and S. Romagnani. 1993. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *European journal of immunology* 23:1445-1449.
72. Nakajima, H., I. Iwamoto, S. Tomoe, R. Matsumura, H. Tomioka, K. Takatsu, and S. Yoshida. 1992. CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *The American review of respiratory disease* 146:374-377.
73. Gavett, S. H., X. Chen, F. Finkelman, and M. Wills-Karp. 1994. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10:587-593.
74. 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.
75. Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, and E. von Mutius. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England journal of medicine* 347:869-877.
76. Gerhold, K., K. Bluemchen, A. Franke, P. Stock, and E. Hamelmann. 2003. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112:389-396.
77. Gerhold, K., K. Blumchen, A. Bock, C. Seib, P. Stock, T. Kallinich, M. Lohning, U. Wahn, and E. Hamelmann. 2002. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 110:110-116.
78. Croft, M., L. Carter, S. L. Swain, and R. W. Dutton. 1994. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *The Journal of experimental medicine* 180:1715-1728.
79. Erard, F., M. T. Wild, J. A. Garcia-Sanz, and G. Le Gros. 1993. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science (New York, N. Y)* 260:1802-1805.
80. Hsu, C. H., K. Y. Chua, M. H. Tao, Y. L. Lai, H. D. Wu, S. K. Huang, and K. H. Hsieh. 1996. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nature medicine* 2:540-544.
81. Renz, H., G. Lack, J. Saloga, R. Schwizler, K. Bradley, J. Loader, A. Kupfer, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1994. Inhibition of IgE production and normalization of airways

- responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol* 152:351-360.
82. McMenamin, C., and P. G. Holt. 1993. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J.Exp.Med.* 178:889-899.
83. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T. A. Potter, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *The Journal of experimental medicine* 183:1719-1729.
84. Schwarze, J., G. Cieslewicz, A. Joetham, T. Ikemura, E. Hamelmann, and E. W. Gelfand. 1999. CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 162:4207-4211.
85. Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Grusby, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 9:582-588.
86. Meyer, E. H., S. Goya, O. Akbari, G. J. Berry, P. B. Savage, M. Kronenberg, T. Nakayama, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2006. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2782-2787.
87. Cui, J., N. Watanabe, T. Kawano, M. Yamashita, T. Kamata, C. Shimizu, M. Kimura, E. Shimizu, J. Koike, H. Koseki, Y. Tanaka, M. Taniguchi, and T. Nakayama. 1999. Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated V α 14 natural killer T cells. *The Journal of experimental medicine* 190:783-792.
88. Lohning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H. W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann, and R. A. Kroccek. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 197:181-193.
89. 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. *Nature Medicine* 8:1024-1032.
90. Gilliet, M., and Y. J. Liu. 2002. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 63:1149-1155.
91. Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:233-238.
92. Makela, M. J., A. Kanehiro, L. Borish, A. Dakhama, J. Loader, A. Joetham, Z. Xing, M. Jordana, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 2000. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 97:6007-6012.
93. Levings, M. K., and M. G. Roncarolo. 2000. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J.Allergy Clin.Immunol.* 106:S109-S112.
94. Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich, and K. Blaser. 1998. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J.Clin.Invest.* 102:98-106.
95. Oh, J. W., C. M. Seroogy, E. H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C. G. Fathman, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. CD4 T helper cells engineered to produce IL-10 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 110:460-468.
96. 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. *Nature medicine* 8:1024-1032.
97. Weninger, W., M. A. Crowley, N. Manjunath, and U. H. von Andrian. 2001. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 194:953-966.
98. Seder, R. A., J. L. Boulay, F. Finkelman, S. Barbier, S. Z. Ben-Sasson, G. Le Gros, and W. E. Paul. 1992. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J.Immunol.* 148:1652-1656.

