

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

DISSERTATION

Induktion einer spezifischen Immuntoleranz durch
hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes* und Flagellin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hendrik Wiesner

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | ABSTRAKT / ABSTRACT | 4 |
| 1.1 | ABSTRAKT..... | 4 |
| 1.2 | ABSTRACT..... | 5 |
| 2. | EINLEITUNG | 7 |
| 2.1 | EIN ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM..... | 8 |
| 2.2 | LYMPHOZYTEN..... | 9 |
| 2.2.1 | <i>T-Zellen</i> | 9 |
| 2.2.2 | <i>Effektor-T-Helfer-Zellen</i> | 11 |
| 2.2.3 | <i>Regulatorische T-Zellen</i> | 12 |
| 2.3 | MHC-MOLEKÜLE | 15 |
| 2.4 | ANTIGENPRÄSENTATION..... | 16 |
| 2.4.1 | <i>Dendritische Zellen</i> | 16 |
| 2.4.2 | <i>Monozyten / Makrophagen</i> | 17 |
| 2.4.3 | <i>B-Zellen</i> | 17 |
| 2.5 | ALLERGISCHE REAKTIONEN VOM TYP 1..... | 18 |
| 2.6 | URSACHEN FÜR DIE ENTSTEHUNG VON ALLERGIEN..... | 19 |
| 2.7 | IMMUNTOLERANZ | 21 |
| 2.8 | WIESENLIESCHGRAS (<i>PHLEUM PRATENSE</i>) | 22 |
| 2.9 | HITZEINAKTIVIERTE LISTERIA MONOZYTOGENES UND FLAGELLIN | 22 |
| 2.10 | HKL UND FLAGELLIN ALS IMMUNADJUVANS | 23 |
| 2.11 | KOSTIMULATION UND CLUSTER OF DIFFERENTIATION | 24 |
| 2.11.1 | <i>CD3, CD4 und CD8</i> | 25 |
| 2.11.2 | <i>CD25</i> | 25 |
| 2.11.3 | <i>CD28, CTLA-4 und ICOS</i> | 26 |
| 2.12 | ZYTOKINE | 28 |
| 2.13 | TRANSKRIPTION UND TRANSKRIPTIONSFAKTOREN..... | 29 |
| 2.13.1 | <i>FoxP3</i> | 29 |
| 2.14 | APOPTOSE | 30 |
| 3. | HERLEITUNG EINER AUFGABENSTELLUNG..... | 32 |
| 3.1 | ZUGRUNDELIEGENDE EXPERIMENTE IM MURINEN MODELL..... | 32 |
| 3.2 | FLAGELLIN | 33 |
| 3.3 | HYPOTHESEN | 34 |
| 4. | MATERIAL UND METHODEN | 36 |
| 4.1 | GERÄTE, VERBRAUCHSGÜTER UND VERWENDETE LÖSUNGEN..... | 36 |
| 4.1.1 | <i>Geräte</i> | 36 |
| 4.1.2 | <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 37 |
| 4.1.3 | <i>Verwendete Software</i> | 37 |
| 4.1.4 | <i>Verwendete Lösungen</i> | 38 |
| 4.1.5 | <i>β-Mercaptoethanol (2ME)-Arbeitslösung</i> | 39 |
| 4.1.6 | <i>Kulturmedium</i> | 40 |
| 4.1.7 | <i>Allergenextrakte, HKL und Flagellin</i> | 40 |
| 4.2 | METHODEN | 41 |
| 4.2.1 | <i>Probandenauswahl</i> | 41 |
| 4.2.2 | <i>PBMC</i> | 42 |
| 4.2.3 | <i>Zellkultur</i> | 43 |
| 4.2.4 | <i>Mikroskopie</i> | 44 |
| 4.2.5 | <i>Durchflusszytometrie</i> | 44 |
| 4.2.6 | <i>CFSE-Färbung</i> | 46 |
| 4.2.7 | <i>Apoptose-Nachweis</i> | 49 |
| 4.2.8 | <i>Färbungen in der Durchflusszytometrie</i> | 50 |
| 4.2.9 | <i>Messung intrazellulärer Zytokine</i> | 51 |
| 4.2.10 | <i>Setzen der Analysefenster</i> | 53 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5. | ERGEBNISSE | 55 |
| 5.1 | NACHWEIS DER LIESCHGRASSPEZIFITÄT DER PROLIFERATION | 55 |
| 5.2 | VERGLEICH DER ALLERGENEXTRAKTE | 59 |
| 5.3 | DURCHFÜHRUNG EINER ZEITKINETIK | 60 |
| 5.4 | EXPRESSION VON CD25 IM RAHMEN DER PROLIFERATION | 63 |
| 5.5 | SUPPRESSION DURCH HKL | 64 |
| 5.5.1 | <i>Expression von CTLA-4 und ICOS</i> | 66 |
| 5.6 | SUPPRESSION DURCH FLAGELLIN | 67 |
| 5.7 | MESSUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS FOXP3 | 68 |
| 5.7.1 | <i>FoxP3-Expression nach Suppression mit HKL</i> | 68 |
| 5.7.2 | <i>FoxP3-Expression nach Suppression mit Flagellin</i> | 69 |
| 5.8 | ZY TOKINMESSUNGEN | 71 |
| 5.8.1 | <i>Interleukin-4</i> | 72 |
| 5.8.2 | <i>Interleukin 10</i> | 74 |
| 5.8.3 | <i>Interferon-γ</i> | 75 |
| 5.8.4 | <i>TGF-β / LAP</i> | 77 |
| 5.9 | APOPTOSE | 81 |
| 5.9.1 | <i>Induktion von Apoptose durch HKL</i> | 81 |
| 5.9.2 | <i>Zeitkinetik der Apoptose durch HKL</i> | 82 |
| 5.9.3 | <i>Apoptose durch HKL CD25^{high} gegenüber CD25^{low}</i> | 83 |
| 5.10 | ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE | 85 |
| 5.10.1 | <i>Entwicklung der Methode</i> | 85 |
| 5.10.2 | <i>Nachweis von Treg</i> | 86 |
| 6. | DISKUSSION | 88 |
| 6.1 | IST DIE PROLIFERATION IN UNSEREM MODELL ALLERGENSPEZIFISCH? | 88 |
| 6.2 | VERGLEICH DER ALLERGENEXTRAKTE | 90 |
| 6.3 | BESTIMMUNG OPTIMALER MESSTAGE | 91 |
| 6.4 | SUPPRESSION DER ALLERGENSPEZIFISCHEN PROLIFERATION | 93 |
| 6.5 | PHÄNOTYPISIERUNG REGULATORISCHER T-ZELLEN | 95 |
| 6.5.1 | <i>CD25, ICOS und CTLA-4</i> | 95 |
| 6.5.2 | <i>FoxP3</i> | 96 |
| 6.5.3 | <i>Zytokinmessungen</i> | 97 |
| 6.5.1 | <i>Zytokine innerhalb der CD25(+) Population</i> | 102 |
| 6.6 | APOPTOSE ALS MECHANISMUS DER IMMUNTOLERANZ | 103 |
| 6.7 | STÄRKEN UND SCHWÄCHEN UNSERES MODELLES | 104 |
| 6.7.1 | <i>Stärken</i> | 104 |
| 6.7.2 | <i>Schwächen</i> | 105 |
| 6.8 | UNTERSCHIEDE ZU DEN VERSUCHEN IM MURINEN MODELL | 106 |
| 6.9 | AUSBlick | 107 |
| 7. | ZUSAMMENFASSUNG | 108 |
| 8. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 110 |
| 9. | ABBILDUNGSVERZEICHNIS / TABELLEN | 111 |
| 9.1 | ABBILDUNGEN | 111 |
| 9.2 | TABELLEN | 112 |
| 10. | LITERATURVERZEICHNIS | 113 |
| 11. | EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG | 118 |
| 12. | CURRICULUM VITAE | 119 |
| 13. | DANKSAGUNG | 120 |

1. Abstrakt / Abstract

1.1. Abstrakt

Einleitung

Allergien sind ein weit verbreitetes medizinisches Problem. Die meisten Therapieansätze sind bisher jedoch rein symptomatisch. Um Allergien heilen zu können benötigen wir ein besseres Verständnis ihrer Ursachen.

Immuntoleranz beschreibt die erlernte Fähigkeit eines Lebewesens nicht auf ein Allergen zu reagieren. Regulatorische T-Zellen sind eng mit dieser Fähigkeit assoziiert. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, daß hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes* (HKL) im Zusammenspiel mit Allergenen Immuntoleranz induzieren können. Wir wollten wissen, ob sich dieser Effekt auch in einem menschlichen Zellkulturmodell aus PBMC nachweisen lässt.

Methoden

Wir entwickelten ein humanes Zellkulturmodell mit dem eine allergen-spezifische T-Zellproliferation gegen Wiesenlieschgras erreicht werden kann. Diese Proliferation wurde mittels HKL oder listerienspezifischem Flagellin wieder supprimiert. Die T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie genauer analysiert.

Ergebnisse

Auch wenn die Arbeit mit menschlichen PBMC deutlich heterogenere Ergebnisse erzielt als die Arbeit mit Labormäusen, konnten wir zum ersten Mal nachweisen, daß HKL in einem menschlichen Zellkulturmodell immunmodulatorische Fähigkeiten haben.

Noch vor den funktionell sichtbaren Effekten konnten wir eine gesteigerte Apoptose durch HKL messen. Somit könnte Apoptose ein wichtiger Mechanismus beim Erreichen von Immuntoleranz sein.

Der Nachweis von regulatorischen T-Zellen in unserem Modell ist jedoch schwierig. Die meisten Treg-Marker sind auch Aktivierungsmarker. In unseren allergischen Proben kam es zur stärksten Aktivierung. Somit sind Treg in unserem Modell nur indirekt messbar.

Fokussiert man jedoch auf die Zusammensetzung der CD25(+) Zellen, so sieht man eine vermehrte Expression Treg-spezifischer Marker durch HKL oder Flagellin.

Der beste Treg-Marker in unserem Modell war LAP. Hiermit können TGF- β -produzierende Zellen nachgewiesen werden.

Diskussion

HKL und Flagellin sind vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung einer kausalen Therapie von Allergien.

Wir fanden Hinweise, daß durch die gleichzeitige Inkubation von PBMC mit HKL oder Flagellin und Allergen regulatorische T-Zellen induziert werden. Wir vermuten, daß diese für die Suppression der allergenspezifischen Proliferation ursächlich sind.

Um die regulatorischen T-Zellen jedoch sicher in unserem Modell nachzuweisen und ihren Subtyp zu erfahren, sind bessere Treg-Marker erforderlich.

1.2. Abstract

Introduction

Allergies constitute a very common medical problem. Yet, most therapies so far are only symptomatic. To develop a cure, causes for allergies need to be better understood.

Immune tolerance describes a condition, in which a host has learned not to react against an allergen. Specific Regulatory T cells are key players in achieving immune tolerance.

It has been shown in mice, that Heat killed Listeria (HKL) in combination with allergen have the ability to induce immune tolerance. We wanted to test their effect on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro.

Methods

We developed a human cell culture model in which we achieved an allergen-specific T cell proliferation against timothy. This specific proliferation could then be suppressed with HKL or flagellin. We analyzed the expression of specific T cell Antigens using Flow cytometry.

Results

Although work with human PBMC delivers more heterogeneous results than work with laboratory mice, we were able to show for the first time that HKL have immunomodulatory abilities also in human PBMC.

Before functional effects were visible we observed an induction of apoptosis due to the HKL. This suggests that apoptosis is an essential mechanism in the induction of immune tolerance.

We also showed that listeria-specific flagellin has equal immunomodulatory abilities. This suggests that flagellin might be one of main tools of HKL in inducing immune tolerance.

However, the detection of Treg in our cell culture model has proven difficult. Most Treg markers are also upregulated upon T cell activation. We saw the strongest activation in our allergic samples. Therefore Treg were hidden in our model. They could, to some extent, be exposed by focusing on CD25(+) cells.

The best Treg marker in our model proved to be LAP, which detects TGF- β -producing cells.

Conclusion

We believe HKL and especially flagellin are possible candidates for developing a causal treatment of allergies.

We found clues that simultaneous incubation with flagellin and allergen led to the induction of Treg. We believe this caused the suppression of an allergen-specific T cell proliferation. However, better Treg markers are needed for further proof and characterization of the Treg subtypes involved.

2. Einleitung

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen wie der allergischen Rhinitis, Asthma oder dem atopischen Ekzem ist in den letzten 50 Jahren deutlich angestiegen^{1,2}.

Das höchste Ausmaß findet sich in der westlichen Welt. Innerhalb der pädiatrischen Patienten Deutschlands beträgt die 12-Monats-Prävalenz für eine allergische Erkrankung 16,1 %³. Wenn auch hier mittlerweile ein Hochplateau erreicht sein könnte¹, so nimmt in anderen Regionen der Welt wie Osteuropa, der Mongolei, China und sogar ländlichen Regionen Afrikas⁴ das Auftreten weiterhin zu.

Mit der adäquaten Behandlung dieser Patienten entwickeln sich auch progredient die Kosten für die betroffenen Volkswirtschaften. Somit steht hinter der Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen nicht nur ein ethisches und medizinisches Interesse, sondern auch ökonomische Motivation.

Mit Hilfe von epidemiologischen, experimentellen und klinischen Studien wird nach Wegen gesucht um den Trend wieder umzukehren. Benötigt werden tiefer greifende Erkenntnisse über die Pathogenese allergischer Erkrankungen, damit man sie entweder vermeiden lernt oder heilen kann.

Eine wesentliche Fähigkeit des Immunsystems ist die „Immuntoleranz“. Hierbei geht es nicht um die Suppression einer Immunantwort, sondern um die aktive Fähigkeit „pathogen“ von „nicht-pathogen“ zu unterscheiden. Regulatorischen T-Zellen (Treg) werden Schlüsselfunktionen bei dem Erreichen von Immuntoleranz zugeschrieben. Heute wissen wir, dass diese regulatorischen T-Zellen eine sehr heterogene Gruppe unterschiedlicher Zellen sind.

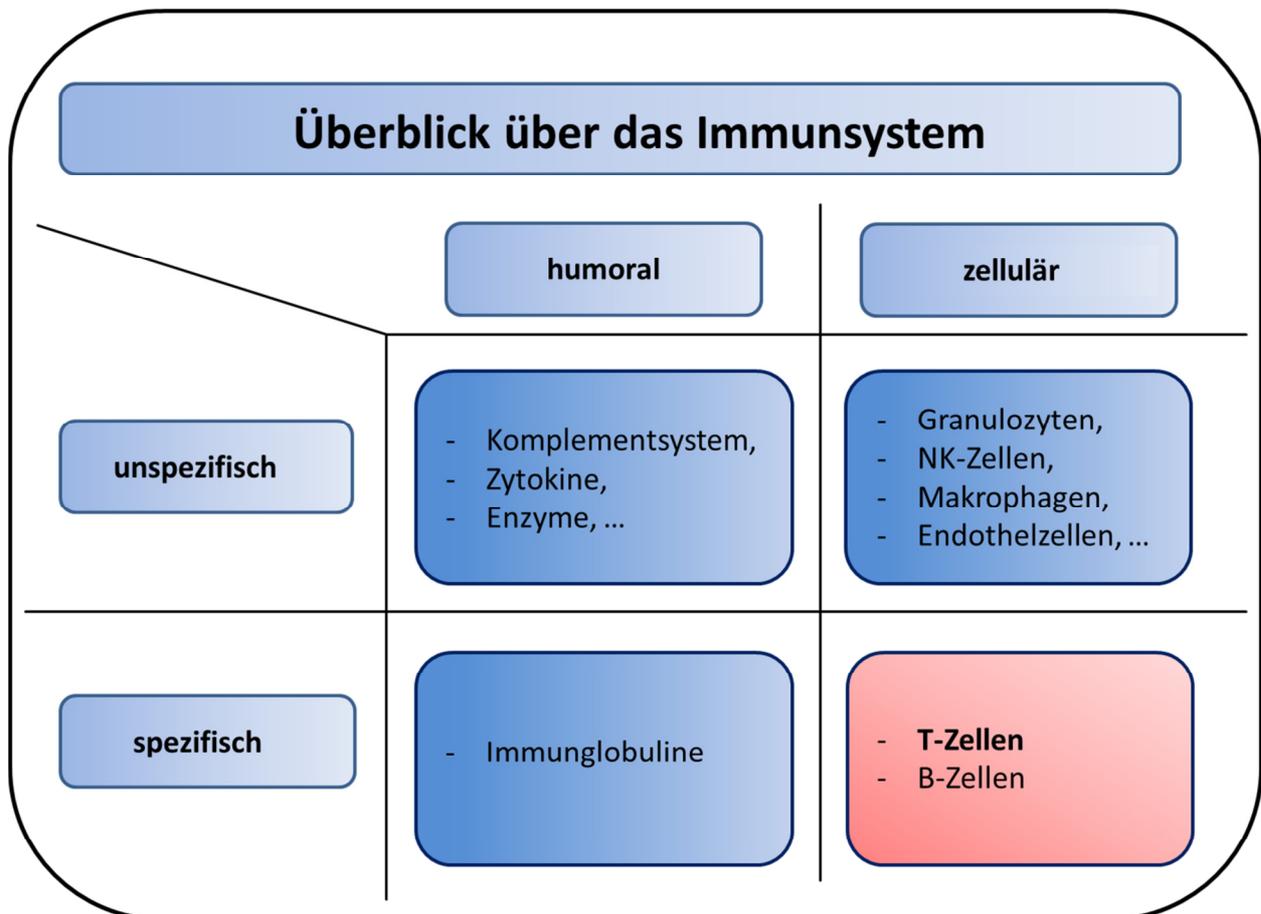
Regulatorische T-Zellen haben jedoch nicht nur Bedeutung bei der Regulation allergischer Erkrankungen. Sie entfalten ihre Funktionen auch im Rahmen von onkologischen und autoimmunen Prozessen. Die komplexen Vernetzungen des Immunsystems geben ihnen vielschichtige Aufgaben. Somit ist jeder Kenntniserwerb über den jeweils eigenen Fachbereich hinaus von Interesse.

Die folgende Arbeit befasst sich mit einem grundlagenorientierten Forschungsansatz zur Induktion regulatorischer T-Zellen in einem humanen Zellkultursystem. Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Dissertation bestand in der Etablierung der dargestellten Methode.

2.1. Ein Überblick über das Immunsystem

Um die Rolle regulatorischer T-Zellen im Rahmen einer Immunreaktion zu verstehen, sollte man sich ihre Stellung innerhalb des Immunsystems vergegenwärtigen. Ein Überblick soll im folgenden einleitenden Kapitel gewährt werden.

Abbildung 2.1: Überblick über das Immunsystem



Das Immunsystem setzt sich aus vier intensiv miteinander verzahnten Komponenten zusammen. Diese sind eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Komponente, die sich jeweils in einen humoralen und einen zellulären Teil aufgliedern lassen.

Im Falle des angeborenen Teils des Immunsystems wird der humorale Anteil im Wesentlichen durch das Komplementsystem, einigen Zytokinen und Enzymen gebildet, wohingegen die wichtigsten beteiligten Zellen Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen sind.

Der erworbene zelluläre Teil des Immunsystems wird von T-Lymphozyten gebildet, der erworbene humorale Teil durch die von Plasmazellen produzierten Immunglobuline.

2.2. Lymphozyten

Lymphoide Vorläuferzellen (Lymphoblasten) können sich zu drei verschiedenen Lymphozytenarten entwickeln. Dies sind B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen.

Die Hauptaufgabe von B-Lymphozyten beruht in der Produktion von Antikörpern gegen spezifische pathogene Antigene. NK-Zellen (natural killer cells) beseitigen hauptsächlich virusbefallene Zellen oder Tumor-Zellen.

Eine Ausnahme im Bereich der Lymphozyten stellen die NKT-Zellen dar. Sie tragen gleichzeitig Merkmale von NK-Zellen und T-Zellen. Sie entfalten ihre Wirkungen in viralen Infektionen, einigen Autoimmunerkrankungen und in der Tumorsuppression⁵.

2.2.1. T-Zellen

Abgesehen von wenigen Ausnahmen findet die Entstehung und Reifung von Lymphozyten in primären lymphatischen Organen statt. Diese sind beim Menschen das Knochenmark und der Thymus.

Die Entwicklung der B-Zellen wird weitgehend im Knochenmark abgeschlossen. Hingegen wandern T-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark in den Thymus, um dort ihre Reifung fortzusetzen. Der Name „T-Zelle“ leitet sich vom englischen „Thymus-Dependent-Lymphocyte“ ab. Bei der Reifung im Thymus sollen T-Zellen zuerst die Fähigkeit erlernen, „eigen“ von „fremd“ zu unterscheiden. Das ist wichtig, um eine spätere Autoaggressivität zu verhindern.

Ein wesentlicher Bestandteil der Reifung ist die Ausbildung des T-Zell-Rezeptors (TCR). Der TCR ist ein integrales Membranprotein und erkennt Peptide, die ihm über spezielle antigenpräsentierende Moleküle, sogenannte MHC-Moleküle, präsentiert werden.

Sein Aufbau ist einem Immunglobulin sehr ähnlich. Ein TCR besteht aus zwei Untereinheiten meist α und β , seltener γ und δ , die jeweils aus einer variablen und einer konstanten Domäne bestehen. Diese Untereinheiten sind mit dem Oberflächenpeptidkomplex CD3 zum TCR-Komplex verbunden⁶(S.248).

Durch komplexe Reifungsprozesse mittels Interaktion mit den thymalen Stromazellen und einer Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Gene bilden sich T-Zellen mit einer außerordentlich großen Anzahl verschiedener T-Zell-Rezeptoren.

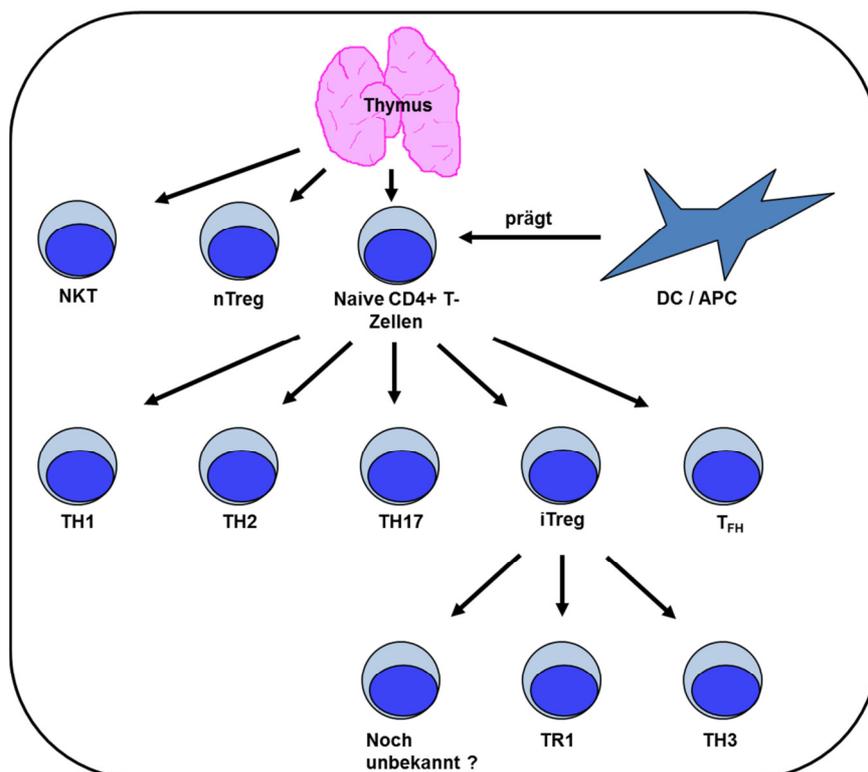
Um ihre Funktionsfähigkeit sicher zu stellen, wird ihre Reaktion auf antigenpräsentierende Zellen des Thymus getestet. Erkennen sie keine MHC-Zelloberflächenmoleküle, sterben sie einen apoptotischen Zelltod („death by neglect“).

Nur die T-Zellen, die mit MHC reagieren, überleben (positive Selektion). Um Autoaggressivität zu vermeiden, werden danach die Zellen herausgefiltert, die zu stark mit MHC reagieren (negative Selektion). Am Ende verbleiben Zellen mit moderater Affinität gegen MHC. Sie reifen nun weiter und exprimieren fortan entweder CD4 oder CD8⁷(S.348),⁶(S.297).

CD8(+)T-Zellen können sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten differenzieren. Diese haben ihre Aufgabe in der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Sie können z.B. direkt virenbefallene Zellen abtöten. Deshalb wird auch oft der Name T-Killerzellen für sie verwendet.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit standen im Wesentlichen T-Helfer-Zellen und regulatorische T-Zellen im Vordergrund. Diese Zellen exprimieren CD4.

Abbildung 2.2: CD4(+) T-Zellen



CD4(+) T-Lymphozyten reagieren nur dann auf Antigene, wenn sie ihnen durch zur Antigenpräsentation befähigte Zellen präsentiert werden. Dabei findet nicht allein die Präsentation statt, sondern zusätzlich eine weitere Kommunikation, die Kostimulation. Hierdurch werden sie aktiviert. Sie verfügen über ein ausgesprochen großes Repertoire an Antwortmöglichkeiten.

2.2.2. Effektor-T-Helfer-Zellen

Nach Fortschreiten der durch IL2 bewirkten Proliferation aktivierter T-Zellen differenzieren sich diese zu Effektor-T-Zellen. Das wesentliche Novum dieser Zellen ist, dass sie zur Ausübung ihrer spezifischen Funktion nicht mehr über kostimulatorische Moleküle aktiviert werden müssen.

Es gibt unterschiedliche bekannte Subtypen dieser Effektor-T-Zellen: TH1- und TH2 Lymphozyten, TH17-Lymphozyten, T_{FH}-Zellen und regulatorische T-Zellen.

Die Differenzierung der T-Zellen wird im Wesentlichen durch die Kostimulation und die Art der Zytokine gesteuert, durch die sie früh in ihrer Aktivierungsphase geprägt werden (siehe auch Kapitel 2.4).

TH1-Lymphozyten bilden sich unter dem Einfluss von IL12 und IFN- γ , die im Rahmen einer Immunantwort von dendritischen Zellen und NK-Zellen sezerniert werden. In TH1-Zellen wird der Transkriptionsfaktor T-bet exprimiert, der das IFN- γ -Gen aktiviert und die Expression eines Teils des IL12-Rezeptors induziert. Erkennen Effektor-TH1-Zellen Antigen auf einer Zielzelle, produzieren sie IFN- γ . Weitere TH1-Zytokine sind IL2 und Lymphotoxin α .

Die Hauptaufgabe für TH1-Zellen liegt in der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, bspw. Infektionen mit intrazellulären Erregern. Des Weiteren wird ihnen eine kritische Schlüsselrolle in der Genese von Autoimmunität zugeschrieben⁸.

TH2-Lymphozyten bilden sich unter dem Einfluss von IL4. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA-3. GATA-3 aktiviert mehrere TH2-typische Zytokine, allen voran wiederum IL4. Weitere TH2- Zytokine sind IL5, IL9, IL10, IL13, IL25.

Die Hauptaufgaben von TH2-Zellen liegen in der Abwehr extrazellulärer Parasiten.

Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Induktion allergischer Erkrankungen. Dies liegt auch daran, dass IL4 einen Wechsel zur IgE-Produktion in B-Zellen bewirkt⁸.

TH17- und T_{FH}-Zellen waren nicht Gegenstand dieser Arbeit, seien an dieser Stelle jedoch der Vollständigkeit halber erwähnt.

TH17-Lymphozyten sind noch nicht lange bekannt. Sie bilden sich unter dem Einfluss von IL6 und TGF- β . Sie können IL17 bilden, aber keine klassischen TH1- oder TH2-Zytokine und exprimieren auch nur geringe Mengen an T-bet und GATA-3.

Die klassischen TH1- und TH2-Zytokine IL4 und IFN- γ unterdrücken die Bildung von TH17-Zellen⁸. Man findet den Transkriptionsfaktor ROR γ T in TH17-Zellen.

Wahrscheinlich liegt ihre Funktion in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten⁶ (S.360). Sie füllen eine Lücke zwischen TH1-Zellen (Abwehr intrazellulärer Bakterien) und TH2-Zellen (Abwehr parasitärer Infektionen) durch die Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze^{9 10}.

Die Funktion der **T_{FH}-Zellen** liegt in der Interaktion mit B-Zellen. Die Differenzierung von B-Zellen in Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen geschieht in den germinalen Zentren von B-Zell-Follikeln. Zur Formierung der germinalen Zentren als auch zur weiteren Differenzierung brauchen die B-Zellen die Hilfe von CD4(+) Zellen. Dies ist die Aufgabe der T_{FH}-Zellen. Dabei sezernieren sie je nach Art der erforderlichen Antikörper-Isotypen charakteristische TH1- oder TH2-Zytokine⁶ (S.360).

2.2.3. Regulatorische T-Zellen

Auf Regulatorischen T-Zellen lag unser Hauptaugenmerk. Sie sind zur Suppression anderer T-Helfer-Zellen befähigt. Ihr Aufgabenfeld enthält damit unter anderem die Verhinderung von Autoimmunität, bösartigen Erkrankungen sowie die Unterdrückung oder Vermeidung allergischer Erkrankungen¹¹. Sie produzieren hauptsächlich die Zytokine TGF- β und IL10.

Unterschieden wird derzeit in natürliche und induzierte Treg. Diese Unterscheidung ist nicht unproblematisch, da bisher unklar ist, wie viele Treg-Populationen es wirklich gibt. Auch können nicht als Treg klassifizierte T-Zellen mitunter suppressive Fähigkeiten haben¹¹.

Bei den sogenannten „natürlichen Treg“ (nTreg) sollte nicht angenommen werden, dass sie dem unspezifischen angeborenen Immunsystem entstammen¹². Auch ihr TCR musste die adaptiven Selektionsschritte im Thymus durchlaufen, und stellt damit eine aktive Leistung des Immunsystems dar.

Die gegenwärtig am häufigsten verwendeten immunologischen Marker für Treg (CD25, FoxP3, CTLA-4, CD127^{low}) sind nach neueren Erkenntnissen auch Aktivierungsmarker und somit nicht allein Treg-spezifisch¹¹. Dazu kommt, daß auch konventionelle T-Zelltypen unter gewissen Bedingungen suppressive Fähigkeiten ausüben können. Daher ist es im Einzelfall schwierig nachzuweisen, ob man es überhaupt mit einer Treg zu tun hat. Einige Autoren stellen gar in Frage, ob Treg überhaupt eine eigene Zelllinie bilden¹¹.

Immer wieder werden auch Populationen von T-Zellen mit Phänotypen beschrieben, die scheinbar völlig vom bekannten Muster abweichen. Beispielhaft sei eine Arbeit der Experimentellen Rheumatologie der Berliner Charité erwähnt, die CD25(-)T-Zellen mit suppressiven Fähigkeiten beschreibt¹³.

Die Plastizität von T-Zellen ist offensichtlich sehr groß; eine universell akzeptierte Definition von Treg existiert nicht. Aus praktischen Gründen wird nun jedoch versucht, eine dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft entsprechende Unterteilung wiederzugeben.

Natürliche Treg (nTreg) werden bereits im Thymus geprägt. Sie sind in geringem Ausmaß autoreaktive T-Zellen. Klassisch für nTreg ist die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3^{14 15-18}. Da FoxP3 auch die Expression von CTLA-4 bewirkt, exprimieren nTreg CTLA-4 in starkem Ausmaß^{14 19}.

nTreg können die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen unterdrücken⁶ (S.365). Es wird vermutet, dass ihre Funktion vorrangig in der Verhinderung von Autoimmunität und in einer allgemeinen Erhöhung der Schwelle für Immunantworten liegt²⁰. Daher sind die TCR der nTreg zu einem Teil, wenn auch nicht alle, autoreaktiv¹². Wahrscheinlich sind 1-2% der Lymphozyten im peripheren Blut nTreg¹⁴.

Adaptive Treg entwickeln sich in der Peripherie aus naiven CD4(+)Zellen. Sie sind eine heterogene Zellgruppe. Alternativ für adaptive Treg wird in der Literatur der Name iTreg verwendet, was für „inducible Treg“ steht, oder auch seltener „converted Treg“.

Die vorrangige Funktion adaptiver Treg wird in der Suppression allergischer Reaktionen gegen Umwelt- und Nahrungsallergene sowie der Verhinderung chronischer Darmentzündungen gesehen²⁰.

Obwohl es experimentell gelingt, iTreg durch Konversion aus herkömmlichen T-Lymphozyten zu gewinnen, ist die Rolle dieses Mechanismus *in vivo* nicht geklärt¹².

Leider ist die Bezeichnung adaptiver Treg in der wissenschaftlichen Literatur sehr uneinheitlich. Oft unterscheiden Autoren auch nicht zwischen nTreg und iTreg.

Allgemein werden derzeit FoxP3(+)Zellen sowie die Foxp3(-)TH3- und Tr1-Zellen als Subpopulationen von iTreg angesehen. Im Falle der FoxP3(-)Treg TH3 und Tr1 ist jedoch noch nicht gesichert, ob sie wirklich eigene Zelllinien darstellen⁶ (S.365).

TH3-Zellen kommen vor allem auf (intestinalen) Schleimhäuten vor und sind dort an der Verhinderung autoimmuner Prozesse und entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt. Sie unterscheiden sich von anderen Treg vor allem dadurch, dass sie auch IL4 produzieren, eigentlich bekannt als TH2-Zytokin. Als Treg weisen sie sich jedoch durch die Produktion von TGF- β aus⁶ (S.365).

Tr1-Zellen bilden sich unter hohen Konzentrationen von IL10, aber auch IFN- α . Sie sezernieren IL10¹⁰. Tr1-Zellen exprimieren nicht unbedingt FoxP3, können es aber bei Aktivierung hochregulieren. Es ist möglich, dass sie ihre suppressiven Fähigkeiten unabhängig von FoxP3 entfalten¹⁶.

Wie bei TH17-Zellen induziert TGF- β bei Treg-Zellen die Expression von ROR γ T. Jedoch führt dies bei ihnen nicht zur Produktion von IL17. Die ROR γ T-Expression gelingt bereits durch geringere Konzentrationen von TGF- β als die FoxP3-Expression. Damit bestimmt wahrscheinlich die Höhe der TGF- β -Konzentration sowie das Vorhandensein proinflammatorischer Zytokine, ob sich T-Zellen zu Th17 oder zu iTreg-Zellen entwickeln¹⁰.

Eine wesentliche Grundlage der hier präsentierten Arbeit war die Entdeckung von **TH1-like Treg** durch Stock *et al.*²¹. Diese ähneln phänotypisch TH1-Zellen, bilden jedoch Treg-typische Zytokine und schützen im murinen Modell vor einer AHR.

Die Tabelle *T-Helfer-Zell-Subtypen* fasst die Eigenschaften der unterschiedlichen CD4(+) T-Zellen noch einmal zusammen.

Zur Wirkungsweise von Treg gibt es verschiedene Hypothesen. Bekannt sind Interaktionen mit T-Zellen als auch mit dendritischen Zellen. Man vermutet, daß die inhibitorischen Zytokine TGF- β und IL10 zum Teil für die Wirkung verantwortlich sind. Jedoch konnte gezeigt werden, daß die Neutralisierung von IL10 und TGF- β *in vitro* die suppressiven Fähigkeiten nicht beeinträchtigt²².

Möglicherweise ist auch auf der Zelloberfläche exprimiertes TGF- β für die Vermittlung der Immunmodulation in einer Zellkontakt-abhängigen Weise verantwortlich.

Ein weiterer Wirkmechanismus scheint das Vermögen zu sein, Zytokine zu absorbieren. Effektor-T-Zellen fehlt damit das „Signal 3“ für ihre Differenzierung und Proliferation. Sie gehen in der Folge in Apoptose über^{22 23} (siehe Kapitel 2.4).

Ein Weg zur Beeinflussung dendritischer Zellen könnte darin liegen, daß Treg um DC Aggregate formen, diese damit abschirmen, und zusätzlich mittels CTLA-4 in einer Zellkontakt-abhängigen Weise inhibieren²².

Tabelle 2.1: T-Helfer-Zell-Subtypen

| TH-Zell-Subtyp | Bildung unter (Signal 3) | bildet Zytokin | Transkriptionsfaktoren |
|-----------------|--------------------------|---|------------------------|
| TH1 | IL12, IFN- γ | IFN- γ , IL2, Lymphotoxin α | T-bet |
| TH2 | IL4 | IL4, 5, 9, 10, 13, 25 | Gata3 |
| TH17 | IL6, TGF- β , IL23 | IL17a, IL17f, IL21, IL22 | ROR γ T |
| T _{FH} | IL6 | IL21 | Bcl6 |
| nTreg | IL2 | IL10, TGF- β | FoxP3 |
| iTreg | TGF- β | TGF- β | FoxP3 |
| TH3-Treg | Keine Daten | TGF- β , IL4, IL10 | nicht bekannt |
| Tr1-Treg | IL10, IFN- α | IL10, TGF- β , <u>KEIN</u> IL4 | FoxP3 möglich |
| TH1-like Treg | Nicht bekannt | IL10, TGF- β , IFN- γ | T-bet, FoxP3 |

2.3. MHC-Moleküle

T-Zellen erkennen primär nur Antigene, die ihnen von anderen Zellen durch spezielle MHC-Moleküle präsentiert werden. Eine Gruppe für MHC-Moleküle kodierender Gene wurde im Rahmen von Immunantworten gegen transplantierte Gewebe entdeckt. Daher stammt der Name für diese Gengruppe: „Major Histocompatibility Complex“ (MHC).

CD8(+) T-Zellen erkennen an MHC1-Moleküle gebundene Antigene. Die im Falle von Allergien bedeutsamen CD4(+)T-Zellen erkennen an MHC2 gebundene Antigene.

MHC1-Moleküle werden von den meisten Körperzellen exprimiert⁶ (S.30). Sie binden Peptide von Proteinen, die intrazellulär hergestellt wurden. So können CD8(+) T-Zellen beispielsweise virale Proteine auf Zellen erkennen und die betroffene Zelle eliminieren.

MHC2-Moleküle hingegen spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen adaptiver Immunantworten. Sie binden Peptide von Proteinen aus intrazellulären Vesikeln, und präsentieren somit entweder Antigene von intrazellulär lebenden Erregern oder von

phagozytiertem Material. MHC2-Moleküle werden im Wesentlichen von Zellen des Immunsystems und stromalen Thymuszellen exprimiert.

Naive T-Zellen zirkulieren zwischen Blut, Lymphknoten, der Milz und anderen lymphatischen Geweben. Sie erleben dabei regen Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen. Trifft eine T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen, beendet sie ihre Migration und beginnt zu proliferieren. Am Ende der Proliferation begeben sich die Klone dieser T-Zelle wieder in den Blutfluss und wandern zu den infizierten Geweben⁶ (S.337).

2.4. Antigenpräsentation

Die Aktivierung von CD4(+) T-Zellen setzt somit voraus, dass sie von antigenpräsentierenden Zellen (APC) stimuliert werden. Zellen, die Klasse 2-MHC-Moleküle exprimieren, sind prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigt.

Naive T-Zellen binden auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen vorübergehend an eine Vielzahl dendritischer Zellen. Wird es ihnen nicht präsentiert, lösen sie sich wieder und wandern weiter.

Finden sie jedoch einen passenden MHC-Antigen-Komplex hängt ihre Reaktion von drei wesentlichen Signalen ab⁶ (S.354ff).

Signal 1 wird durch die Bindung des TCR an das präsentierte Antigen und die gleichzeitige Bindung von CD4 oder CD8 an ihr korrespondierendes MHC-Molekül gegeben.

Signal 2 wird durch kostimulatorische Moleküle übertragen, die der Zelle mitteilen, ob sie proliferieren oder sterben soll. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung von B7-Molekülen der dendritischen Zelle an CD28 der T-Zelle.

Signal 3 liefert Informationen, in welchen Zelltyp sich die T-Zelle entwickeln soll. Dies wird normalerweise durch beteiligte Zytokine gegeben.

2.4.1. Dendritische Zellen

Die wahrscheinlich potentesten APCs sind dendritische Zellen (DC). Sie haben sich auf die Antigenpräsentation spezialisiert.

Die meisten DC haben myeloide Vorläuferzellen. Nur eine Minderheit entspringt der lymphoiden Zelllinie.

In peripherem Blut sind DC außerordentlich selten. Vermutlich sind weniger als 1% der Zellen in PBMC Dendriten²⁴. Diese DC sind wahrscheinlich unreif und auf dem Weg vom Knochenmark in periphere Gewebe, oder sie nehmen Antigen im Blut auf und

tragen es zur weiteren Präsentation in die lymphatischen Gewebe²⁵. Teilweise sind es aber auch gewebsständige DC die wieder in die Zirkulation eintreten²⁶.

Innerhalb der DCs sind viele Subpopulationen bekannt. Wichtig ist die Unterscheidung in CD11(+) konventionelle, myeloide DC (cDC oder mDC), und CD11(-) plasmazytoide DC (PDC). PDC scheinen eine wichtige Rolle in der Induktion von Treg spielen^{27 28}.

Die genaue weitere Einteilung der DC ist kompliziert und war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Philippe Stock et. al. haben die vermittelnde Funktion eines speziellen DC-Typs (CD8α+ DC) bei der Induktion von Immuntoleranz im Mausmodell zeigen können²¹. Dies wird in Kapitel 3 genauer erläutert werden.

Auch Wurminfektionen können protektive Effekte im Rahmen allergischer Erkrankungen haben. Der Transfer dendritischer Zellen von *Schistosoma japonicum* (SJ)-infizierten Mäusen in OVA-sensibilisierte Mäuse bewirkt eine drastische Verminderung der Entzündung der Atemwege in den Empfängern²⁹.

Es wurde damit bereits mehrfach gezeigt, dass eine Induktion von Immuntoleranz durch besonders geprägte DC möglich ist.

2.4.2. Monozyten / Makrophagen

Makrophagen sind reife Formen von im Blut zirkulierenden Monozyten. Sie sind in fast allen Geweben anzutreffen. Beide Zellformen sind zur Antigenpräsentation befähigt. Ihre primäre Aufgabe besteht jedoch in der Phagozytose pathogener Mikroorganismen, infizierter oder toter Zellen sowie Zelltrümmern. Darüber hinaus helfen sie bei der Induktion von Entzündungen und der Rekrutierung anderer Immunzellen⁶ (S.5).

Sie präsentieren vor allem dann Antigen, wenn es ihnen nicht gelingt, phagozytierte Mikroorganismen zu beseitigen. In der Folge der Präsentation der Antigene dieser Organismen wird ihre Fähigkeit zur Abwehr dieser Zellen erhöht¹⁵ (S.340).

Es gilt derzeit als unwahrscheinlich, daß Makrophagen die Aufgabe haben, T-zelluläre Immuntoleranz zu induzieren⁶ (S.351).

2.4.3. B-Zellen

Makrophagen sind nur schlecht in der Lage lösliche Antigene aufzunehmen. Dies ist eine Domäne der B-Lymphozyten. Sie binden über ihr zellseitiges Immunglobulin solche Antigene, endozytieren sie und zerlegen sie in Fragmente. Diese präsentieren sie antigenspezifischen T-Zellen. Die erforderlichen kostimulatorischen Moleküle werden durch mikrobielle Bestandteile wie LPS induziert. Auf diesem Wege sind B-Zellen dann

in der Lage Immunantworten zu induzieren. Damit erklärt sich, wie autoimmune Prozesse durch B-Zellen *in vivo* verhindert werden: körpereigenen Antigenen fehlt die gleichzeitige Anwesenheit mikrobieller Bestandteile⁶(S.351), es findet somit keine Kostimulation statt und Signal 2 bleibt aus.

2.5. Allergische Reaktionen vom Typ 1

Es gibt Situationen, in denen Antigene Immunantworten auslösen, obwohl diese *per se* keine Bedrohung für den Organismus darstellen. Man spricht dann von Hypersensitivitätsreaktionen.

Klassische Allergien wie Heuschnupfen beruhen primär auf einer Hypersensitivitätsreaktion Typ 1 nach Gell und Coombs, dem IgE-vermittelten Reaktionstyp.

Dieser kann in drei Phasen unterteilt werden:

Sensibilisierungsphase: Diese Phase beginnt mit der durch Allergene bedingten Sensibilisierung von TH2-Lymphozyten. Dabei wird T-Zellen Antigen durch antigenpräsentierende Zellen präsentiert. Die resultierenden TH2-Lymphozyten stimulieren durch Zytokine B-Lymphozyten zur Produktion von IgE-Antikörpern. IgE bindet mit hoher Affinität mit seinem unspezifischen FC-Ende an Mastzellen und basophile Granulozyten. Dort bleibt es für lange Zeit auf der Zelloberfläche gebunden.

Erneute Allergenexposition: Kommt es zu einer erneuten Allergenexposition, so binden die IgE-AK auf den basophilen Granulozyten und Mastzellen an ihr Antigen, und lösen eine komplexe intrazelluläre Kaskade aus. Diese bewirkt eine Freisetzung von Mediatoren (bspw. Histamin), Zytokinen (TNF- α , IL1, IL4, IL6) sowie eine Umwandlung membrangebundener Zytokine zu Arachidonsäurederivaten (Eicosanoide, Leukotriene, Arachidonsäure).