99. Smiley, S. T., M. H. Kaplan, and M. J. Grusby. 1997. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science (New York, N.Y)* 275:977-979.
100. Korsgren, M., C. G. Persson, F. Sundler, T. Bjerke, T. Hansson, B. J. Chambers, S. Hong, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren, and O. Korsgren. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *The Journal of experimental medicine* 189:553-562.
101. Corry, D. B., H. G. Folkesson, M. L. Warnock, D. J. Erle, M. A. Mathay, J. P. Wiener-Kronish, and R. M. Locksley. 1996. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J.Exp.Med.* 183:109-117.
102. Bryan, S. A., M. J. Leckie, T. T. Hansel, and P. J. Barnes. 2000. Novel therapy for asthma. *Expert Opin Investig Drugs* 9:25-42.
103. Zhang, Y., K. H. Rogers, and D. B. Lewis. 1996. Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses. *The Journal of experimental medicine* 184:1507-1512.
104. Brown, D., D. Fowell, D. Corry, T. Wynn, N. Moskowitz, A. Cheever, R. Locksley, and S. Reiner. 1996. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *The Journal of experimental medicine* 184:1295-1304.
105. Illi, S., E. von Mutius, S. Lau, R. Nickel, B. Niggemann, C. Sommerfeld, and U. Wahn. 2001. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:709-714.
106. Van Eerdewegh, P., R. D. Little, J. Dupuis, D. M. R.G, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. Allen, A. Pedan, M. Danzig, S. Umland, R. Egan, F. Cuss, S. Rorke, J. Clough, J. Holloway, S. Holgate, and T. Keith. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418:426-430.
107. Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, M. Exley, R. A. Schleipman, J. Glickman, D. T. Bailey, N. Corazza, S. P. Colgan, A. B. Onderdonk, and R. S. Blumberg. 2002. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nature medicine* 8:588-593.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Gambineri, E., T. Torgerson, and H. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 15:430-435.
112. Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2000. CD4+ Th Cells Engineered To Produce Latent TGF-b1 Reverse Allergen-Induced Airway Hyperreactivity and Inflammation. *J.Clin.Invest.* 11:89-96.
113. Nakao, A., S. Miike, M. Hatano, K. Okumura, T. Tokuhisa, C. Ra, and I. Iwamoto. 2000. Blockade of Transforming Growth Factor b/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J.Exp.Med.* 192:151-158.
114. Stampfli, M. R., M. Cwiartka, B. U. Gajewska, D. Alvarez, S. A. Ritz, M. D. Inman, Z. Xing, and M. Jordana. 1999. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *Am.J.Resp.Cell Mol.Biol.* 21:586-596.
115. Herrick, C. A., and K. Bottomly. 2003. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nature reviews* 3:405-412.
116. Weiner, H. L. 2001. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and Tr1 and Th3 regulatory cells. *Nature Immunol.* 2:671-672.
117. Cottrez, F., S. D. Hurst, R. L. Coffman, and H. Groux. 2000. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J.Immunol.* 165:4848-4853.
118. Suto, A., H. Nakajima, S. I. Kagami, K. Suzuki, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2001. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 164:680-687.

119. Hadeiba, H., and R. Locksley. 2003. Lung CD25⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells Suppress Type 2 Immune Responses But Not Bronchial Hyperreactivity. *J Immunol* 170:5502-5510.
120. Francis, J., S. Till, and S. Durham. 2003. Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:1255-1261.
121. Tsitoura, D. C., R. L. Blumenthal, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2000. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: Role of immune deviation and tolerance. *J.Aller.Clin.Immunol.* 106:239-246.
122. Seymour, B. W., L. J. Gershwin, and R. L. Coffman. 1998. Aerosol-induced immunoglobulin (Ig)-E unresponsiveness to ovalbumin does not require CD8⁺ or T cell receptor (TCR)-gamma/delta⁺ T cells or interferon (IFN)-gamma in a murine model of allergen sensitization. *J.Exp.Med.* 187:721-731.
123. McMenamin, C., C. Pimm, M. McKersey, and P. G. Holt. 1994. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen- specific gamma delta T cells. *Science (New York, N.Y)* 265:1869-1871.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. Uings, I. J., and S. N. Farrow. 2005. A pharmacological approach to enhancing the therapeutic index of corticosteroids in airway inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* 5:221-226.
128. Adams, N., J. Bestall, T. Lasserson, and P. Jones. 2005. Inhaled fluticasone versus placebo for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003135.
129. 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.
130. Jabara, H. H., R. Loh, N. Ramesh, D. Vercelli, and R. S. Geha. 1993. Sequential switching from mu to epsilon via gamma 4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J Immunol* 151:4528-4533.
131. Jabara, H. H., D. J. Ahern, D. Vercelli, and R. S. Geha. 1991. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol* 147:1557-1560.
132. Jabara, H. H., S. R. Brodeur, and R. S. Geha. 2001. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. *The Journal of clinical investigation* 107:371-378.
133. 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.
134. Wu, C. Y., M. Sarfati, C. Heusser, S. Fournier, M. Rubio-Trujillo, R. Peleman, and G. Delespesse. 1991. Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 87:870-877.
135. Zieg, G., G. Lack, R. J. Harbeck, E. W. Gelfand, and D. Y. Leung. 1994. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J.Aller.Clin.Immunol.* 94:222-230.
136. Settupane, G. A., R. K. Pudupakkam, and J. H. McGowan. 1978. Corticosteroid effect on immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 62:162-166.
137. 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. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:242-249.
138. Canning, M. O., K. Grotenhuis, H. J. de Wit, and H. A. Drexhage. 2000. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 143:687-695.