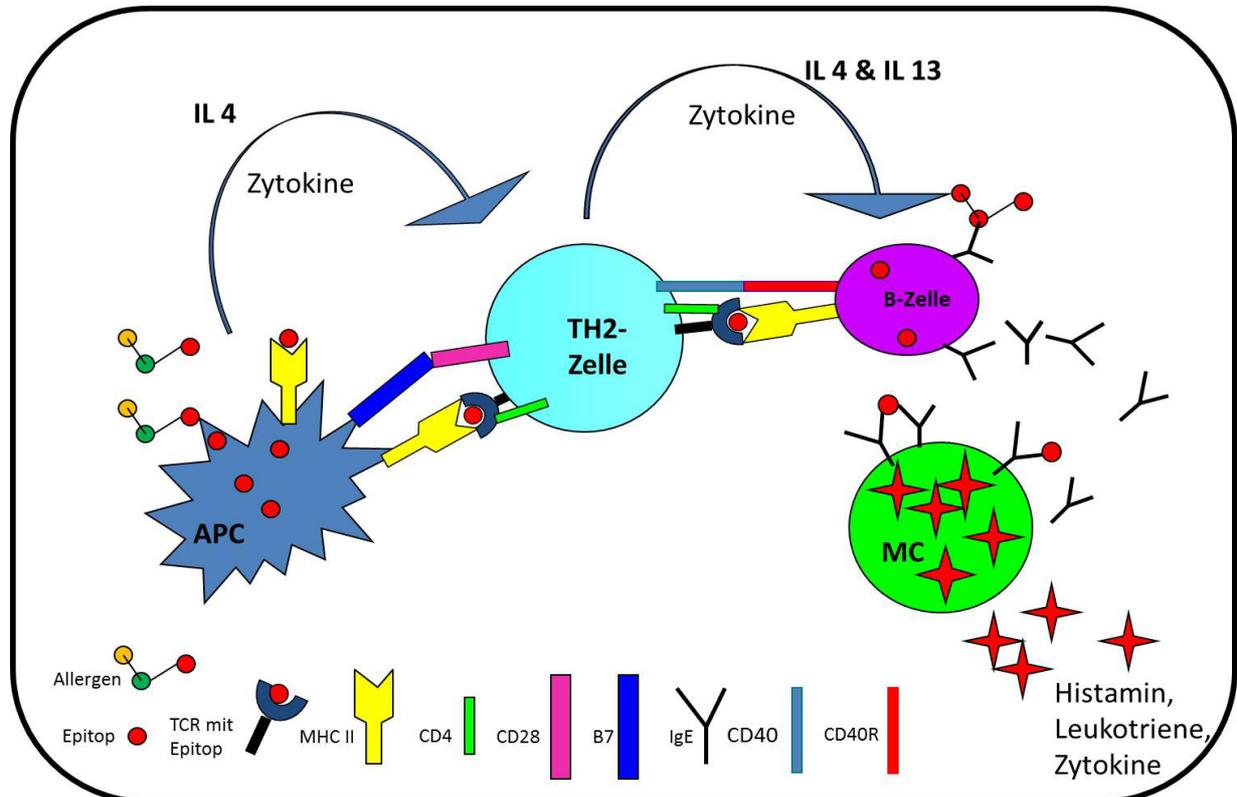
Hierdurch erklärt sich die Wirkungsweise antiallergischer Medikamente wie Antihistaminika, Mastzellstabilisatoren, und Leukotrienrezeptor-Antagonisten. Auch Glukokortikoide entfalten an dieser Stelle teilweise ihre entzündungshemmende Wirkung. Sie bewirken die Bildung von Lipocortin, welches die Entstehung freier Arachidonsäure hemmt³⁰.

Anaphylaktische Reaktion: Diese Phase ist gekennzeichnet durch die für den Patienten spürbaren Auswirkungen der Allergie. Sie kann lokal (Konjunktivitis, Rhinitis, etc.) aber auch systemisch bis zum anaphylaktischen Schock verlaufen. Aktiv ist vor

allem das freigesetzte Histamin, welches eine Kontraktion glatter Muskulatur (z.B. der Bronchialmuskulatur, daher Atemnot) und Vasodilatation (daher der Schock) bewirken kann.

Die Abbildung 2.3 veranschaulicht diese drei Phasen.

Abbildung 2.3: Allergische Reaktion Typ 1



Typ1-Allergien sind demnach charakterisiert durch eine Zellantwort von TH2-Zellen und die Produktion von IgE.

IgE ist der mit Abstand seltenste Immunglobulintyp im Serum. Auch gesunde Menschen ohne erkennbare Allergien haben nachweisbares IgE, aber nur 20-30% der Bevölkerung haben nachweisbares spezifisches IgE³¹. Die Rolle des „unspezifischen IgE ist noch nicht sicher geklärt.

2.6. Ursachen für die Entstehung von Allergien

Dendritische Zellen, die im Rahmen von Infektionen Antigen aufnehmen, migrieren in regionale Lymphknoten und initiieren abhängig von den umgebenden Zytokinen eine TH2-Immunantwort. Bei Kontakt mit Allergenen ist eine solche Reaktion unerwünscht.

Früher ging man davon aus, daß TH1- und TH2-Zellen gleichsam in gegenüberliegenden Schalen einer Waage liegen. Man nahm an, daß durch Einleitung einer TH1-geprägten Reaktion TH2-Zellen unterdrückt werden und umgekehrt³².

Diese Vorstellung ist nach heutigen Erkenntnissen zu simpel. Es sind deutlich mehr Zellen als nur TH1- und TH2-Zellen an Immunantworten beteiligt. Zudem ist für die Suppression einer Immunantwort die Induktion von regulatorischen T-Zellen von elementarer Bedeutung³³.

Will man Allergien vermeiden lernen, könnte theoretisch bereits in der Sensibilisierungsphase angesetzt werden. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß Allergenkarenz keinen Schutz vor der Entstehung von Allergien bewirkt.

Wodurch nun letzten Endes eine TH2-dominierte Immunantwort initiiert wird, warum es eine familiäre Häufung gibt und warum eine Bevorzugung urbaner, westlicher Bevölkerung auftritt ist bislang nicht geklärt. Wir wissen noch nicht genau genug, was bei der Antigenpräsentation von Allergenen bei Allergikern anders abläuft als bei gesunden Menschen.

Eine der allgemein akzeptiertesten Theorien zur Entstehung von Allergien stellt die Hygiene-Hypothese dar. Sie wurde erstmals 1989 von Strachan formuliert³⁴.

In einem sehr kurzen aber nachhaltigen Artikel vermutete er, dass frühkindliche Infektionen infolge geringerer Hygienestandards (übertragen bspw. durch ältere Geschwister) vor Allergien schützen. Diese Theorie wird seither immer wieder aufgegriffen und ergänzt³⁵.

Es wäre wünschenswert, wenn sich die Sensibilisierung von TH2-Lymphozyten gezielt verhindern ließe. Im Zusammenhang mit der Hygienehypothese wird daher nach protektiven Faktoren vor Allergien gesucht. Diese werden unter anderem im bäuerlichen Umfeld vermutet³⁶⁻³⁸. Durch die Kenntnis solcher Faktoren ließe sich Allergien möglicherweise gezielt vorbeugen.

Die Art und Weise einer Typ1-allergischen Immunantwort ähnelt der Abwehr von Parasiten. Die Orte der primären Entstehung von Allergien sind analog zu den primären Kontaktorten mit Parasiten (Haut und Schleimhäute der Atemwege und des Intestinaltraktes). Dies würde zur Hygienehypothese passen. Und passend scheinen einige Wurminfektionen vor Allergien zu schützen^{29 39 40}. Der Befall mit Helminthen geht im

Normalfälle mit erhöhten Werten von IgE und einer Eosinophilie einher, wohingegen Allergien Zustände mit pathologisch erhöhtem IgE und Eosinophilie darstellen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß auch hitzeinaktivierte Listerien (HKL) immunmodulatorische Fähigkeiten haben^{21 41}. Möglicherweise sind sie einer dieser vor Allergien schützenden Faktoren.

2.7. Immuntoleranz

1949 publizierte Sir Frank Macfarlane Burnet in seinem Buch *The Production of Antibodies*⁴² erstmals die Hypothese, daß die Erkennung von „Selbst“ eine in der Embryogenese erworbene Fähigkeit darstellt. Würde eine fremde Substanz in einen Embryo vor der Reifung des Immunsystems eingeführt, so seine Vermutung, würde das Immunsystem in der Folge keine Antikörper gegen diese Substanz bilden.

Im Rahmen von Studien mit Hauttransplantaten interessierte sich auch Sir Peter Brian Medawar für diese Hypothese. In einem Versuch mit Mäusen zeigte er, daß Mäuse eines Stammes (Stamm „CBA“), die in der Fetalzeit Kontakt mit Zellen eines zweiten Mausstammes (Stamm „A“) hatten, später Hauttransplantate dieses zweiten Mausstammes nicht mehr abstießen, wohl aber die eines dritten Mausstammes (Stamm „AU“). Das Konzept der Immuntoleranz war damit entdeckt und belegt. 1960 erhielten beide Forscher für diese Leistung den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Heute bezeichnet Immuntoleranz die aktive Fähigkeit immunkompetenter Zellen nicht auf ein Antigen zu reagieren, das unter anderen Bedingungen eine Immunantwort induzieren kann.

Das beinhaltet auch, daß das Immunsystem lernen muss, den eigenen „Besitzer“ zu tolerieren. Im Falle autoimmuner Vermeidung gibt es mehrere Ebenen der Selbst-Toleranz-Entwicklung.

„Zentrale Toleranz“ benennt das Aussortieren stark autoreaktiver T-Zellen im Thymus im Rahmen der T-Zell-Entwicklung. Diejenigen Zellen, die im Thymus ihr spezifisches Selbst-Antigen jedoch noch nicht vorfinden, müssen in der Peripherie eliminiert werden. Die wichtigsten bekannten Prinzipien dabei sind Anergie aufgrund mangelnder Kostimulation, Deletion (Apoptose), und Suppression durch Tregs⁶ (S.613).

Eine zweite große Aufgabe der Immuntoleranz ist jedoch auch das Unterscheiden von „gefährlich“ und „ungefährlich“. Von Allergenen geht in herkömmlichen Mengen im Allgemeinen keine Gefahr aus. Allergiker können jedoch sehr ausgeprägt auf den

Kontakt zu geringsten Mengen eines Allergens reagieren. Hier sind die Maßnahmen des Immunsystems zum Erreichen der Toleranz gegenüber diesem Allergen gescheitert.

Durch die Bildung von spezifischen regulatorischen T-Zellen können die Antworten von Effektor-T-Zellen unterdrückt werden⁴³. Damit spielen sie eine Schlüsselrolle beim Erreichen von Immuntoleranz gegenüber Allergenen.

In unserem Modell versuchten wir *in vitro* Treg zu induzieren und damit eine allergische Reaktion zu supprimieren.

2.8. Wiesenlieschgras (*Phleum Pratense*)

Wiesenlieschgras ist ein bis zu einen Meter hohes Ährenrispengras. Seine Blütezeit reicht von Mai bis September. Wiesenlieschgraspollen stellen einen der häufigsten Auslöser einer Typ-1-Allergie in Europa dar. Im Rahmen der KiGGS-Studie konnte es im Alter von 3-17 Jahren als die häufigste Sensibilisierung überhaupt identifiziert werden⁴⁴.

Von den Allergenen des Wiesenlieschgrases sind bisher „*Phl p 1* bis *13*“ bekannt.

„*Phl p 5a* und *5b*“ sind dabei als Majorantigene für über 90% der Sensibilisierungen verantwortlich.

2.9. Hitzeinaktivierte *Listeria Monozytogenes* und Flagellin

Listerien sind in der Natur ubiquitär verbreitet und können sich aerob und anaerob ernähren. Sie sind grampositive, begeißelte und fakultativ intrazelluläre Bakterien.

Listeria monozytogenes (LM) sind die einzige bekannte humanpathogene Spezies der Gattung *Listeria*. Sie sind an ein saprophytäres Leben im Erdreich ebenso angepasst wie an das Zytosol menschlicher Zellen⁴⁵. Eine Infektion kann über unsachgerecht hergestellte Lebensmittel, vor allem Milch-, Fleisch- und Fischprodukte, erfolgen. Bei immunkompetenten Patienten entsteht meist nur eine selbstlimitierende Gastroenteritis, schwere Verläufe bis zur Sepsis oder Meningitis kommen aber vor.

Auch heute können von Listerien noch bedrohliche Gefahren ausgehen. Im Jahr 2010 wurde in Österreich der Tod von bis zu 8 Menschen mit einer Listerien-Kontamination von Käse in Verbindung gebracht⁴⁶. Im August 2014 wurde bekannt, daß sich in Dänemark mindestens 20 Menschen über Presswurst aus Schweinefleisch mit Listerien infizierten, von denen 12 starben⁴⁷.

Neben dieser infektiösen Eigenschaft ist für Listerien jedoch auch bekannt, daß sie immunmodulatorische Fähigkeiten besitzen. In ihrer durch Hitze abgetöteten Form (HKL) konnte dies auch schon experimentell belegt werden^{21 41 48}.

Es gibt mehrere denkbare Ursachen für diese Fähigkeiten. Eine Infektion mit lebenden Listerien führt zu einer starken IFN- β -Produktion. Heutzutage wird Interferon- β in der Therapie von Multipler Sklerose eingesetzt. Es hat bei diesen Patienten einen antiinflammatorischen Effekt⁴⁹. Im Rahmen der Erkrankung wird auch ein (ggf. funktioneller) Mangel an Treg diskutiert.

Die Fortbewegungsorgane der Listerien sind die Flagellen. Sie haben einen Durchmesser von etwa 15 nm, sind innen hohl und polymer aus einem Protein namens Flagellin aufgebaut. Die Flagellinmonomere sind helikal angeordnet, so daß 5,5 Flagellineinheiten eine Umdrehung bilden. An der Basis der Flagellen befindet sich ein rotierender Motor⁵⁰

Hitzeinaktivierte *Listeria Monozytogenes* (HKL) dienten in einem Teil unserer Versuche direkt als Adjuvanz zur Suppression einer Lieschgras-spezifischen T-Zell-Proliferation *in vitro*. In einem anderen Teil der Versuche wurde *Listeria monozytogenes*-spezifisches Flagellin zur Suppression verwendet.

2.10. HKL und Flagellin als Immunadjuvans

Daß HKL als Adjuvans allergische Reaktionen bei Mäusen supprimieren können, wurde bereits mehrfach belegt. So konnte Gesine Hansen zeigen, daß eine durch Ovalbumin (OVA) induzierte Hyperreagibilität der Atemwege (AHR) bei Mäusen durch die gleichzeitige Gabe von HKL supprimiert werden konnte. Um Immuntoleranz entwickeln zu können mussten dabei HKL und das Allergen in die gleiche Mäusepfote appliziert werden. Wurden HKL und OVA jeweils in verschiedene Mäusepfoten gegeben, war der Effekt fast verschwunden⁴⁸. Offenbar war eine große lokale Nähe von Allergen und Adjuvans erforderlich.

Dies konnte von der Arbeitsgruppe Scheurer und Schülke eindrucksvoll untermauert werden⁵¹. Sie nutzten rekombinant hergestelltes Listerien-spezifisches Flagellin (rFlaA) anstelle der HKL und entwickelten ein Fusionsprotein aus Flagellin und OVA. Dieses testeten sie in einem murinen Modell.

Dabei bewirkte das Fusionsprotein eine deutlich stärkere TLR-5-Aktivierung als Flagellin allein. In einem murinen Nahrungsmittelallergiemodell schützte zudem die prophylaktische Impfung mit dem Fusionsprotein vor den klinischen Symptomen der Allergie und die geimpften Mäuse bildeten weniger TH2-typische Zytokine.

Über eine Induktion von Treg wurde von der Gruppe nicht berichtet. Sie beobachteten einen Wandel der mDC zur Bildung von IL10 und sahen hierin den wesentlichen immunmodulatorischen Mechanismus. Da die Auseinandersetzung von DC mit Allergen jedoch vor der T-Zellantwort stattfindet, könnte die Bildung spezieller DC die spätere Bildung von Treg bewirken.

So zeigte Philippe Stock in Vorversuchen dieser Arbeit²¹, daß durch den Transfer von durch OVA und HKL induzierten dendritischen Zellen Treg induziert werden konnten. Hierauf wird in Kapitel 3.1 noch genauer eingegangen werden.

Über die Fähigkeiten von HKL als Immunadjuvans beim Menschen war vor dieser hier vorliegenden Arbeit noch nichts bekannt.

2.11. Kostimulation und Cluster Of Differentiation

Die lichtmikroskopische Betrachtung von Lymphozyten lässt nur sehr begrenzte Aussagen über ihre Differenzierung zu. Man kann aber die Bindungskraft monoklonaler Antikörper an spezifische Antigene nutzen, um genaue Zell-Analysen durchzuführen.

So lassen sich Zellen unter anderem an den auf Ihrer Zelloberfläche vorhandenen CD-Strukturen unterscheiden. CD steht für „cluster of differentiation“.

Die wichtigsten drei Antigene zur Analyse von T-Zellen sind CD3 (assoziiert mit dem T-Zell-Rezeptor), CD4 (charakterisiert T-Helfer-Zellen) und CD8 (charakterisiert zytotoxische T-Zellen).

Die Reaktion einer Zelle auf einen an ihrer Oberfläche gebundenen Stoff erfordert, daß eine Signalübertragung in das Zellinnere erfolgt. Da der TCR-Komplex zwar eine große extrazelluläre Domäne besitzt, jedoch nur über einen kurzen intrazellulären Anteil verfügt, nutzt er zur Signalübertragung die Assoziation mit Membranmolekülen, die über größere intrazelluläre Domänen verfügen. Diese Moleküle werden kostimulatorische Moleküle genannt.

Die im Folgenden genannten Membranproteine, Transkriptionsfaktoren und Interleukine waren im Rahmen unserer Arbeit von besonderer Bedeutung.

2.11.1. **CD3, CD4 und CD8**

CD3 bildet mit dem TCR den TCR-Komplex. Es findet sich daher auf allen T-Zellen unabhängig von ihrer weiteren Differenzierung. CD3 besteht aus vier Signalketten (zwei ϵ , eine δ , eine γ) und hilft zusammen mit zwei weiteren Signalmolekülketten namens Fc ϵ 1R dem TCR über sogenannte ITAMS mit der Zelle zu kommunizieren.

Für die Signalübergabe durch den TCR-Komplex sind des Weiteren die Korezeptoren CD4 und CD8 nötig. Sie verstärken die Bindung der spezifischen TCRs. Die intrazelluläre Domäne von CD4 und CD8 ist eine Tyrosin-Kinase namens „Lck“. Wahrscheinlich ist sie es, die die ITAMS phosphoryliert und so eine Signaltransduktion in die Zelle ermöglicht.

Die weitere komplexe intrazelluläre Signalkaskade bewirkt eine Modulation der Gentranskription, die eine Zell-Differenzierung oder Proliferation zur Folge hat.

Da CD4 zur Erkennung von MHC-Klasse-2-Molekülen dient, ist seine Expression charakteristisch für alle T-Helfer-Zellen. CD8 erkennt MHC-Klasse-1-Moleküle. Seine Expression ist charakteristisch für T-Killer-Zellen.

2.11.2. **CD25**

CD25 ist die α -Kette des IL2-Rezeptors. Es findet sich auf aktivierten Monozyten, B-Zellen und T-Zellen.

IL2 wird auch „T-cell-growth-factor“ genannt. Es bewirkt die Proliferation von T-Zellen, die Differenzierung in Th1-, Th2-Zellen und Treg. Es inhibiert Th17 und T_{FH}-Zellen.

Es spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Apoptose und ist damit für die Entwicklung von Immuntoleranz von großer Bedeutung⁵².

Eine naive, ruhende T-Zelle befindet sich in der Phase G0 der Zellteilung und reagiert nur auf IL2 in hohen Dosen. Tritt diese Zelle erstmals mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt, beginnt sie die G1-Phase der Zellteilung und induziert die Bildung von CD25 als auch IL2.

Durch die Expression von CD25 wird der IL2-Rezeptor wiederum sensibler, und fortan reagiert die T-Zelle auch auf geringe Mengen IL2. Solchermaßen aktivierte T-Zellen können sich zwei- bis dreimal täglich teilen. So kann eine spezifische T-Zelle binnen kurzer Zeit mehrere tausend Klone bilden. Bleibt die Stimulation mit IL2 im Weiteren aus, begehen diese Zellen einen apoptotischen Zelltod.

CD25 war der erste bekannte Marker für nTreg⁵³. Obwohl er seine Gültigkeit in diesem Zusammenhang behalten hat, haben bei Weitem nicht alle CD25(+) T-Zellen regulatorische Fähigkeiten.

2.11.3. **CD28, CTLA-4 und ICOS**

CD28 ist neben CD4 und CD8 ein weiteres kostimulatorisches Molekül naiver T-Zellen. CD28 bindet an die Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Die dann folgende intrazelluläre Signaltransduktion durch CD28 bewirkt eine Verhinderung der Apoptose des Lymphozyten, eine Erhöhung des Zell-Metabolismus, die verstärkte Transkription von IL2-mRNA sowie eine gewaltige Steigerung der IL2-Produktion.

Da IL2 zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen erforderlich ist, erhält die Proliferation von T-Zellen durch die Kommunikation über CD28 folglich einen starken Schub.

CD28 kommt damit eine wichtige Schutzfunktion vor Autoimmunität zu. Denn da T-Zellen zwar im Thymus geprägt werden, thymale Zellen jedoch nicht sämtliche organspezifischen Antigene bilden können, kommen auch autoreaktive T-Zellen in Umlauf. Erkennen diese nun körpereigene Zellen als vermeintlich fremd, so bleibt eine Aktivierung aus, da die Aktivierung über CD28 durch gewöhnliche Gewebezellen nicht möglich ist, sondern wie oben erwähnt, die Liganden CD80 und CD86 auf APC benötigt.

Die autoreaktive Zelle geht stattdessen in Anergie über, ein Terminus, der einen Zustand beschreibt, in dem T-Zellen gegenüber ihrem spezifischen Antigen refraktär bleiben.

CTLA-4 (CD152) steht für „cytotoxic T cell antigen 4“ und ist ein inhibitorischer Gegenspieler zu CD28. Es befindet sich auf aktivierten T-Zellen und bindet an die gleichen Liganden (CD80 und CD86) auf antigenpräsentierenden Zellen wie CD28. CTLA-4 hingegen verhindert die Signalübertragung über den TCR, statt sie wie CD28 zu verstärken. Mäuse mit einem unterbrochenen CTLA-4-Gen erkrankten an einer tödlichen Störung durch massive Überproduktion von Lymphozyten⁵⁴. CTLA-4 erfüllt daher eine wichtige Aufgabe in der Regulation des Immunsystems und Beendigung von Immunantworten.

Es wird vermutet, dass CTLA-4 in einem Subtyp CD4CD25(+) T-Zellen regulierend wirksam wird, so dass eine Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen erfolgt⁵⁵.

Für FoxP3(+) Treg wird berichtet, daß die Expression von CTLA-4 für ihre suppressiven Fähigkeiten erforderlich ist⁵⁶.

Auch **ICOS** ist ein kostimulatorisches Molekül, und nah verwandt mit CD28. ICOS bindet an den Liganden LICOS auf antigenpräsentierenden Zellen (der wiederum eng verwandt ist mit den Liganden für CD28). Im Unterschied zu CD28 treibt aber die Kostimulation durch ICOS nicht die IL2-Produktion an, sondern reguliert die Expression anderer Zytokine, z.B. IL4 und IFN- γ ⁶, aber auch IL10²⁸.

Klassischerweise galt ICOS als wichtiges kostimulatorisches Molekül TH2-getriebener Immunreaktionen, ein Bild, das derzeit im Wandel ist⁵⁷. Auch bei TH1-Reaktion wie der Transplantatabstoßung spielt ICOS eine Rolle. Und auch bei der Induktion regulatorischer T-Zellen ist der ICOS-ICOS-Ligand-Pathway beteiligt.

Im Tierversuch produzieren DCs nach Sensibilisierung kurzfristig IL10, und induzieren damit IL10-produzierende Treg. Diese Treg vermögen in anderen Tieren eine AHR zu unterdrücken. Blockiert man den ICOS-ICOS-Ligand-Pathway, wird dieser positive Effekt wieder aufgehoben, genauso wie durch Gabe von Anti-IL10-Antikörpern⁵⁸.

ICOS-defiziente Patienten stellen ein sehr seltenes Kollektiv von Patienten mit angeborenem Immundefekt dar. 2009 gab es weltweit neun bekannte Patienten⁵⁹. Klinisch präsentieren sie sich durch ihre Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen. Tuettenberg et al. fanden in der Zellkultur ICOS-defizienter Patienten, daß tolerogene DCs keine Anergie bei ihnen auslösen konnten. Daraus schlussfolgerten sie, dass ICOS zur Induktion von Anergie und damit Toleranz gegenüber Antigen notwendig ist⁶⁰.

ICOS selbst ist auch ein Marker für eine Subpopulation Treg, die vermutlich eher aus nTreg als adaptiven Treg entsteht⁴³. Auch die von Stock *et al.* beschriebenen Th1-like Treg exprimieren ICOS²¹.

ICOS ist damit ein Zellmarker, dessen gehäufte Expression wir im Rahmen der Induktion von Treg auf CD4(+) Lymphozyten erwarteten. CTLA-4 erwarteten wir als Treg-Marker als direkten Hinweis auf induzierte Treg zu finden.

2.12. Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine, die von vielen Zellen gebildet werden und an spezifische Rezeptoren binden können. Mittels Zytokinen können sich Zellen selbst beeinflussen (autokrine Wirkung), mit benachbarten Zellen kommunizieren (parakrine Wirkung) oder auf entfernte Zellen Einfluss nehmen (endokrine Wirkung).

IL4 ist das Schlüsselzytokin von TH2-Lymphozyten. Es kommt somit im Rahmen allergischer Reaktionen vor. IL4 bewirkt in Plasmazellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel (class switching) zu IgE^{31 61}.

TGF- β und IL10 sind im Wesentlichen immunsuppressive Zytokine und gelten als Schlüsselzytokine regulatorischer T-Zellen. Allerdings können auch TH2-Zellen (und seltener TH1-Zellen) IL10 bilden¹⁰. Daher ist IL10 nur unter Kenntnis der Rahmenbedingungen ein aussagekräftiger Marker für Tregs.

IL10 unterdrückt T-Zell-Antworten durch Hemmung der Produktion von IL2, TNF- α und IL5, sowie durch Unterdrückung der Expression von MHC und anderen Molekülen durch antigenpräsentierende Zellen⁶(S.365),⁶².

TGF- β ist das klassische Schlüsselzytokin regulatorischer T-Zellen. Es unterdrückt die Bildung von Zytokinen in T-Zellen, ihre Zellteilung und ihre Killerfähigkeiten⁶(S.365).

Einerseits wirkt es als Zytokin im Serum. Es kann aber auch über Zell-Zell-Kontakte seine Wirkung zu entfalten.

Da TGF- β ein hochwirksames Zytokin ist, das auf eine Vielzahl von Zellen wirkt, besteht die physiologische Notwendigkeit der strengen Kontrolle seiner Funktion. LAP („latency associated peptide“) wird bereits intrazellulär an TGF- β gebunden, und inaktiviert es.

Auch zellständiges TGF- β bildet mit LAP einen Komplex. LAP verhindert die Bindung von TGF- β -Antikörpern an das TGF- β . Daher nutzt man stattdessen LAP-Antikörper, und kann so TGF- β -produzierende Zellen identifizieren. In unserer Arbeit haben wir TGF- β indirekt über die LAP-Expression gemessen.

IFN- γ wird dauerhaft von TH1-Zellen exprimiert⁶³. Hohe Mengen von IFN- γ werden daher mit TH1-Antworten, also Immunantworten auf intrazelluläre Erreger (wie bspw. Listerien) in Verbindung gebracht. Eine seiner Hauptfunktionen liegt in der Aktivierung von Makrophagen⁶⁴.

2.13. Transkription und Transkriptionsfaktoren

Die Transkription bezeichnet den Vorgang der RNA-Synthese. Sie findet bei Eukaryoten im Zellkern statt. Die spätere Translation der RNA wird im Zytosol einer Zelle durchgeführt. Diese räumliche Trennung von Transkription und Translation ermöglicht eine hochgradige Regulierung der Genexpression.

Die Transkription beginnt an Promotoren. Promotoren sind DNA-Sequenzen, die die RNA-Polymerasen an die richtige Initiationsstelle für die Transkription führen⁵⁰ (S.920).

Transkriptionsfaktoren können direkt oder indirekt an die Promotorregionen der DNA binden, und so die Transkription eines Gens ermöglichen.

Spezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren bestimmte Gene. Daher lassen sich durch Nachweis eines Transkriptionsfaktors Rückschlüsse über eine Zelle ziehen. So gilt GATA3 als typisch für TH2-Zellen und T-bet bewirkt die Bildung von TH1-Zellen⁶⁵.

FoxP3 wird als Charakteristikum vieler Treg angesehen^{11 66-68}. Es soll daher genauer betrachtet werden

2.13.1. FoxP3

FoxP3 ist Protein aus der Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren-Familie. Diesen Proteinen gemeinsam ist eine hochkonservierte DNA-bindende Domäne, die Forkhead-Box. Die zugrundeliegenden FOX-Gene sind phylogenetisch sehr alt, und ihre Funktionen ausgesprochen vielfältig. Entdeckt wurden die Fox-Gene 1989 bei *Drosophila* und Ratte. Seither ist eine große Anzahl in vielen Spezies bekannt⁶⁹.

2003 berichteten Fontenot *et. al.* und Hori S *et. al.*, dass FoxP3 der Haupt-Transkriptionsfaktor natürlicher regulatorischer T-Zellen ist^{67 68}. Das immunsuppressive und Treg-typische Zytokin TGF- β vermag FoxP3 in murinen wie humanen CD4(+)/CD25-negativen T-Zellen zu induzieren⁷⁰. Die suppressive Wirkung von FoxP3 gilt als sicher⁷¹. Unklarheit besteht aber weiterhin über seine Funktionsweise. Mutationen des FoxP3-Gens verursachen bei Mäusen den „scurfy“ (schorfigen) Phänotyp, bei Menschen entsteht ein IPEX benanntes Autoimmunsyndrom.

Scurfy Mäuse entwickeln keine nTreg und versterben letztendlich an einem lymphoproliferativen Syndrom. Der Transfer von nTreg in neonatale scurfy Mäuse verhindert die Entstehung dieses Syndroms. Auch der Transfer TGF- β -induzierter Treg (iTreg) konnte die Entstehung der Erkrankung unterdrücken⁷².

Das IPEX-Syndrom beim Menschen ist gekennzeichnet durch eine Dysfunktionen des Immunsystems, Polyendokrinopathie und Enteropathie⁷³. Dorsey berichtete 2009, dass die hämatopoeitische Stammzelltransplantation bei einem 8-Monate alten IPEX-Patienten die Symptome des Jungen drastisch besserte, das Serum-IgE verringerte und im gleichen Maße die (vorher nicht vorhandene) FoxP3-Expression CD4-positiver Zellen zunahm⁷⁴.

Die Beschreibung von FoxP3 als alleinigen Master-Regulator für Treg ist jedoch nicht ausreichend. Die genetische Signatur von Treg sehr vielseitig und geht über die Expression von FoxP3 hinaus^{12 71}. So fand die Arbeitsgruppe um Anne O'Garra in einem murinen Modell IL10-produzierende Treg, die trotz suppressiver Fähigkeiten kein FoxP3 exprimieren⁷⁵.

Erschwerend bei der Nutzung als Treg-Marker kommt hinzu, dass viele Effektor-T-Zellen bei Aktivierung über den TCR vorübergehend FoxP3 exprimieren ohne dabei suppressive Fähigkeiten zu entwickeln^{16 76}. Wie später gezeigt werden wird, ist dieses Phänomen bei unseren Proliferationsversuchen von großer Bedeutung.

2.14. Apoptose

Apoptose bezeichnet einen Vorgang, bei dem Zellen einen programmierten Zelltod beschreiten. Es gibt drei Formen des programmierten Zelltodes (PCD): Apoptose, apoptoseartigen PCD und nekroseartigen PCD⁷⁷. Die Übergänge zwischen diesen Formen sind fließend. Sie stehen der primären Nekrose gegenüber, der passiven Form des Zelltodes, die durch Verletzung oder hohe Dosen von Noxen oder Pathogenen ausgelöst wird⁷⁸. Apoptose kommt *in vivo* sehr oft vor. Jeden Tag verschwinden 50-70 Milliarden Zellen eines Erwachsenen durch Apoptose⁷⁹.

PCD ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess. Es kommt zu einer Verkleinerung der Zelle, Fragmentierung und Verdichtung des Zellkerns und Abschnürung von Membranvesikeln (Zeiose oder „membrane blebbing“ genannt)⁸⁰(S.186). Des Weiteren werden ein Schrumpfen des Zytoplasmas und die Ausbildung apoptotischer Kernfragmente beobachtet.

Diesen Vorgängen liegt die Aktivierung von sogenannten Pro-Caspasen in Caspasen zugrunde. Es gibt viele Möglichkeiten Caspasen zu aktivieren.

Ein Teil wird über „Death-Rezeptoren“ auf der Zelloberfläche vermittelt. Der einfachste Weg eine Caspase zu aktivieren geschieht aber durch eine bereits aktivierte Caspase⁷⁷. Am Ende der daraus resultierenden lawinenartigen Caspasen-Kaskade steht unter anderem eine Umformierung der Zellmembranphospholipide mit Externalisierung von Phosphatidylserin. Dieses fungiert als „Friss-mich-Signal“ an phagozytierende Zellen, und signalisiert diesen, dass die exprimierende Zelle beseitigt werden soll.

Der apoptoseartige PCD ist gekennzeichnet durch eine weniger dichte Chromatinverdichtung des Zellkerns, ähnelt aber insgesamt dem normalen PCD.

Wenn nicht alle PCD-Kriterien erfüllt werden, kann dieser Terminus verwendet werden. Beispielsweise fallen Caspase-unabhängige Formen des Zelltodes in diese Kategorie. Von nekroseartigen PCD spricht man, wenn keine Chromatinverdichtung stattfindet. Die anderen Apoptose-Anzeichen können in unterschiedlichem Maße ausgeprägt sein.

Apoptose wird hochgradig reguliert. Sie ist unter anderem bei der Differenzierung der T-Zell-Vorläufer im Thymus erforderlich, aber auch nach bezwungenen Infektionen, um übrig gebliebene Immunzellen wieder zu eliminieren. Dabei gibt es zwei mögliche Aktivierungswege für Apoptose.

Der intrinsische Weg wird dann ausgelöst, wenn Zellen entweder toxische Stimuli erhalten (bspw. UV-Strahlung, Zellgifte), oder aber beim Ausbleiben von extrinsischen Signalen, die für das Zellüberleben von Bedeutung sind (beispielsweise IL2 für aktivierte T-Zellen).

Der extrinsische Weg wird vermittelt über die Aktivierung so genannter Death-Rezeptoren durch extrazelluläre Liganden. Die bekanntesten Beispiele für diese Rezeptoren sind TNF-1 und Fas (oder CD95).

Am Ende beider Wege steht die oben genannte Aktivierung von Caspasen, die den weiteren Zelluntergang vermitteln.

Es gibt Belege, daß auch Treg ihre Wirkung über die Induktion von Apoptose in Effektor-T-Zellen entfalten^{23 43}.

3. Herleitung einer Aufgabenstellung

Im einleitenden Kapitel wurde beschrieben, wie man sich momentan den natürlichen Weg der Entstehung von Immuntoleranz vorstellt. Es wurde verdeutlicht, daß regulatorischen T-Zellen durch ihre vielseitigen Interaktionen mit DC und anderen T-Zellen dabei eine Schlüsselposition zukommt.

Bislang nimmt die Inzidenz allergischer Erkrankungen weltweit zu. Es fehlt jedoch weiterhin eine kurative Möglichkeit der Behandlung. Immuntoleranz ist eine erworbene Fähigkeit. Man müsste daher das Immunsystem gezielt „lehren“, ein spezielles Allergen zu tolerieren. Zur Erreichung dieses Ziels sind unterschiedliche Wege denkbar.

Unser Ansatz beruht auf der Annahme, daß spezifische regulatorische T-Zellen (Treg) eine hyperreaktive Reaktion spezifisch supprimieren können.

Wir versuchten mittels Adjuvanzen Treg *in vitro* gezielt zu induzieren. Da Treg einen spezifischen TCR gegen ein korrespondierendes Antigen tragen, sollte damit die Suppression allergenspezifisch sein.

Wir vermuten, daß eine solch spezifische Suppression nebenwirkungsarm wäre.

Durch die Induktion der Treg wird nach unserem Verständnis ein physiologischer Zustand hergestellt, bei dem ein Organismus nicht mehr auf ein Allergen reagiert. Dabei wird die Reaktion auf Pathogene nicht beeinträchtigt (wie dies beispielweise durch Kortikoide geschieht).

3.1. Zugrundeliegende Experimente im murinen Modell

Stock *et al.* gelang es im murinen Tiermodell regulatorische T-Zellen durch speziell geprägte dendritische Zellen zu induzieren²¹. Sie sensibilisierten Mäuse mit Ovalbumin (OVA) und andere mit OVA und HKL gleichzeitig. In einem nächsten Schritt isolierten sie DCs aus der Milz dieser Mäuse, und transferierten diese in eine zweite Gruppe von Mäusen, die wiederum mit OVA sensibilisiert wurde.

Diese Mäuse wurden dann mit Methacholin intranasal provoziert. Dabei zeigte die Gruppe der Mäuse, die OVA+HKL geprägte DCs erhalten hatte, eine deutliche Reduktion der hyperreaktiven Atemwegsreaktion verglichen mit den Mäusen, die nur OVA-geprägte DCs erhalten hatten.

In einem anderen Versuchsaufbau wurden die oben beschriebenen DC zusammen mit naiven DO11.10-T-Zellen (diese haben einen spezifischen TCR gegen OVA) in Mäuse

transferiert. Nach einigen Tagen wurden die Mäuse geopfert und KJ1-26(+) T-Zellen (KJ1-26 richtet sich gegen den DO11.10-TCR) durchflusszytometrisch analysiert.

Die Untersuchung der Zellen ergab, dass diese gleichzeitig IFN- γ und IL10, aber kein IL4, produzierten, sowie CD25, ICOS und die Transkriptionsfaktoren FoxP3 und T-bet exprimierten.

Auch der Transfer dieser T-Zellen konnte eine AHR in vorher OVA-sensibilisierte Mäusen supprimieren. DO11.10-T-Zellen, die von lediglich durch OVA geprägten DC induziert worden waren, vermochten dies nicht. Stock *et al.* schlossen daher, mittels HKL einen Typ von Treg induziert zu haben. Da dieser phänotypische Merkmale von TH1-Zellen teilte, nannten sie ihn TH1-like Treg.

Auch *in vitro* konnten sie zeigen, dass der Transfer dieser TH1-like Treg eine durch DC(+)/OVA induzierte T-Zell-Proliferation supprimieren konnte. Dieser Effekt war abhängig von IL10 und dem ICOS/ICOSLigand-pathway.

3.2. Flagellin

Um herauszufinden, welcher Bestandteil der HKL die immunmodulatorischen Eigenschaften vermittelt, untersuchte Stock diese Effekte an verschiedenen knockout-Mäusen. Die dazugehörigen Daten sind nicht publiziert, waren aber maßgeblich für die Entwicklung unserer Hypothese.

Bei TLR-4 knockout-Mäusen (TLR-4 bindet an LPS) und TLR-9-knockout-Mäusen (TLR-9 bindet an CpG-Motive) waren die protektiven Effekte von HKL weiterhin sichtbar, so dass diese Bakterienbestandteile als verantwortliches Adjuvanz ausschieden. LPS und CpG-Motive sind zudem sehr unspezifisch und in vielen Bakterien vertreten.

Ein weiterer interessanter Kandidat, der darüber hinaus spezifischer für Listerien ist, ist Flagellin. Dieses bindet an TLR-5. Eine TLR-5-knockout-Maus war zum Zeitpunkt der Versuche von Stock *et al.* (2003) noch nicht verfügbar, so daß die Frage offen blieb, ob die immunmodulatorischen Fähigkeiten der HKL auf Flagellin zurückzuführen sind.

Die Arbeitsgruppe Stefan Scheurer und Stefan Schülke (PEI, Langen) wies nun im murinen Modell nach, daß die Expression von TLR-5 nach Flagellin-Kontakt deutlich erhöht ist. Ein von der Arbeitsgruppe hergestelltes Fusionsprotein aus Ovalbumin und Flagellin hat sowohl präventive als auch therapeutische Effekte im murinen Allergiemodell mit Ovalbumin^{51 81}.

3.3. Hypothesen

Wir wollten diese positiven Erfahrungen aus dem murinen Modell mit HKL aufgreifen und in ein humanes Modell übertragen.

Unsere Hypothesen lauteten:

- 1.) HKL als Adjuvans haben immunmodulatorische Eigenschaften, und können in PBMCs von Allergikern eine allergenspezifische T-Zell-Proliferation supprimieren.
- 2.) Sie erreichen diese Fähigkeit durch Induktion regulatorischer T-Zellen, die CD3(+)CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) sind, die Treg-spezifischen Zytokine IL10 und TGF- β produzieren und Treg-typische Oberflächenmarker exprimieren.
- 3.) Flagellin als Schlüsselprotein ist für die immunmodulatorischen Fähigkeiten von HKL verantwortlich.
- 4.) Die immunmodulatorischen Effekte werden durch gezielte Induktion von Apoptose verursacht.

Um mit einem praxisrelevanten Modell zu arbeiten wählten wir Lieschgras als Allergen für unser Zellkultur-Modell.

Wir wählten humane PBMC als Material. Die Arbeitsgruppe Stock hatte bereits Erfahrungen mit PBMC im murinen Modell gesammelt. Diese waren allerdings, wie zuvor beschrieben, durch dendritische Zellen stimuliert worden und nicht direkt durch Allergen.

Wir suchten in Versuchsreihen mit steigenden Allergenkonzentrationen die optimale Konzentration für unsere Versuche. In weiteren Versuchsreihen musste der optimale Messpunkt in Tagen nach Beginn der Versuche gefunden werden.

Um von einer allergenspezifischen Proliferation ausgehen zu können, musste der Nachweis gelingen, dass Allergen bei Kulturen von Allergikern eine T-Zell-Proliferation auslöst, beim Nicht-Allergiker jedoch nicht.

In der Folge wollten wir diese Proliferation wiederum durch Zugabe von HKL und später Flagellin supprimieren. Hierzu waren abermals Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen unserer Adjuvanzen erforderlich.

Schließlich planten wir die entstandenen Zellen zu phänotypisieren und so den Nachweis zu erbringen, regulatorische T-Zellen induziert zu haben.

Mittels durchflusszytometrischer Messungen und Zytokinbestimmungen in Überständen wollten wir die Induktion von Treg nachweisen. Die dabei zum Einsatz kommenden Oberflächenmarker und Zytokine wurden in Kapitel 2 ausführlich beschrieben.

Einer der aktuell diskutierten Wirkmechanismen von Treg ist die in Effektor-T-Zellen induzierte Apoptose durch das Abschöpfen von Zytokinen. Wir gingen daher davon aus, daß sich durch unsere Adjuvanzien (HKL und spezifisches Flagellin) Treg induzieren lassen, die wiederum in Effektor-T-Zellen zu Apoptose führen.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte, Verbrauchsgüter und verwendete Lösungen

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Lösungen tabellarisch dargestellt.

4.1.1. Geräte

Tabelle 4.1: Geräte

| Gerät | Hersteller / Bezeichnung |
|------------------------------------|--|
| Brutschrank | Heraeus HERAcell |
| Durchflusszytometer | BD FACSCanto II, Serial No. V96100778 |
| Feinwaage | Mettler AE260 DeltaRange |
| Inverses Auflicht- Mikroskop | Zeiss Axiovert 10 |
| Kühlschrank | Liebherr |
| Magnetrührer | IKA RCT basic |
| Mehrkanalpipetten | Eppendorf Research 100µl, 300µl |
| Mikroskop | Zeiss Primo Star |
| Pipetten | Eppendorf Reference 1000µl, 300µl, 200µl, 20µl |
| Pipettierhelfer | Braun accu-jet |
| Präzisionswaage | Kern-PCB |
| Reagenzglasschüttler | Heidolph Reax 2000 |
| Schüttelwasserbad | GFL 1083 |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe, Typ HS18 |
| Tiefkühlschrank: -21°C | Liebherr Premium |
| Tiefkühlschrank: -80°C | Hera freeze, Heraeus/Kendro - HFU 686 basic |
| Vakuum-Absaugsystem | KNF Neuberger Laboport |
| Vortexmischer | IKA-MS1 Minishaker |
| Zählkammer | LO-Laboroptik, Neubauer |
| Zentrifuge | Heraeus Instruments Megafuge 1.0R |

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.2: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsgut | Hersteller | Katalognummer |
|------------------------------------|------------|---------------|
| Ammonium Heparin Vacutainer | BD | 367878 |
| Transferpipette 3,5ml | Sarstedt | 86.1171.001 |
| Zentrifugen / FACS-Röhren 5ml | Sarstedt | 55.1579.002 |
| 6-Multischalen-Platte | BD Falcon | 353046 |
| 15 ml Röhren mit Schraubverschluss | Sarstedt | 62.554.502 PP |
| 24-Multischalen-Platte | BD Falcon | 353047 |
| 50 ml Röhren mit Schraubverschluss | BD Falcon | 352098 |
| Pipettenspitzen | | |
| 1000µl | Sarstedt | 70.762 |
| 200µl | Sarstedt | 70.760.002 |
| 10µl Typ J | Sarstedt | 70.1116 |

4.1.3. Verwendete Software

Tabelle 4.3: Verwendete Software

| Programm | Version | Produzent |
|----------------------|---------------------|-----------------|
| BD FACSDiva | 6.1.1 und 6.1.3 | BD |
| Microsoft Word 2010 | Office Student 2010 | Microsoft |
| Microsoft Excel 2010 | Office Student 2010 | Microsoft |
| Microsoft PowerPoint | Office Student 2010 | Microsoft |
| Paint.net | v04.0.5 | dotPDN LLC |
| EndNote X4 | X4 | Thomson Reuters |

4.1.4. Verwendete Lösungen

Alle verwendeten Lösungen (Chemikalien, Farbstoffe und Antikörper) wurden, wenn im Einzelnen nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben gelagert, verdünnt und verwendet. Sie werden im Folgenden tabellarisch aufgezählt.