139. de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, and M. L. Kapsenberg. 1999. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol* 66:201-204.
140. Rea, D., C. Van Kooten, K. E. van Meijgaarden, T. H. Ottenhoff, C. J. Melief, and R. Offringa. 2000. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95:3162-3167.
141. Visser, J., A. van Boxel-Dezaire, D. Methorst, T. Brunt, E. R. de Kloet, and L. Nagelkerken. 1998. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood* 91:4255-4264.
142. 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 interleukin-12 production. *J.Immunol.* 160:2231-2237.
143. Vieira, P. L., P. Kalinski, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 1998. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J.Immunol.* 161:5245-5251.
144. Miyaura, H., and M. Iwata. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 168:1087-1094.
145. Hemady, Z., S. Gellis, M. Chambers, and R. E. Rocklin. 1985. Effect of dexamethasone on de novo IgE synthesis by human blood lymphocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 75:304-312.
146. 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). *The Journal of allergy and clinical immunology* 109:251-256.
147. Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2003. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current opinion in immunology* 15:627-633.
148. 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.
149. Bach, J. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347:911-920.
150. 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.
151. von Mutius, E. 2000. The environmental predictors of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:9-19.
152. Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimazu, and J. M. Hopkin. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275:77-79.
153. Ball, T. M., J. A. Castro-Rodriguez, K. A. Griffith, C. J. Holberg, F. D. Martinez, and A. L. Wright. 2000. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.* 343:538-543.
154. Valovirta, E. 1999. PAT--the Preventive Allergy Treatment Study design and preliminary results. *Wien Med Wochenschr* 149:442-443.

6 Danksagung

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Insbesondere trifft das auf Herrn Prof. Dr. Ulrich Wahn zu, dem ich herzlich für seine andauernde Unterstützung und Ermutigung, sowohl bei meiner klinischen Ausbildung als auch bei meinen Forschungsarbeiten, danken möchte. Dank gilt außerdem Prof. Dr. Eckard Hamelmann, der mich über viele Jahre unterstützt hat und mir insbesondere beim Aufbau meiner eigenen Arbeitsgruppe sehr geholfen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dale T Umetsu, in dessen Arbeitsgruppe ich zweieinhalb Jahre verbringen und in dessen Labor ich die Grundlagen der Immunologie lernen durfte. Weiterhin danke ich den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, ohne deren Hilfe und Zusammenarbeit viele dieser Arbeiten nicht abgeschlossen worden wären. Insbesondere gilt das für Prof. Dr. Omid Akbari, der mich in unzähligen Gesprächen mit seiner Leidenschaft für die Immunologie begeistert und mir eine großartige Freundschaft geschenkt hat.

Schließlich gilt mein inniger Dank meinen Eltern für Ihre immerwährende Unterstützung und für ihren Beistand, auf den ich mich in jeder Phase meines Lebens verlassen kann.

Zutiefst dankbar bin ich für die geduldige Anteilnahme und die ständigen Ermutigungen durch meine Frau Antje, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Dank gebührt ebenfalls unseren drei Kindern, die mich durch ihren scheinbar nie erlöschenden Optimismus stets motiviert haben.

7 Eidesstattliche Versicherung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den _____
Datum

Unterschrift