Tabelle 3.4: verwendete Lösungen

| Bezeichnung | Hersteller / Bestellnummer |
|--|--|
| <i>Für die Zellkultur</i> | |
| BIOCOLL Separating Solution, Density 1,077 g/ml | Biochrom AG, LG115 |
| Dulbecco's PBS w/o Ca & Mg | PAA Laboratories GmbH, #H15-002 |
| Türks Lösung | Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, 93770 |
| 2-Propanol (70% in Aqua dest.) | Merck, Artikelnummer: 100995 |
| Aqua dest. | Charité, Labor |
| <i>Für das Zellkulturmedium</i> | |
| Autologes Probandenserum | Selbst, aus Blutentnahme |
| B-Mercaptoethanol | Carl Roth, 4227.1 |
| L-Glutamin [2mM] | PAA Laboratories, Linz, A |
| Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml | Seromed, Biochrom, A 2212 |
| RPMI 1640 | PAA Laboratories GmbH #E15-039 |
| <i>Für intrazelluläre Färbungen</i> | |
| Ionomycin | Sigma-Aldrich, cat. no. I0634 |
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | Sigma-Aldrich, cat. no. P8139 |
| DMSO | Sigma-Aldrich, cat. No. D2650 |
| Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™ | BD Biosciences, 555028 |
| Human FOXP3 Buffer Set | BD Biosciences , 560098 |
| Anti-human-FOXP3-Staining Set PE | ebioscience, 72-5774-40 |

Tabelle 4.5: konjugierte Antikörper und Färbungen für die Durchflusszytometrie

| Epitop | Fluorophor | Hersteller | Art.-Nr. | Isotyp | Art.-Nr. Isotyp |
|---|------------------------|---------------|----------------------|--------------|-----------------|
| Zelloberflächenfärbungen | | | | | |
| CD3 | PE | BD Pharmingen | 345765 | Mouse IgG1 κ | 555749 |
| CD4 | FITC | eBioscience | 11-0047 | Mouse IgG1,κ | 11-4714 |
| CD4 | APC | eBioscience | 17-0049 | Mouse IgG1 κ | 17-4714 |
| CD25 | APC-Cy TM 7 | BD | 557753 | Mouse IgG1,κ | 348812 |
| CD127 | PE | eBioscience | 12-1278 | Mouse IgG1,κ | 12-4714 |
| CTLA-4 | PE | eBioscience | 12-529 | Mouse IgG2a | 12-4724 |
| ICOS | PE | eBioscience | 12-9948 | Mouse IgG1 κ | 12-4714 |
| LAP | PE | R&D Systems | FAB2463P | Mouse IgG1 | IC002P |
| Zur Messung von Transkriptionsfaktoren | | | | | |
| FoxP3 | PE | eBioscience | 12-4777 & 72-5774 | Mouse IgG1,κ | 12-4714 |
| FoxP3 | PerCP-Cy 5.5 | eBioscience | 45-4776 | Rat IgG2a, κ | 45-4321-80 |
| Zur Messung von Zytokinen | | | | | |
| IL4 | PE | BD Pharmingen | 559333 | Mouse IgG1,κ | 559320 |
| IFN- γ | PE | BD Pharmingen | 559326 | Mouse IgG1,κ | 559320 |
| IL10 | PE | BD Pharmingen | 559339 | Rat IgG2a, κ | 559317 |
| Proliferationsnachweis | | | | | |
| CFSE | CFSE | Invitrogen | C34554 | Kein AK | kein |

4.1.5. β-Mercaptoethanol (2ME)-Arbeitslösung

2ME dient in Zellkulturen als reduzierendes Agens und verhindert toxische Konzentrationen von Sauerstoffradikalen. In Zellkulturen hat es einen förderlichen Effekt auf Proliferation und Differenzierung⁸². Um eine gute Durchmischung zu erreichen, setzen wir unsere Arbeitslösung in einem zweiteiligen Arbeitsprozess an.

- 160µl (= 4%) β-Mercaptoethanol + 3840 µl PBS (96%) ergibt 4ml.
- Davon 400µl + 3600 µl PBS ergeben 4ml Arbeitslösung.

Sie bestand folglich aus 0,4% β-Mercaptoethanol und 99,6% PBS.

4.1.6. Kulturmedium

Das Kulturmedium wurde zur Aufnahme der Zellen enthält:

- 98,9 % RPMI 1640
- 5 % autologes Serum
- 5 % L-Glutamin
- 1 % PenStrep
- 0,1% β -Mercaptoethanol-Arbeitslösung

4.1.7. Allergenextrakte, HKL und Flagellin

Zur Verwendung kamen zwei unterschiedliche Allergenextrakte. Anfangs verwendeten wir eine Provokationstest-Lösung der Firma ALK-Scherax. Im Verlauf wechselten auf ein speziell für T-Zell-Kulturen entwickeltes Lieschgras-Allergenextrakt der Firma Allergopharma. Dieses enthält alle bekannten Allergene des Phleum pratense.

Es wurde uns freundlicherweise kostenfrei von Professor Fiebig, Allergopharma, zur Verfügung gestellt. Das Wiesenlieschgras-Extrakt von Allergopharma wurde entsprechend der Herstellerempfehlung mit PBS zu einer Stocklösung von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt und danach bei -20°C gelagert.

Das rekombinant hergestellte Flagellin wurde uns von der Arbeitsgruppe Stefan Scheurer und Stefan Schülke (PEI, Langen) kostenfrei zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.6: Allergenextrakte

| Produkt | Hersteller | Konzentration |
|--|------------------------------------|--|
| ALK-lyophilisiertes SQ 225 Wiesenlieschgras | ALK-Scherax | 100.000 SQ-E/ml |
| Wiesenlieschgras-Extrakt Phleum Pratense | Allergopharma Joachim Ganzer KG | 5,753 mg Protein – 11.328 PNU (protein nitrogen unit) |

Tabelle 4.7: HKL und Flagellin

| Produkt | Hersteller | Konzentration |
|--|--------------------------------------|--|
| Rekombinantes Flagellin, rFlaA, endotoxinfrei | Arbeitsgruppe Stefan Schülke, PEI | 310 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, 4,5 mg Protein / vial |
| Heat Killed Listeria monocytogenes (HKLM) | InvivoGen | 10^{10} HKLM in 2 ml sterile endotoxin-free water |

4.2. Methoden

4.2.1. Probandenauswahl

Die Probanden wurden vor den Blutentnahmen um ihr Einverständnis gebeten, über mögliche Nebenwirkungen aufgeklärt und dieses schriftlich festgehalten.

Probanden wurden mittels eines automatisierten Sandwich-ELISA (ImmunoCap) auf Lieschgras-Sensibilisierung getestet. Ein spezifischer Titer der CAP-Klasse von ≥ 3 sowie eine anamnestisch bekannte Symptomatik galten als Einschlusskriterium als Lieschgras-Allergiker. Dahingegen durften Gesamt-IgE und spezifisches IgE gegen Lieschgras den Schwellenwert für CAP-Klasse Null nicht überschreiten, um als Nichtallergiker zu Kontrollzwecken Verwendung zu finden.

ImmunoCap bezeichnet ein in der klinischen Routinediagnostik gebräuchliches automatisiertes System der Firma Phadia zur Messung von spezifischem IgE *in vitro*. Der durchgeführte Test „sx-1“ bezeichnet einen Screening-Test für IgE gegen inhalative Allergene. Er beinhaltet die Teste gegen Dermatophagoides pteronyssinus (d1), Katzenschuppen (e1), Hundeschuppen (e5), Lieschgras(g6), Roggen(g12), Cladosporium herbarum (m2), Birke (t3), Beifuß (w6).

Wenn der sx-1 positiv ausfiel, wurde eine Einzelallergentestung auf spezifisches IgE gegen Lieschgras-Allergen (Test „g6“) durchgeführt.

Tabelle 4.8: Probanden

| Proband | „sx1“ | „g6“ | CAP-Klasse |
|------------------------|----------------|----------------|------------|
| Allergiker | | | |
| Allergiker 1 | 5,67 kUA/l | 4,83 kUA/l | 3 |
| Allergiker 2 | Nicht getestet | 19,5 kUA/l | 4 |
| Allergiker 3 | 16,5 kUA/l | 16,4 kUA/l | 3 |
| Allergiker 4 | 43,2 kUA/l | 24,2 kUA/l | 4 |
| Nichtallergiker | | | |
| Nicht-Allergiker 1 | 1,21 kUA/l | 0,07 kUA/l | 0 |
| Nicht-Allergiker 2 | 0,04 kUA/l | nicht getestet | 0 |
| Nicht-Allergiker 3 | 0,71 kUA/l | 0,00 kUA/l | 0 |
| Nicht-Allergiker 4 | 0,07 kUA/l | nicht getestet | 0 |

4.2.2. PBMC

Das Akronym PBMC steht für „peripheral blood mononuclear cells“. Das „periphere Blut“ beschreibt das zirkulierende Blut in den Blutgefäßen außerhalb der lymphatischen Organe, Leber, Milz oder Knochenmark. Die mononukleären Zellen in PBMC bestehen hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten.

Das periphere Blut enthält etwa 10×10^9 Lymphozyten, und damit nur etwa 2% des gesamten menschlichen Lymphozytenpools⁸ (S.262). Diese Lymphozyten werden jedoch pro Tag vielfach ausgetauscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde das folgende Verfahren zur PBMC-Gewinnung für menschliche Zellen etabliert:

Das Blut der Probanden wird in Heparin-Röhrchen aufgenommen. Innerhalb einer Stunde nach Abnahme wird das Serum bei 25°C mit 2200 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Serum wird mit einer Transferpipette abgenommen. in 15ml Röhren mit Schraubverschluss überführt. Es folgt ein Zentrifugationsvorgang mit 3000 U/min für 5 Minuten bei 4°C. Danach wird es abermals von zellulären Rückständen abpipettiert, in einem 15 ml Röhrchen aufgenommen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Es wird als autologes Serum bei der Erstellung des Zellmediums verwendet.

Das nun serumarme Blut wird zu gleichen Teilen mit RPMI gemischt und auf Biocoll Separating Solution der Firma Biochrom geschichtet.

Nach einem Zentrifugationsvorgang (2200 U/min, 15 min, 25°C, ungebremst) bildet sich eine trübe Interphase zwischen Separationsflüssigkeit und RPMI. Darin sind entsprechend des Dichtegradienten die mononukleären Zellen enthalten.

Diese Interphase wird abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen, und dann in einer definierten Menge PBS resuspendiert (in unserem Falle 3ml PBS).

Nun kann nach Anfärbung einer kleinen Menge Zellen mit Türkscher Lösung die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgen. Dazu entnimmt man 10µl der Zelllösung und färbt diese mit 190µl Türkscher Lösung (Verhältnis 1:20).

Eine Neubauer Zählkammer wird mit der Zelllösung beschickt. Das mittlere Großquadrat der Zählkammer besteht aus 16 Gruppenquadraten. Es wird der Mittelwert der in vier Gruppenquadraten enthaltenen Zellen gebildet.

Zum Errechnen der Gesamtzellzahl kommt folgende Formel zum Einsatz:
 Gesamtzellzahl = $n \cdot 20 \cdot \text{Zellsuspensionsvolumen} \cdot \text{Kammerfestfaktor}$

Dabei sind:

- n die Anzahl von Lymphozyten in 4 Quadranten der Kammer (genauer der Mittelwert von 16/4 Quadranten)
- 20 die Verdünnung der Zellsuspension in Türckscher Lösung,
- das Zellsuspensionsvolumen die Menge PBS in Milliliter, in der die Zellen gelöst wurden,
- und der Kammerfestfaktor für die Neubauer Zählkammer 10000.

4.2.3. Zellkultur

Bis zu diesem Zeitpunkt ist die erhaltene Gesamtzellzahl aus der Blutentnahme noch nicht sicher benennbar. Erst nach dem Zählen, kann der Versuchsaufbau endgültig geplant werden, da für jede 2ml-Kulturschale 2×10^6 Zellen einzusetzen sind.

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10^6 Zellen je ml resuspendiert. Dazu verwendeten wir je nach Versuchsaufbau 24-Multischalen-Platten mit einem Schalenvolumen von jeweils 2 ml, oder 6-Multischalen-Platten mit 10 ml je Schale.

Der Bedarf richtete sich nach der geplanten Färbung im Anschluss, wobei ein aufwendiger Versuchsaufbau eine größere Zellzahl und damit ein größeres Volumen je Schale benötigt.

Alle Schalen enthielten Zellen und Zellkulturmedium. Zusätzlich enthielten einige Schalen Lieschgras-Allergenextrakt und / oder HKL, und / oder rekombinantes Flagellin. Diese Platten wurden bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Folgenden wird ein typischer Versuchsaufbau beschrieben:

- 1 bis 2 Schalen ungefärbter Zellen (d.h. ohne CFSE), ohne Lieschgras, HKL oder Flagellin. Dies war wichtig zur Kompensation im FACS.

Alle weiteren Schalen enthielten CFSE-gefärbte Zellen, davon:

- Mindestens eine Schalen „ohne Lieschgras“
- Schalen mit Lieschgras in aufsteigender Dosis und / oder
- Schalen mit Lieschgras plus HKL in aufsteigender Dosis und / oder
- Schalen mit Lieschgras plus Flagellin in aufsteigender Dosis.
- Ggf. Schalen mit nur HKL oder Flagellin, ggf. in aufsteigender Dosis.

4.2.4. **Mikroskopie**

Der Beginn der Zellproliferation zeigte im Rahmen unserer Versuche eine geringe Varianz von bis zu zwei Tagen. Zur Bestimmung eines geeigneten Messtages erfolgten zuvor mikroskopische Kontrollen an einem inversen Auflichtmikroskop. In Zellkulturen mit rascher Proliferation geht der Proliferation eine sichtbare Grüppchenbildung der Zellen voraus. Es ergibt sich ein dichteres Zellbild. Erst nach Einsetzen dieser mikroskopisch sichtbaren Effekte zeigte sich auch eine im FACS messbare Proliferation.

Der Vorteil des Mikroskopierens ist, daß die Zellkulturen schnell, und ohne die Kulturplatten zu öffnen, kontrolliert werden können. Dadurch wird das Risiko einer Kontamination verringert und die Störung der Inkubation zeitlich kurz gehalten.

4.2.5. **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie erlaubt das Zählen von in einem Medium gelösten Zellen, die Bestimmung ihrer Größe und Granularität und ihre weitere Differenzierung durch spezielle Färbungen.

Häufig wird das Akronym FACS synonym verwendet; es steht für „fluorescence activated cell sorting“. Die Bezeichnung FACS ist ein rechtlich von der Firma BD geschützter Begriff.

Die Durchflusszytometrie beruht auf folgendem Prinzip: Gelöste Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einen Laserstrahl. Je nach ihren Eigenschaften streuen sie dabei das Licht im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, SSC) oder beugen es im flachen Winkel (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter, FSC). Dabei streuen granuliert Zellen mit großem Zellkern und rauer Oberfläche das Licht zunehmend im SSC, wohingegen das Volumen der Zelle maßgeblich für das Ausmaß der Beugung im FSC ist. Auf diese Weise lassen sich bereits gute Erkenntnisse über das Untersuchungsgut gewinnen. Man kann einige unterschiedliche Leukozytenpopulationen voneinander unterscheiden. Eine Differenzierung der T-Zell-Subtypen ist jedoch nicht möglich.

Dafür verwendet man Antikörper, die sich gegen bekannte Antigene von Zellen richten. Diese sind an Farbstoffe gekoppelt, die Fluorochrome. Die Fluorochrome werden durch Laser zur Fluoreszenz angeregt. Dieses Licht wird dann durch Filter auf Detektoren (Photomultipliertubes, PMT) geleitet und gemessen⁸³. Durch die Filter gelangt nur Licht

spezieller Bandbreiten auf die PMTs und erhöht so die Spezifität. Die Bandbreite der Filter entspricht daher absichtlich den Emissionsspitzen der Fluorochrome.

Aus der Kombination von Lasern, Filtern und PMTs entstehen unterschiedliche Kanäle.

Das von uns verwendete BD FACS Canto II verfügt über zwei Laser mit 4 und 2 Filtern und damit sechs solcher Kanäle. Damit ermöglicht das Gerät die Darstellung von maximal sechs unterschiedlichen Färbungen gleichzeitig.

Diese Tabelle *Laser und Filter BD FACSCanto II* listet die Kanäle im Einzelnen auf.

Tabelle 4.9: Laser und Filter BD FACSCanto II

| Laser | Filter | Fluorochrom, Beispiele | Emissionsmaximum des Fluorochroms |
|-------------------------|---------------|--|--|
| 488nm (blau) | 530/30 nm | FITC CFSE | 525 518 |
| | 585/42 | PE | 575 |
| | >678 nm | PerCP / PerCP-Cy TM 5.5 7-AAD | 678 695 647 |
| | 780/60 nm | PE-Cy TM 7 | 785 |
| 633nm (rot) | 660/20 | APC | 660 |
| | 780/60 | APC-Cy TM 7 | 785 |

Die meisten im FACSCanto II verwendeten Filter sind Bandpass-Filter. Das bedeutet am Beispiel des ersten Kanals, dass er Licht um 530 nm \pm 15 nm, also von 515 nm bis 545 nm, auf den dahinterliegenden Detektor leitet.

Die Filter lassen zwar nur Licht gewisser Wellenlängen auf die PMTs, die Bandbreite des Emissionsspektrums der jeweiligen Farbstoffe ist jedoch wesentlich weiter als ihr Emissionsmaximum. Das bedeutet, dass CFSE zwar sein Maximum bei etwa 518 nm hat, aber auch noch mit geringerer Intensität in den nahen PE-Kanal einstrahlt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Kompensation.

Bei diesem Vorgang stellt man die Software des FACSCanto II so ein, dass eine rein CFSE-positive Zellpopulation nicht mehr im benachbarten PE-Kanal sichtbar wird und so weiter. Daher sollte vor neuen Messungen immer eine Kompensation durchgeführt

werden, bei der man Proben, die mit jeweils nur einem der zu verwendenden Fluorochrome gefärbt wurden, misst.

Die in der Tabelle genannten Fluorochrome sind exemplarisch erwähnt. So wird beispielsweise CFSE auf demselben Kanal wie FITC gemessen, oder Alexa-Fluor647 auf demselben Kanal wie APC. Wichtig aber ist, dass pro Kanal nur ein Fluorochrom gleichzeitig gemessen werden kann.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software FACSDiva in Form von zweidimensionalen Punkt-Diagrammen, den „dot plots“ oder in eindimensionalen Histogrammen.

In den dot plots entspricht ein „event“ in der Regel einer Zelle oder einem Zellfragment und wird als Punkt im Diagramm aufgetragen. Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung als Fläche wieder. Wir haben zur Analyse je nach Versuchsaufbau zwischen 10.000 und 100.000 events je Probe gemessen, um auch für seltene Subpopulationen noch genügend Zellen zur Auswertung zu finden.

Durch das Setzen von Analysefenstern („gates“) kann der Fokus der Untersuchung auf bestimmte Zellpopulationen gelenkt werden.

4.2.6. **CFSE-Färbung**

CFSE ist ein Farbstoff, der es erlaubt die Proliferation von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu verfolgen.

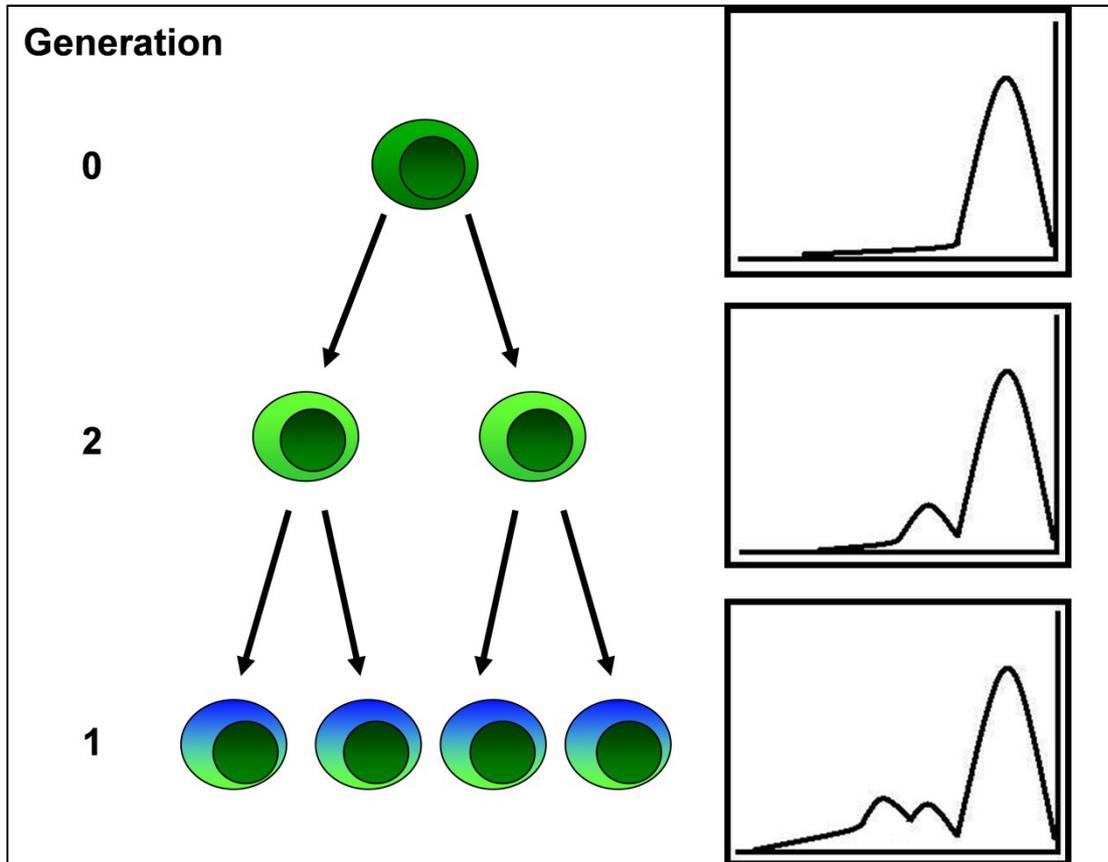
Es ist als Vorstufe CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester) sehr permeabel und dringt passiv in Zellen ein. Intrazellulär wird die Azetat-Gruppe von Esterasen entfernt. Somit wird das CFDA-SE in die weniger permeable Form CFSE überführt, die nun folglich in der Zelle gefangen ist⁸⁴. CFSE ist zusätzlich stark fluoreszierend.

In der Durchflusszytometrie lässt sich CFSE aufgrund seines Emissionsmaximums von 518 nm gut mit Hilfe des blauen Lasers und des 530/30nm Bandpassfilters messen.

In Histogrammen sieht man die CFSE-gefärbte Zellpopulation als deutlich sichtbaren Gipfel mit relativ einheitlicher Intensität. Beginnen nun die gefärbten Zellen zu proliferieren, wird jeweils die Hälfte des CFSE der parentalen Zelle an die beiden entstehenden Tochterzellen weitergegeben. Im FACS erscheint diese Generation als Gipfel mit deutlich geringerer Intensität. Teilen sich diese Zellen wieder, entsteht eine Zellgeneration, die nur noch ein Viertel der CFSE-Menge enthält und so fort. Da es

keinen anderen Weg für die Zellen gibt sich des CFSE zu entledigen, kann man die Zellproliferation nachverfolgen. Bis zu acht Zellgenerationen sollen sich unter optimalen Bedingungen verfolgen lassen⁸⁵.

Abbildung 4.1: Prinzip der CFSE-Färbung



Die Grafik Prinzip der CFSE-Färbung stellt das Verfahren schematisch dar. Die „dunkelgrüne“ Zelle der „Generation 0“ repräsentiert eine initial CFSE-gefärbte Zelle. Im Durchflusszytometer imponiert eine Population dieser Zellen als ein deutlicher Gipfel (Histogramm).

Die Folgegenerationen gehen durch Zellteilung hervor. Sie enthalten weniger CFSE (hier blasseres grün), und im Histogramm zeigt sich eine zweite Zellpopulation geringerer CFSE-Intensität neben der parentalen Generation, usw.

Teilten sich alle Zellen der parentalen Generation, würde der initiale Gipfel im FACS verschwinden.

Ein Nachteil von CFSE ist seine Zytotoxizität. Diese tritt bei hohen Konzentrationen auf. Daher war es erforderlich, die optimale CFSE-Menge zu finden, die noch eine ausreichend lange Beobachtung der Zellen gestattet und dabei die Zellen nicht

beeinträchtigt⁸⁵. Innerhalb zum Färben ausreichender Konzentrationen kann CFSE als nicht-toxisch angesehen werden⁸⁶.

Ein weiterer Nachteil ist seine hohe Fluoreszenzintensität. Hierdurch kann es in andere Kanäle des FACS hineinleuchten, allen voran den benachbarten PE-Kanal⁸⁵. Das kann es schwierig machen, die beiden Farben später mittels Kompensation voneinander zu trennen.

Anwendung

CFSE ist sehr lichtempfindlich. Es wurde lichtgeschützt gelagert, und wir haben während des Färbens unter abgedunkelten Bedingungen damit gearbeitet.

Entsprechend Herstellerangaben fertigten wir die CFSE-Stocklösung an:

Eine Ampulle CFSE(Component A) wird in 18µl DMSO (Component B) aufgelöst. Somit entsteht eine 5-millimolare Lösung. Für Experimente mit einer Dauer von über drei Tagen empfiehlt der Hersteller 5-10 mikromolare Lösungen.

Zum Färben muss weiter verdünnt werden: Einmal wird 1:100 mit PBS und davon dann abermals 1:12,5 mit PBS verdünnt. Mit dieser Gebrauchslösung kann gefärbt werden.

Dazu zentrifugiert man die zu färbenden Zellen, und resuspendiert sie in PBS zu einer Konzentration von 10^7 Zellen je ml PBS. Nun müssen die Zellen, die zu Kompensationszwecken nicht gefärbt werden sollen, entnommen und in Medium resuspendiert werden.

Zu den verbleibenden Zellen gibt man die gleiche Menge unserer verdünnten CFSE-Gebrauchslösung und färbt unter Schwenken für 3 Minuten. Haben wir also beispielsweise 2×10^7 Zellen, so lösen wir diese in 2 ml PBS. Dann stellen wir 2 ml CFSE-Gebrauchslösung her, die etwa 1,6µl CFSE-Stocklösung enthält. Wir befinden uns damit etwas unterhalb der empfohlenen Herstellerdosierung (5-10 µM) und sollten entsprechend nicht im toxischen Bereich sein. Auch empfiehlt Invitrogen eine Färbezeit von 5 Minuten, wir haben jedoch festgestellt, daß in unserem Falle 3 Minuten reichen.

Danach stoppen wir mit der doppelten Menge Stopplösung (in unserem Beispiel 4 ml), bestehend aus RPMI mit 10% autologem Serum. Darin ruhen die Zellen für eine Minute. Dann werden die Zellen in der Zentrifuge gewaschen. Der Überstand wird verworfen, und es erfolgt ein weiterer Waschgang. Danach werden die Zellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen je ml in Medium resuspendiert.

4.2.7. Apoptose-Nachweis

Die Annexin-V-Färbung ist eine für die Durchflusszytometrie geeignete Färbung, um Apoptose bei Zellen nachzuweisen. Wie in Kapitel 2.14 beschrieben führt Apoptose zur Externalisierung des sonst auf der Innenseite von Zellmembranen gelegenen Phosphatidylserin. Diese Verlagerung findet vor dem Integrationsverlust der Zellmembran statt, und somit kann der Fund von Phosphatidylserin auf einer sonst intakten Zelle nachweisen, dass sie sich in Apoptose befindet.

Zum Nachweis von Phosphatidylserin als auch der Zellintegrität kommt eine Doppelfärbung zum Einsatz:

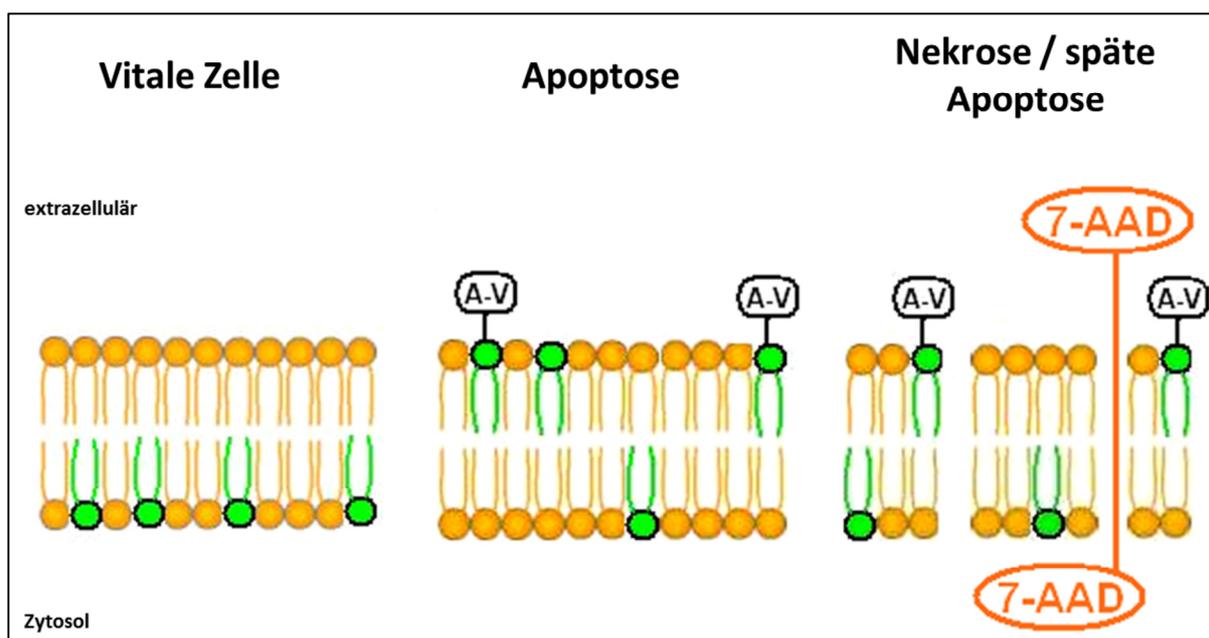
1.) Nachweis von Phosphatidylserin

Das Protein Annexin-V (A5) bindet in der Anwesenheit von Kalzium-Ionen mit hoher Affinität an Phosphatidylserin. Konjugate von Annexin-V mit Fluorochromen können daher zum direkten Nachweis verwendet werden.

2.) Nachweis der Integrität der Zellmembran

7-Aminoactinomycin (7-AAD) ist ein Avitalfarbstoff genanntes Peptid, das nur passiv durch Lücken in Zellmembranen in Zellen gelangen kann, und dort mit der DNS interkaliert. Bei der Interkalation ändert es seine Fluoreszenzeigenschaften. Somit kann es nun durchflusszytometrisch innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. 7-AAD-positive Zellen besitzen also eine schadhafte Zellmembran.

Abbildung 4.2: Apoptose-Nachweis mittels Annexin V



Eine Zelle, die demnach A5-positiv, aber 7-AAD-negativ ist, befindet sich in einem frühen Stadium der Apoptose. Spätere Apoptose-Stadien lassen sich durch diese Färbung nicht mehr von anderen Formen des Zelltodes unterscheiden.

4.2.8. Färbungen in der Durchflusszytometrie

Zuerst erfolgte die Aufbereitung der Zellen für die Messungen. Dazu wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen, gewaschen, also vom Kulturmedium gereinigt, nach Bedarf gefärbt und in einer Lösung resuspendiert.

Die Zellen wurden mit Hilfe von sterilen Pipetten aufgewirbelt. Aus den Kulturschalen entnahmen wir jeweils 100 µl. Dieses wurden in einem Milliliter PBS aufgenommen, und mit 1300 U/min fünf Minuten bei 4°C in der Zentrifuge gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Dann wurden die Zellen in 100 µl PBS gelöst und die Zelloberflächen gefärbt.

Dazu wurden die suspendierten Zellen mit einer bestimmten Menge an markierten Antikörpern im Kühlschrank für 15 Minuten inkubiert. Die meisten Probenröhrchen erhielten alle Antikörper eines Experimentes, lediglich die Röhrchen für die Kompensation erhielten je nur einen Farbstoff. Diese wurden aus der bei jedem Experiment mitgeführten Schale „ohne CFSE“ genommen. Das Kompensationsröhrchen für CFSE wurde aus einer beliebigen anderen Schale entnommen. Danach wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS bei 1300 U/min und 4°C für 5 min gewaschen. Wenn nicht zusätzlich intrazellulär gefärbt wurde, wurden die Zellen nun in 150 µl PBS gelöst und waren bereit zur Messung.

Sollten zusätzlich intrazelluläre Antigene (FoxP3) gefärbt werden, wurde nach dem letztbeschriebenen Waschgang folgendermaßen weiter verfahren:

Gemäß Herstellerangabe wurden die Zellen mit „Fix/Perm-Working solution“ 30 Minuten im Kühlschrank fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1ml Perm-Puffer in der Zentrifuge gewaschen (1500 U/min, 5 min, 4°C).

Nach dem Absaugen wurden die Zellen mit 100 µl FC-Block in Perm-Puffer resuspendiert. Nach einer Ruhephase von 15 Minuten im Kühlschrank konnten die Zellen mit FoxP3-Antikörpern gefärbt werden. Es folgte eine Ruhephase von 30 min bei 4°C. Hierauf konnten die Zellen zweimal mit PermPuffer gewaschen werden. Im Anschluss wurden sie in PBS resuspendiert und waren bereit zur Analyse.

Da die Zellen durch die Permeabilisierung kleiner werden und ihre Fluoreszenz ändern, wurden alle Röhrchen dieser Prozedur unterzogen (auch alle Kompensationsröhrchen).

4.2.9. Messung intrazellulärer Zytokine

Die Messung intrazellulärer Zytokine ist eine erprobte und allgemein anerkannte Methode⁸⁷. Prinzipiell wird ähnlich wie bei anderen intrazellulären FACS-Messungen verfahren. Jedoch ist die Menge der in Zellen vorhandenen Zytokine gering, so dass vorab die intrazelluläre Zytokinmenge erhöht werden muss.

Dazu werden die Chemikalien Ionomycin, PMA und Brefeldin A verwendet.

Ionomycin hebt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration, PMA aktiviert im wesentlichen Protein-Kinase C. Über diese Mechanismen stimulieren sie synergistisch T-Zellen zur Zytokinproduktion. Brefeldin A verhindert danach den Transport der Zytokine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wodurch die Zytokine in den Zellen akkumulieren. Nach Perforation der Zellen können sie gefärbt und somit nachgewiesen werden. Da Ionomycin / PMA die Expression von Oberflächenmarkern beeinflussen, untersuchten wir bei den Messungen die Oberflächenmarker separat.

Zuerst werden die Zellen wie bei jeder Messung aus den Schalen entnommen und mit PBS gewaschen und resuspendiert. Dann wird den Zellen 1µg/ml Ionomycin und 10 ng/ml PMA zugegeben und die Zellen werden 1,5h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wird BD GolgiPlugTM (enthält Brefeldin A) in einer Konzentration von 1µl/ml Zellkultur hinzugegeben und erneut für 3,5h bei 37°C inkubiert.

Dann werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (1200 U/min, 4°C, 10min).

Nun können nach dem bekannten Schema Zelloberflächen bei 4°C lichtgeschützt gefärbt werden.

Im Anschluss wird zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet resuspendiert

Nun 250 µl *Fixation/Permeabilization Solution* hinzufügen und 20 Minuten bei 4°C wirken lassen. Darauf erfolgt zweimaliges Waschen mit 1 ml *Perm/Wash Buffer* bei 1300U für 5 Minuten bei 4°C.). Im Anschluss, zur Vermeidung unspezifischer Bindung, die Zellen mit 100µl Fc-Block 5 Minuten bei 4°C blocken.

Nun kann man die intrazelluläre Zytokine und Isotypen färben. Dazu 30 Minuten bei 4°C dunkel inkubieren.

Im Anschluss erneut zweimal mit 1 ml *Perm/Wash Buffer* waschen (Zentrifugieren bei 1300 U/min für 5 min, 4°C). Zuletzt die Zellen in PBS aufnehmen und langsam (unter 2000 Events pro Sekunde) im Durchflusszytometer messen.

FC-Block (anti-CD16/CD32)

Der FC-Block dient der Vermeidung einer unspezifischen Bindung der eingesetzten Antikörper an Zellen.

Da Antikörper neben ihren spezifischen Bindungsstellen über eine unspezifische FC-Domäne verfügen, können sie von Zellen mit FC-Rezeptoren gefangen werden. Auch T-Zellen können FC-Rezeptoren tragen⁸⁸. Dies würde eine unerwünschte unspezifische Färbung bewirken.

Erfreulicherweise ist dies hauptsächlich dann ein Problem, wenn mit serumfreiem Kulturmedium gearbeitet wird. Unser Kulturmedium bestand zu 5% aus autologem Serum. Da dieses Antikörper enthält, werden FC-Rezeptoren auf Zellen bereits durch Antikörper aus dem Serum besetzt.

Intrazellulär bleibt dies natürlich aus. Für die intrazellulären Färbungen wurde daher ein FC-Block der Firma Nordic eingesetzt.

Messung am Durchflusszytometer

Der eigentliche Messvorgang sollte zeitnah erfolgen, da die gefärbten Zellen im Röhrchen nur eine begrenzte Haltbarkeit haben. Zuerst erfolgt die Messung der Kompensationsröhrchen. Danach erfolgt die Messung der Proberöhrchen und Isotypen. Im einleitenden Kapitel wurde erläutert, daß natürliche regulatorische T-Zellen die Oberflächen-Antigene CD3, CD4, CD25 und FoxP3 exprimieren. Auch Makrophagen und Granulozyten exprimieren CD4, jedoch kein CD25. Eine gemeinsame Färbung mit CD3 und CD4 ist daher nicht erforderlich, wenn nach CD25(+) Treg gefahndet wird. Daher kann die folgende Färbung als charakteristisch angenommen werden: CD4(+)CD25(+)FoxP3(+). Von vielen Autoren wird vereinfachend angenommen, dass dieses Expressionsmuster auch für induzierte Treg gilt. Das stimmt aber sicher nicht für alle Subtypen.

Im Gegensatz zur heftig diskutierten und bisher unvollständigen Systematisierung über exprimierte Antigene können auch über funktionale Beobachtungen Rückschlüsse auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen gezogen werden. Dies kann über die Beobachtung einer suppressiven Funktion erfolgen. In unserem Falle wiesen wir die Suppression durch verminderte Proliferation nach.

Auch über Zytokine können Rückschlüsse auf die sie produzierenden Zellen gezogen werden. Klassische Zytokine regulatorischer T-Zellen sind TGF- β und IL10. Kontrovers ist dabei zu sehen, dass IL10 auch ein TH2-Zytokin darstellt.

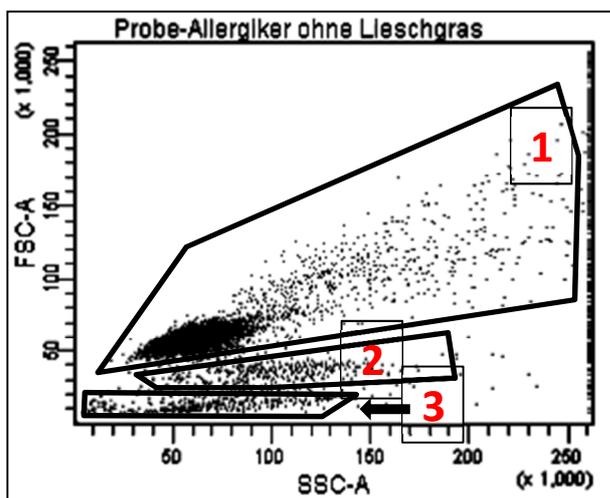
Das Fehlen des TH2-Zytokins IL4 kann bei gleichzeitiger Anwesenheit von TGF- β und IL10 auf Treg hinweisen.

Wir phänotypisierten die T-Zellen in der Durchflusszytometrie und untersuchten dabei auch ihre Fähigkeit zur Interleukin-Produktion sowie ihre suppressiven Fähigkeiten in der Zellkultur.

4.2.10. Setzen der Analysefenster

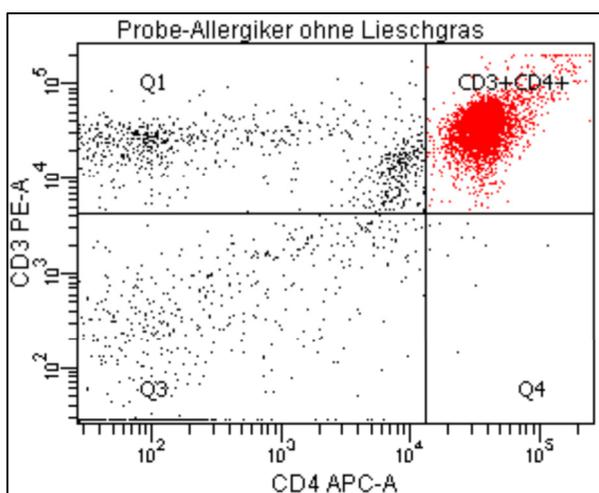
In der Durchflusszytometrie kann man abhängig vom genauen Setzen der Analysefenster, der „gates“, quantitativ äußerst unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

Abbildung 4.3: PBMC im FSC gegen SSC



Betrachtet man in unseren Versuchen alle Zellen einer Probe unabhängig ihrer Färbung nur im FSC gegen SSC, so fallen drei große Zellgruppen ins Auge. Um die T-Zellen innerhalb dieser Darstellung zu finden kann man folgendermaßen vorgehen:

Abbildung 4.4: Alle events mit CD3 gegen CD4

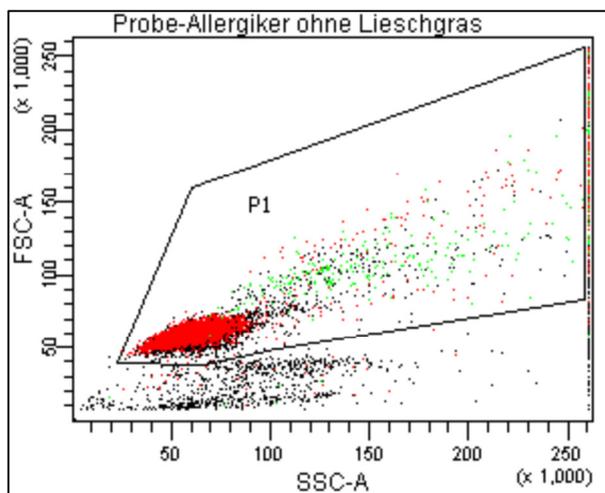


Man stellt alle gezählten events in einer Punktauftragung (dot plot) mit CD3 gegen CD4 dar.

Die Population, die positiv für beide Oberflächenmarker ist, kann in der FACSDiva-Software mit einer Farbe, (hier rot) markiert werden.

In allen weiteren Auswertungen werden diese Zellen nun rot erscheinen. Stellt man nun alle events im Vorwärts- gegen den Seitwärts-Scatter dar, wird erkenntlich, wo die CD3(+)CD4(+) T-Zellen liegen:

Abbildung 4.5: CD3(+)CD4(+) im FSC gegen SSC



Entsprechend kann für weitere Messungen ein Gate (hier P1) gesetzt werden, in dem die T-Zellen zu erwarten sind.

Nach der Festlegung dieses Gates werden in weiteren Analysen alle Prozentwerte nur noch als Teile dieses Gates angegeben, alle anderen Zellen und Zellfragmente werden nicht in die Analyse aufgenommen.

Auf den dot plots gibt jeder Punkt ein „event“ wieder. Im Idealfall korreliert ein „event“ auch mit „einer Zelle“. Leider unterscheidet das FACS nicht zwischen Zelle und Zelltrümmern, sondern zählt alle Partikel die im voreingestellten Größenbereich liegen. Markiert man das „Lymphozytengate“ (hier P1), schließt man damit gezielt nur den Teil der „events“ ein, in dem sich die T-Zellen normaler Größe und Granularität finden (und exkludiert damit die meisten Trümmer).

Innerhalb des Lymphozytengates wiederum sind aber nicht alle events CD3(+). Betrachtet man nun die Proliferation CD3(+) Zellen, so wird ihr Wert besonders hoch ausfallen, wenn man ihn ins Verhältnis zu den CD3(+) Zellen setzt, jedoch deutlich geringer, wenn man ihn auf „P1“ oder gar „alle events“ bezieht.

Wenn es nicht anders erwähnt wird, geben die aufgeführten Proliferationsdaten die Proliferation der CD4(+) Zellen bezogen auf alle CD4(+) Zellen an.

5. Ergebnisse

Ziel unserer Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der eine allergenspezifische Proliferation humaner T-Zellen von Allergikern *in vitro* erreicht und in Folge mittels Hitze-inaktivierter Listerien und listerienspezifischem Flagellin wieder supprimiert werden kann. Diese Suppression wird unserer Hypothese nach durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen vermittelt. Daher erwarteten wir nach erfolgreicher Suppression vermehrt Treg messen zu können.

Im Rahmen der Etablierung experimentierten wir mit zahlreichen Varianten der Methode. So wechselten wir unter anderem das Allergenextrakt, die Konzentration des Allergens, das Zellmedium und die Inkubationsdauer. Auch in der durchflusszytometrischen Analyse legten wir unser Augenmerk jeweils auf unterschiedliche Marker der Zellen. Unsere Versuche sind daher sehr heterogen, und eine Darstellung aller durchgeführten Versuche wäre zu umfangreich.

In diesem Teil der Arbeit werden nun die Ergebnisse exemplarischer Versuche dargelegt.

Zuerst wird dabei auf die Unterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern in Bezug auf eine allergenspezifische T-Zell-Proliferation eingegangen.

Danach wird gezeigt, dass sich diese durch Allergen verursachte Proliferation durch gleichzeitige Gabe mit HKL, und im Weiteren auch durch Flagellin wieder supprimieren lässt.

Im Anschluss wird eine genaue Charakterisierung der T-Zellen in den jeweiligen Kulturen erfolgen.

5.1. Nachweis der Lieschgrasspezifität der Proliferation

Für die allergenspezifische Proliferation der T-Zellen verwendeten wir, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, PBMC aus Blut von lieschgrasallergischen Probanden und Lieschgrasallergen-Extrakte.

Anfangs verwendeten wir eine Pricktest-Lösung der Firma ALK-Scherax. Wir wechselten dann auf ein speziell für T-Zell-Kulturen entwickeltes Lieschgras-Allergenextrakt der Firma Allergopharma. Dieses enthält alle bekannten Allergene des *Phleum pratense*. Es wurde uns freundlicherweise von Professor Fiebig, Allergopharma, zur Verfügung gestellt. Mit beiden Allergenextrakten erzielten wir zuverlässig T-Zell-Proliferationen bei Allergikern.

Die Lieschgrasspezifität der T-Zellproliferation in unserem Modell kann am besten an einem beispielhaften Versuch demonstriert werden. Hierbei wurde die Proliferation eines Allergikers mit der eines Nichtallergikers verglichen.

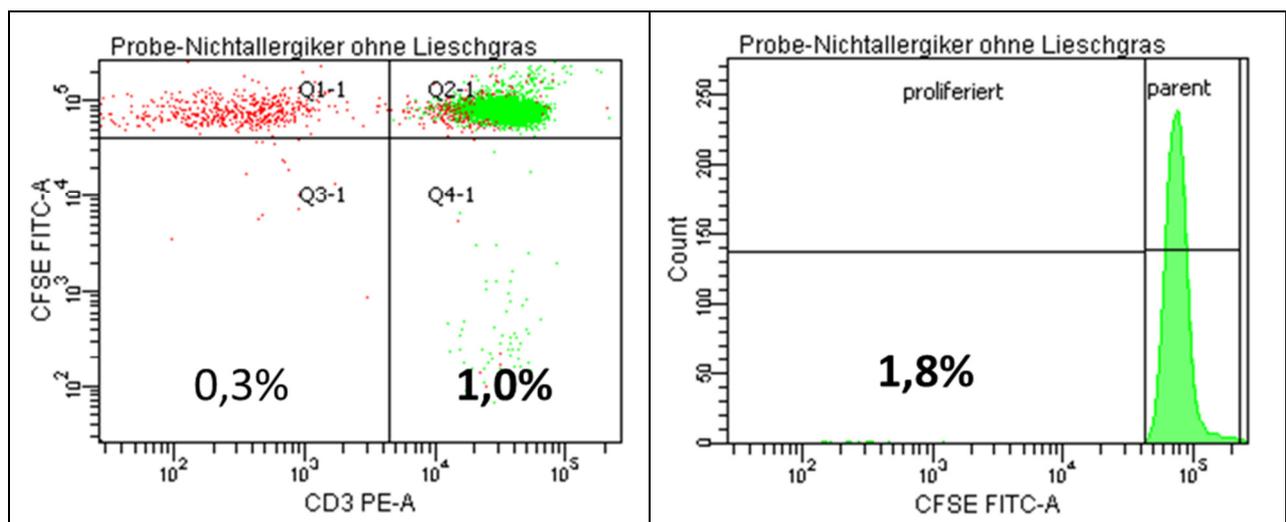
Die Zellkulturen aus PBMC der Probanden wurden gemäß Kapitel 4 angelegt und inkubiert. Eine Schale der Multischalenplatten enthielt zum Ausgangszeitpunkt 2×10^6 Zellen in 2 ml Zellmedium.

Gezeigt werden Daten, die nach acht Tagen Inkubation gemessen wurden.

Hierzu sollte zuerst die Reaktion der Zellkulturen eines Nichtallergikers betrachtet werden, die nicht mit Allergen oder HKL inkubiert wurde.

Wie im Kapitel 4.2.10 beschrieben, wurden zuerst die CD3(+)CD4(+) Zellen identifiziert. Sie werden in den folgenden Diagrammen grün dargestellt.

Abbildung 5.1: T-Zell-Proliferation des Nichtallergikers ohne Allergen



Im linken dot plot ist die Intensivität der CFSE-Färbung auf der Y-Achse aufgetragen. Die X-Achse gibt die Expression von CD3 wieder. Daher stellt die hoch-positive Population in Quadrant Q2-1 die parentale Zellgeneration der T-Zellen dar, Quadrant Q4-1 enthält proliferierte T-Zellen.

Die rechte Abbildung stellt die CD3(+)CD4(+) Zellen im Histogramm dar. Die scheinbar abweichenden Prozentangaben (1,0% und 1,8%) sind im Wesentlichen durch die Art der Darstellung bedingt, mit Bezug auf die jeweils hierarchisch übergeordnete Population. Im dot plot beziehen sich die 1,0% auf das gesamte Lymphozytengate. Im

Histogramm bezieht sich die Angabe von 1,8% auf die dargestellte Population der CD3(+)CD4(+) Zellen (ein Histogramm bezieht sich auf sich selbst).

Aus beiden Darstellungen lässt sich entnehmen, daß es in der PBMC-Kultur eines Nichtallergikers ohne Zusätze in Form von Allergen nach 8 Tagen zu keiner wesentlichen T-Zellproliferation kommt.

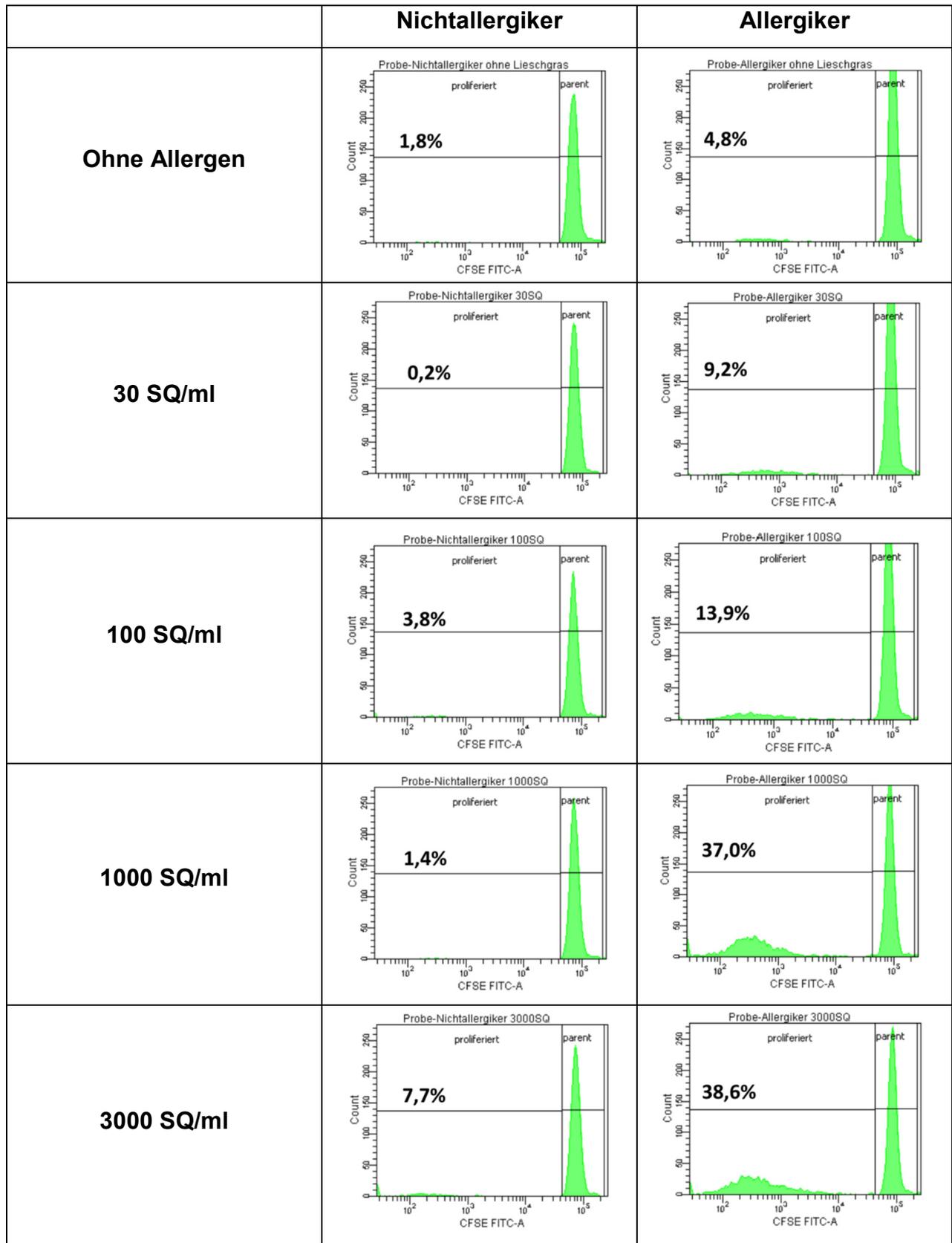
In der Abbildung 5.2 „Nachweis der Allergenspezifität der Proliferation“ wird die Reaktion eines Allergikers aus dem gleichen Versuch der des Nichtallergikers gegenübergestellt.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Histogrammen. Gezeigt werden erneut die CD3(+)CD4(+) Zellen in der CFSE-Färbung.

Den Histogrammen lässt sich entnehmen, dass beim Allergiker eine zunehmende Proliferation der T-Zellen mit steigender Allergendosis zu beobachten ist.

Man sieht auch, dass es mit der Höchstdosis der Pricktest-Lösung auch beim Nichtallergiker zu einer geringen Proliferation (maximal 7,7% bei 3000 SQ/ml) kam. Die Proliferation war jedoch beim Nichtallergiker jedoch nicht dosisspezifisch und blieb deutlich hinter der zurück, die wir bei dem Allergiker sahen (38,6% bei 3000 SQ/ml).

Abbildung 5.2: Nachweis der Allergenspezifität der Proliferation

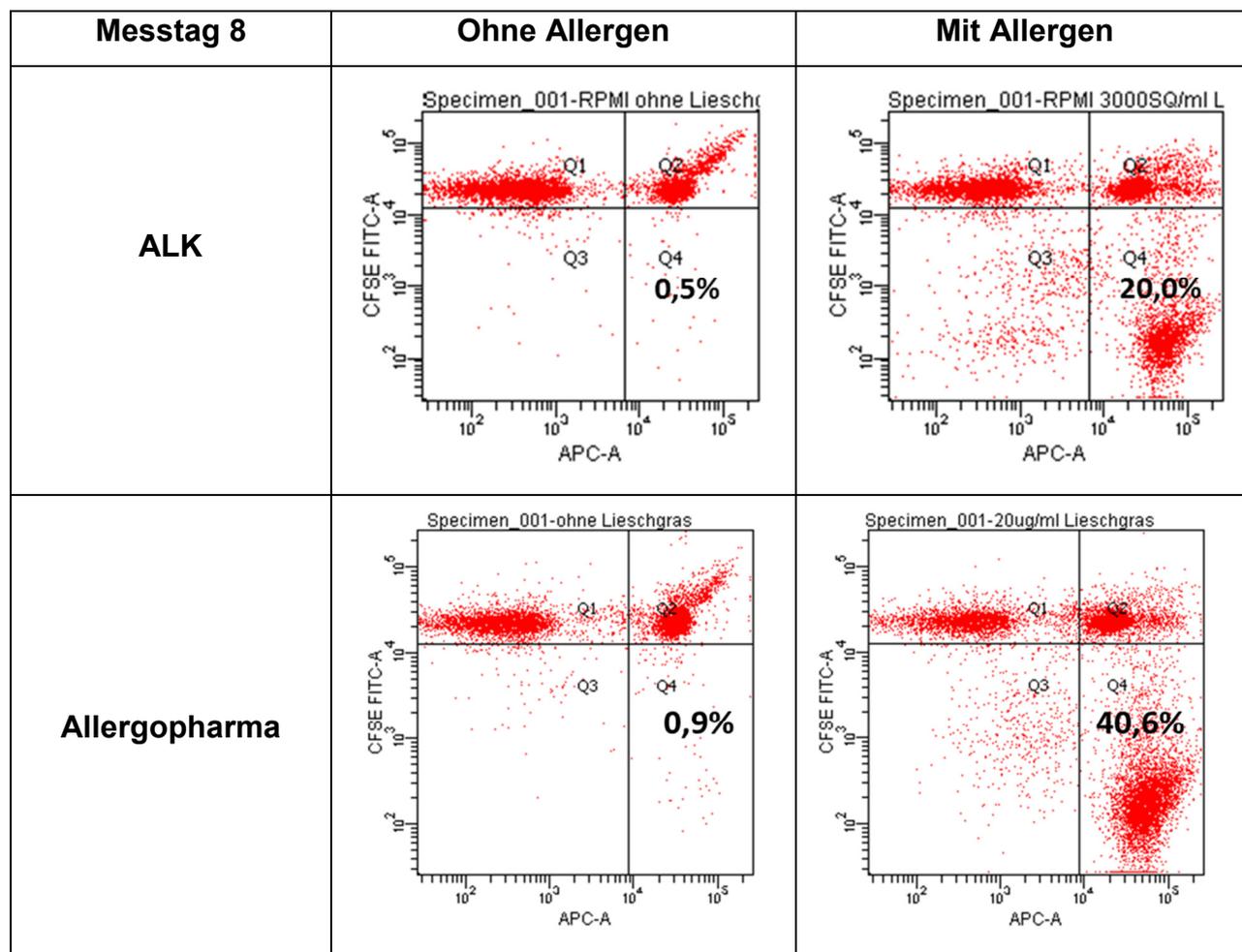


5.2. Vergleich der Allergenextrakte

In einem weiteren Versuch verglichen wir das ALK-Scherax-Allergenextrakt für Prickteste mit einem für T-Zellstimulationsversuche hergestellten Lieschgrasallergenextrakt der Firma Allergopharma.

Beide Kulturen waren zeitgleich mit PBMC der gleichen Blutentnahme angelegt worden.

Abbildung 5.3: Vergleich der Allergenextrakte



Dabei ergab sich eine etwa doppelt so hohe maximale Proliferation durch das Allergopharma-Produkt in den von uns verwendeten Konzentrationen (20,0% gegenüber 40,6% bezogen auf das Lymphozytengate). Die Kulturen „ohne Allergen“ reagierten beide kaum (0,5% und 0,9% des Lymphozytengates). Wir gingen daher von einer größeren Potenz des Allergopharma-Produktes aus. Da wir für eine deutliche Darstellung unserer Ergebnisse hohe Raten der Proliferation anstrebten, entschieden wir uns im weiteren Verlauf für dieses Allergenextrakt. Prinzipiell erzielten wir jedoch mit beiden Produkten gute proliferative Ergebnisse.

5.3. Durchführung einer Zeitkinetik

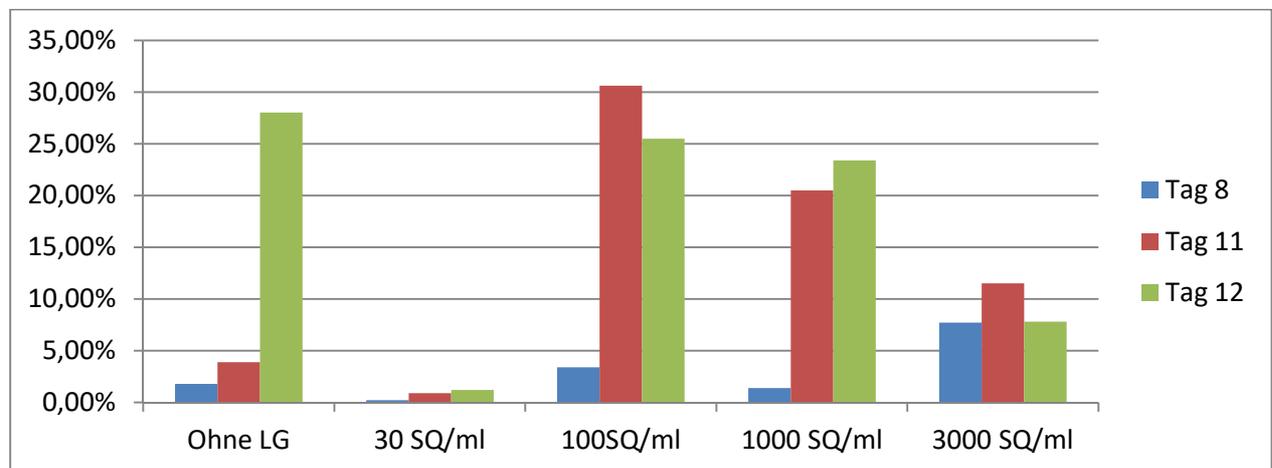
Wir untersuchten, nach wie vielen Inkubationstagen mit Allergenextrakt der geeignete Zeitpunkt für eine Analyse der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie ist.

Vor der Analyse erfolgten regelmäßige makroskopische und mikroskopische Beobachtungen der Zellkulturen. Das für das Zellmedium verwendete RPMI-1640 enthält den Farbindikator Phenolrot. Bei einem Abfall des pH-Wertes in den Zellkulturen, erfolgt ein Farbumschlag von Rot (pH 7,4) über Orange nach Gelb (pH 6,5). Insbesondere in Kulturen mit reger Proliferation beobachteten wir regelmäßig ein Ablassen des Farbstoffes und eine Farbänderung ins Blassorange. Eine Gelbfärbung beobachteten wir bis zum zwölften Tag nicht.

Bisher wurden Daten aus einer Analyse nach acht Tagen der Inkubation gezeigt. In mehreren Versuchen experimentierten wir mit dem optimalen Zeitraum der Messtage. Einige Kulturen hatten wir erst nach 11 und 12 Tagen analysiert, andere schon nach 6 Tagen.

Zuerst wird wieder eine Kultur eines Nichtallergikers gezeigt:

Abbildung 5.4: Proliferation eines Nichtallergikers im zeitlichen Verlauf



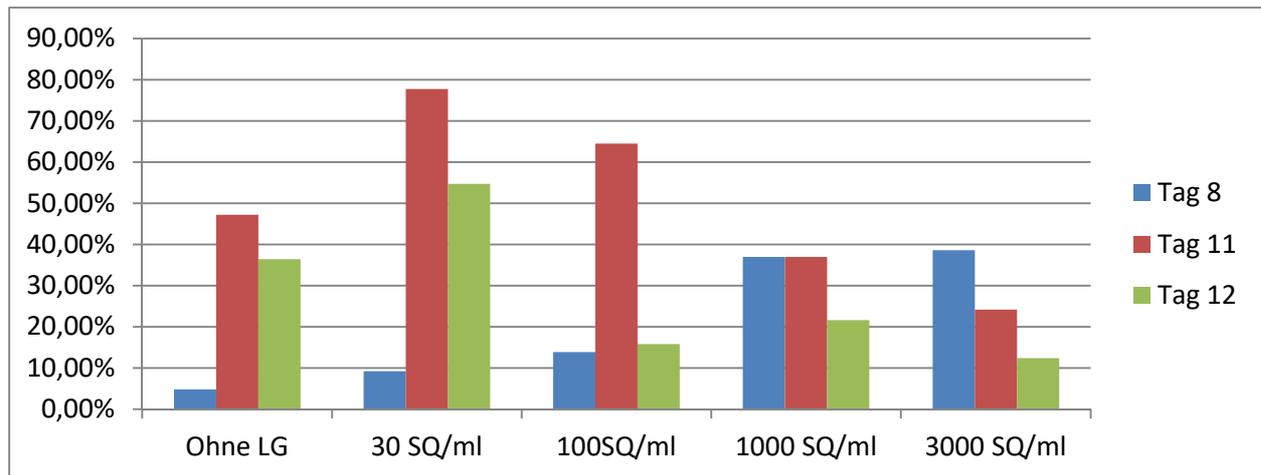
Das Säulendiagramm stellt die Proliferationsergebnisse der CD3(+)CD4(+) Zellen in Bezug zu allen CD3(+)CD4(+) Zellen dar. Auf der horizontalen Achse sind die unterschiedlichen Schalen des Experiments wiedergegeben. Die Messtage 8, 11 und 12 sind durch unterschiedliche Farben dargestellt.

Man sieht, daß es in diesem Versuch nach elf Tagen (rote Säulen) in fast allen Schalen zu einer unspezifischen Proliferation kam, jedoch nicht in einer Dosisabhängigkeit zum

Lieschgrasallergenextrakt (stärkste Proliferation nach 12 Tagen in der Kultur „ohne Lieschgras“).

Analog zeigt das folgende Diagramm die Proliferationsergebnisse des Allergikers aus dem gleichen Versuch.

Abbildung 5.5: Proliferation eines Allergikers im zeitlichen Verlauf



War an Tag 8 (blaue Säulen) die Proliferation noch dosisspezifisch, so scheint dieser Effekt bei Tag 11 umgekehrt.

Dabei sollte man jedoch beachten: In den Schalen mit der höchsten Allergenkonzentration war in diesem Versuch an Tag 8 bereits eine ausgesprochen starke Proliferation aufgetreten (38,6% der CD3(+)CD4(+) Zellen). Die Proliferation in den Schalen mit verminderter Allergenkonzentration läuft nun gleichsam der Proliferation in den Schalen mit der höheren Konzentration hinterher. Wenn also bei hoher Allergenkonzentration bereits an Tag 8 eine hohe Proliferation erreicht wurde, so kommt sie im Weiteren zum Stillstand, wohingegen sie in Kulturen mit geringerer Proliferationsgeschwindigkeit noch über längere Zeit voranschreitet. Dementsprechend ist die Proliferation in diesem Versuch an Tag 12 auch geringer als an Tag 11.

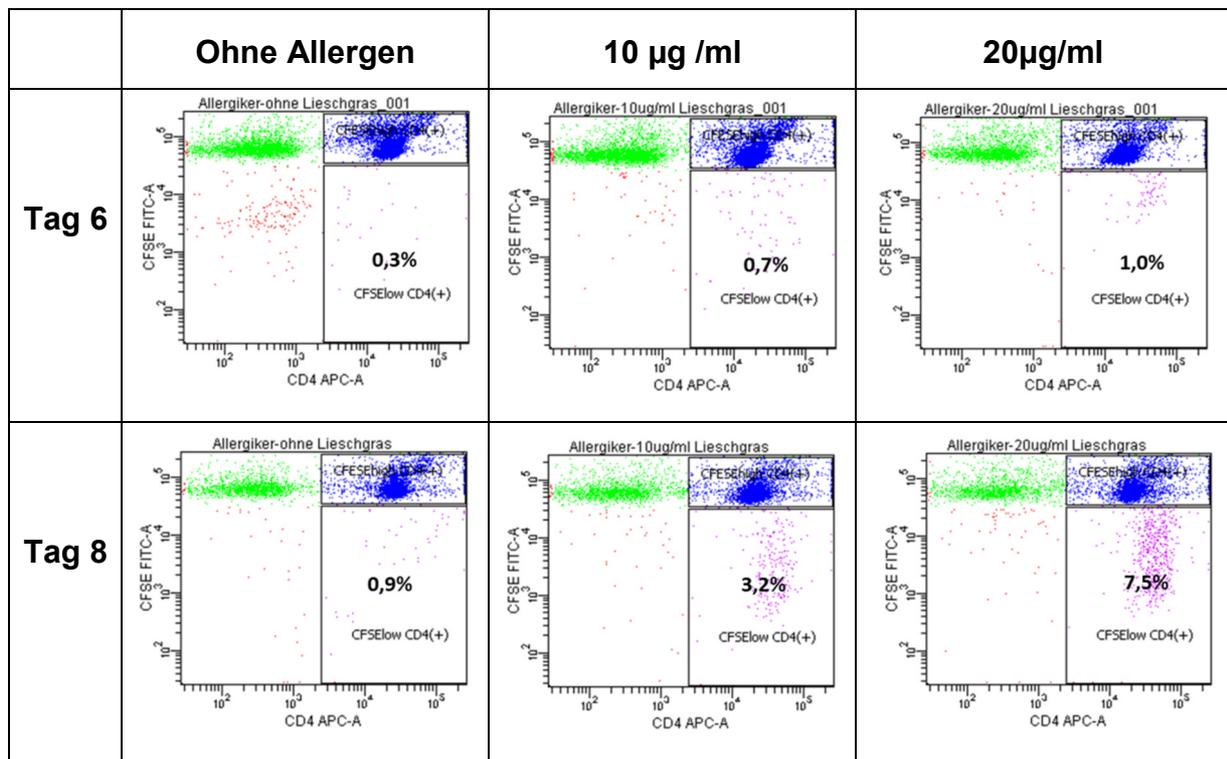
Es gab auch Versuche, an denen an Tag 11 gute Messergebnisse erzielt werden konnten, wenn das Ausmaß der Proliferation an Tag 8 quantitativ geringer ausfiel.

Nachdem wir gesehen hatten, daß mit zunehmender Dauer auch die Artefakte zunahmen, gingen wir der Frage nach, ob wir durch eine weitere Reduktion der Stimulationszeit noch klarere Ergebnisse erzielen können.

Es folgen Ergebnisse eines Versuches, an denen Tag 6 und Tag 8 verglichen wurden.

Die Abbildung 5.6 vergleicht die Proliferation der CD4(+) Zellen in Form von dot plots.

Abbildung 5.6: Gegenüberstellung der Proliferation an Tag 6 und Tag 8



Die Prozentangaben beziehen sich auf die im Lymphozytengate enthaltenen Zellen. Als Allergen kam das Allergopharmaprodukt zum Einsatz.

Man erkennt, daß die Proliferation an Tag 6 noch sehr gering ausfällt. Der Zusammenhang zur Allergenkonzentration ist aber bereits vorhanden.

Anhand der beiden gezeigten Versuche wird auch die Variabilität des Ausmaßes der Proliferation von Versuch zu Versuch sichtbar. Im ersten Versuch sahen wir an Tag 8 eine Proliferation von maximal 38,6% der CD3(+)CD4(+) Zellen. Dies überstieg die Proliferation des danach gezeigten Versuches an Tag 8 deutlich (7,5% des Lymphozytengates, entsprechend 12,9% der CD4(+) Zellen).

In der Regel begann die Proliferation ab dem sechsten Tag, und erreichte ein Maximum zwischen dem achten und elften Tag.

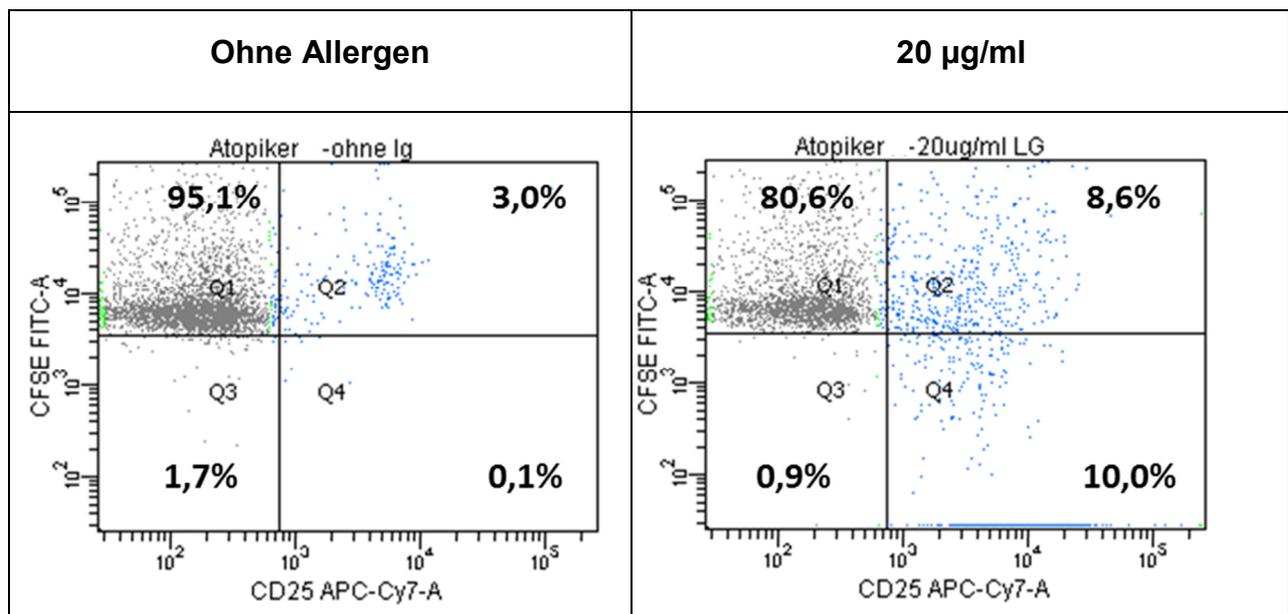
5.4. Expression von CD25 im Rahmen der Proliferation

In den meisten Versuchen haben wir die Proliferation mittels CFSE verfolgt und die Expression von CD25 gemessen. CD25 ist der älteste bekannte Marker für Treg, und war daher von großem Interesse. Wir sehen jedoch, daß proliferierende Zellen zum größten Teil CD25 exprimieren.

Das stellt in Frage, inwieweit sich CD25 in unserem Modell als Treg-Marker eignet.

Die Abbildung 5.7 veranschaulicht diese Beobachtung exemplarisch:

Abbildung 5.7: CD25 und beginnende Proliferation an Tag 6



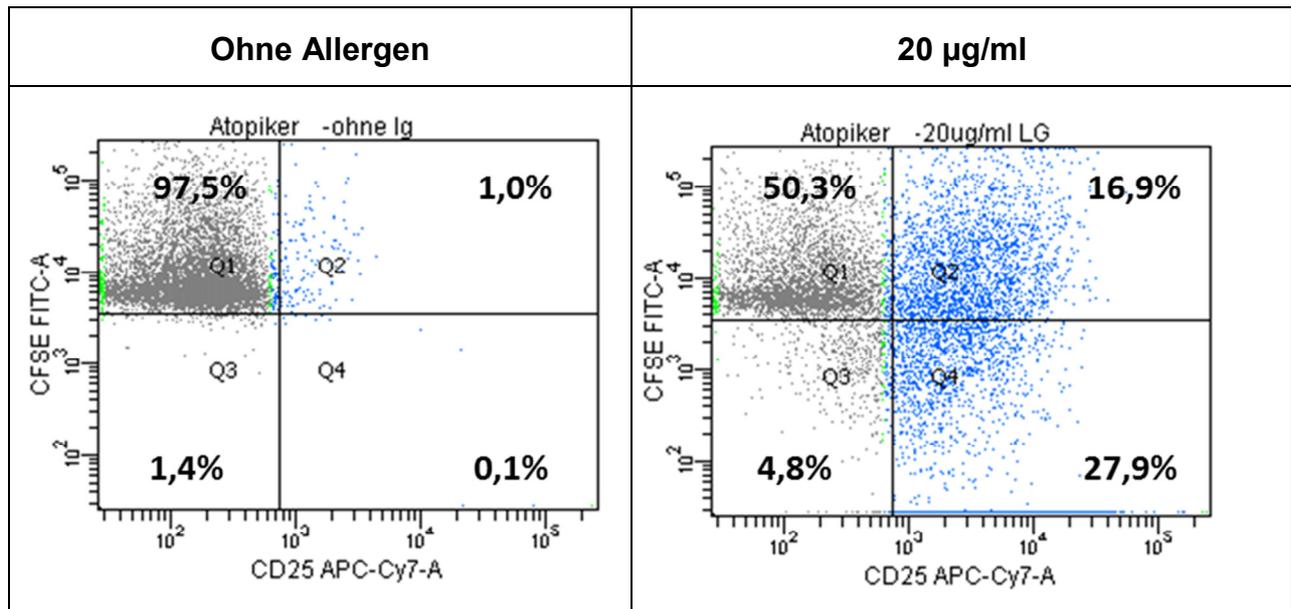
Gezeigt werden zwei dot plots von PBMC eines Allergikers nach sechs Tagen Inkubation. Links sieht man eine unstimulierte Kultur und rechts eine Kultur nach Stimulation mit 20 µg/ml Lieschgras-Allergen.

Wohingegen auch ohne Stimulation ein gewisser Teil der Lymphozyten CD25 exprimiert, nimmt der Anteil nach Stimulation mit Allergen beim Allergiker zu. Die proliferierten Zellen entwickeln sich ausschließlich aus der CD25(+) Population (Quadrant Q4).

Nach zwei weiteren Tagen der Inkubation (*Abbildung 5.8*) erkennt man, daß im Verlauf der Reaktion ein geringer Anteil der proliferierten Zellen auch negativ für CD25 ist (Quadrant Q3). Diese Zellen waren 2 Tage zuvor in diesem Maße noch nicht nachweisbar.

Insgesamt bemerken wir jedoch eine klare Abhängigkeit der CD25-Expression von der Proliferation.

Abbildung 5.8: CD25 und beginnende Proliferation an Tag 8



5.5. Suppression durch HKL

Bisher wurde gezeigt, daß es mit unserem Modell möglich ist, *in vitro* eine allergenspezifische T-Zell-Proliferation zu bewirken.

In unserer Hypothese gingen wir davon aus, daß sich mit Hilfe der Zugabe von HKL zu unseren Kulturen diese allergenspezifische Proliferation wiederum supprimieren lässt.

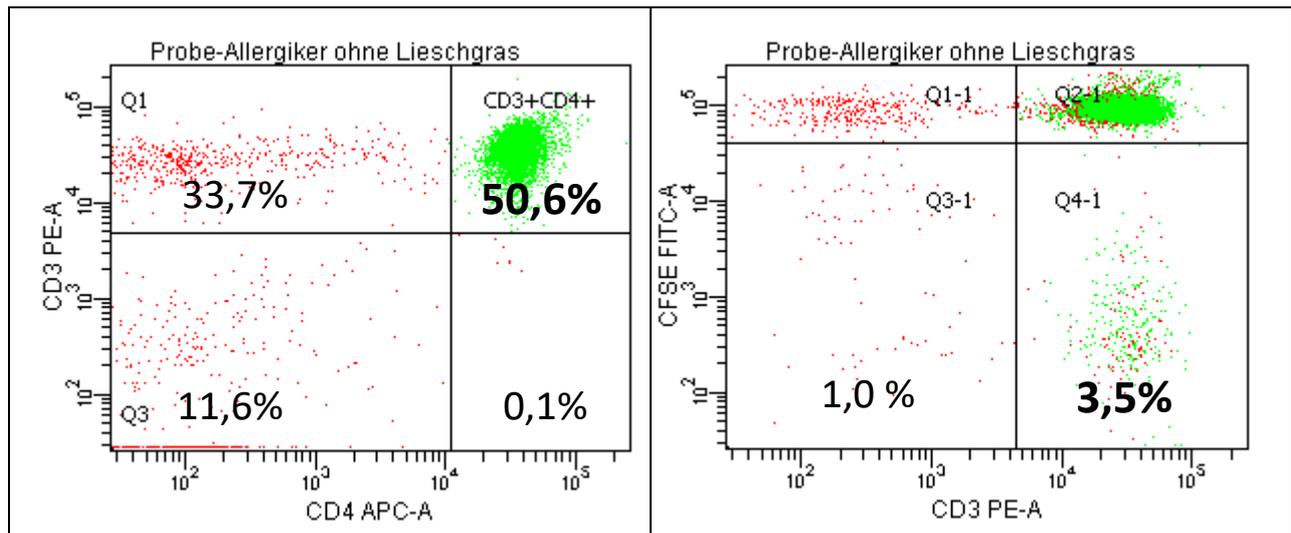
Die Ergebnisse sollen anhand eines beispielhaften Versuches demonstriert werden.

In diesem Versuch stimulierten wir die Kultur eines Allergikers mit aufsteigenden Konzentrationen Lieschgrasallergenextrakt (30 SQ/ml bis 3000 SQ/ml). Eine Kultur enthielt unstimulierte Zellen (ohne Allergen oder HKL). Die Schalen mit Lieschgrasallergenextrakt wurden jeweils ohne HKL und mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an HKL (10^3 , 10^5 und 10^7 HKL/ml) inkubiert. Zur Kontrolle führten wir eine Schale ohne Allergen und HKL („ohne LG“).

Zuerst (Abbildung 5.9) wird die Kultur eines Allergikers ohne Allergen nach acht Tagen gezeigt. Die CD3(+)CD4(+) Zellen sind grün dargestellt.

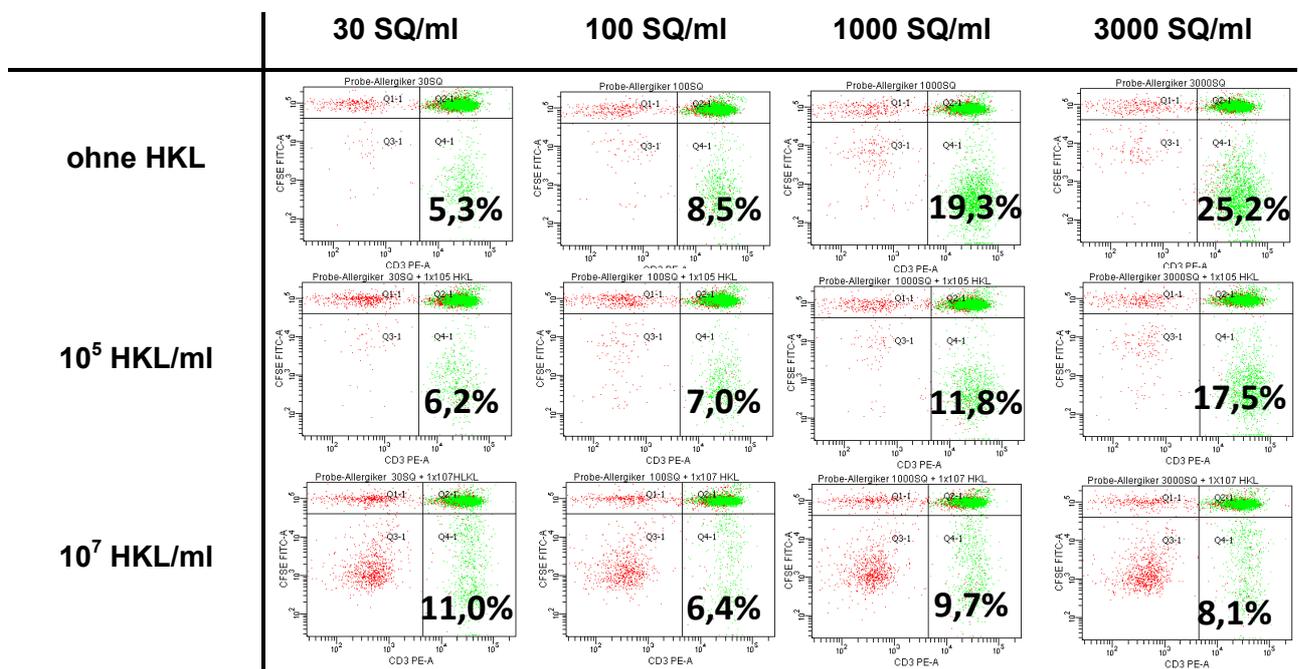
Im linken dot plot sind die Zellen des Lymphozytengates dargestellt. Man erkennt, daß 50,6% der enthaltenen Zellen CD3 und CD4 exprimieren. Ohne Stimulation kam es zu einer Proliferation von 3,5% der CD3(+) Zellen des Lymphozytengates (entsprechend 4,8% der CD3(+)CD4(+) Zellen).

Abbildung 5.9: Proliferation CD3(+)/CD4(+) Zellen ohne Lieschgras-Allergen und HKL



Die Abbildung 5.10 gibt eine Auswahl der Kulturen des Versuches wieder. Dargestellt sind dot plots, die die Proliferation in Kulturen mit aufsteigender Allergenkonzentration und folgender Suppression durch 10⁵ und 10⁷ HKL/ml zeigen.

Abbildung 5.10: Suppression der lieschgrasspezifischen Proliferation durch HKL



Die Angaben beziehen den Anteil der CD3(+) Zellen auf die Zellen des Lymphozytengates. Bei der niedrigsten Allergen-Konzentration von 30 SQ/ml sieht man eine Verstärkung der Proliferation durch HKL. Ab 100 SQ/ml zeigte sich jedoch eine Suppression der Proliferation.

Der Darstellung lässt sich auch entnehmen, daß es zu einer dosisabhängigen T-Zell-Proliferation durch die Gabe von Lieschgrasallergenextrakt kam. Diese konnte im höheren Allergendosisbereich (1000 und 3000 SQ/ml) wiederum durch HKL weitgehend dosisabhängig supprimiert werden.

Im niedrigen Allergendosisbereich waren diese Effekte nicht zu beobachten.

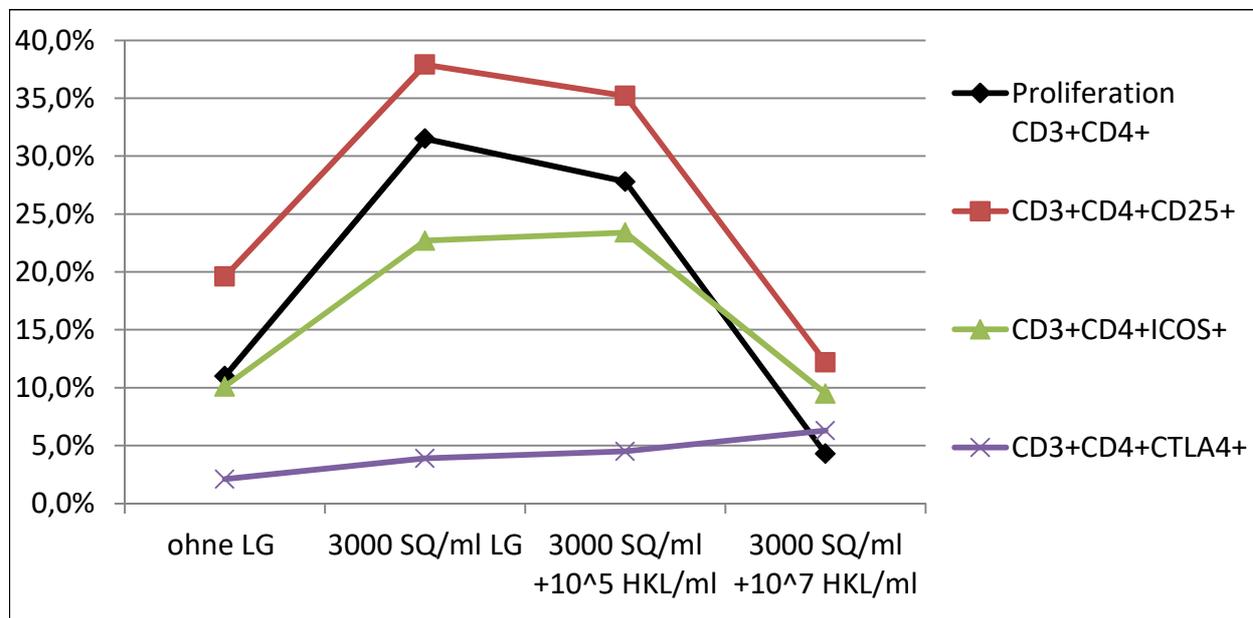
Durch mehrfache Versuche bestätigte sich, daß mit nur 30 SQ/ml Allergen keine sichere Proliferation bewirkt werden kann. In unserem Modell ist damit eine ausreichende Allergenkonzentration für eine klare Immunantwort erforderlich. Wir verwendeten in den weiteren Versuchen mit der Pricktestlösung nur noch Konzentrationen von 3000 SQ/ml.

Die Suppression betreffend sahen wir einen entsprechenden Effekt, und verwendeten später nur noch 10^7 HKL/ml.

5.5.1. Expression von CTLA-4 und ICOS

Im Folgenden sollen die Expression der Oberflächenmoleküle ICOS und CTLA-4 in unseren Versuchen gezeigt werden.

Abbildung 5.11: ICOS- und CTLA-4-Expression



Die Abbildung 5.11 zeigt die Expression im Zusammenhang mit der Proliferation.

Man sieht abermals, daß die Proliferation mit Hilfe der HKL konzentrationsabhängig supprimiert werden konnte (schwarz dargestellt). Die Expression von CD25 korreliert ungefähr mit der Proliferation (rote Darstellung).

Die Expression von ICOS (grün dargestellt) innerhalb der CD3(+)CD4(+) Zellen wird durch die Stimulation mit Lieschgrasallergen erhöht. Durch Gabe von 10^5 HKL/ml nimmt trotz geringer Suppression der Proliferation die ICOS-Expression noch weiter zu, um bei maximaler Suppression durch 10^7 HKL/ml (9,5 %) wieder leicht unter das Niveau unstimulierter Zellen (10,1%) zu sinken.

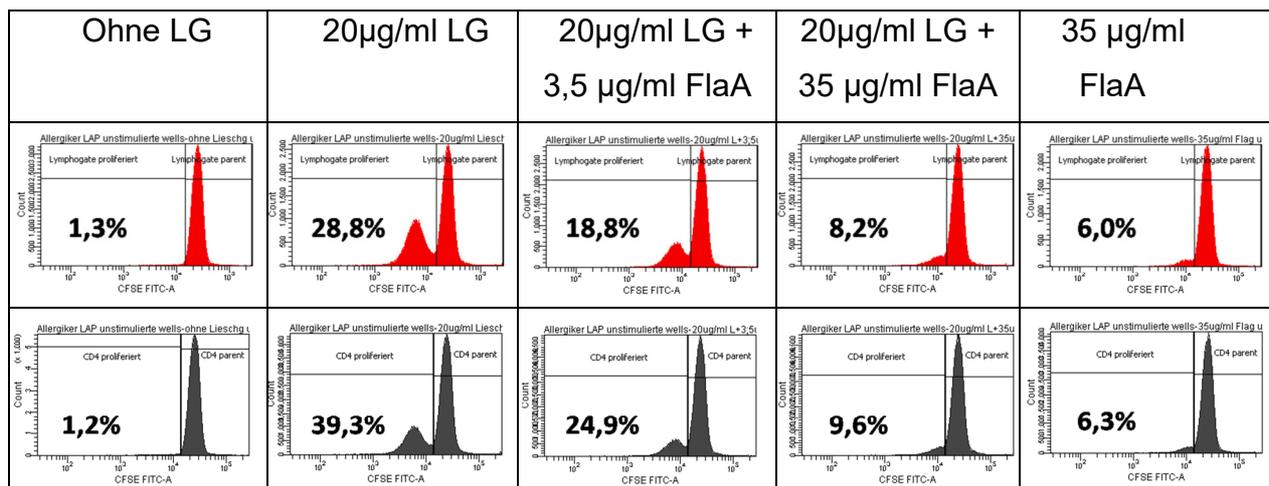
Die Expression von CTLA-4 innerhalb der CD3(+)CD4(+) Zellen verläuft entgegen dem Trend der anderen Kurven weitgehend linear. Sie nimmt mit dem Ausmaß der Stimulation leicht zu, und erreicht ihren höchsten Wert bei maximaler Suppression der allergenspezifischen Proliferation.

5.6. Suppression durch Flagellin

Da wir vermuten, daß Flagellin ein Schlüsselprotein der Listerien bei der Vermittlung von Immuntoleranz ist, führten wir Versuche mit rekombinant hergestelltem Flagellin anstelle der HKL durch. Auch hiermit lässt sich eine Suppression der allergenspezifischen Proliferation erreichen.

Gezeigt werden erneut exemplarisch Daten zur Proliferation und Suppression in Form von Histogrammen. Dabei gibt die horizontale Achse die Intensität der CFSE-Färbung und die vertikale Achse die Anzahl der gezählten events wieder.

Abbildung 5.12: Suppression durch Flagellin (Tag 9)



Die obere Reihe mit den roten Histogrammen gibt die Rate der Proliferation der Zellen im Lymphogate wieder. Zur Vervollständigung zeigt die untere Reihe die Werte der Proliferation der CD4(+) Zellen.

Ohne Allergen betrug die unspezifische Proliferation lediglich 1,2% der CD4(+) Zellen. Durch 20 µg/ml Lieschgrasallergenextrakt steigerte sich die Proliferation auf 39,9%. Diese Proliferation fiel in den Kulturen, die gleichzeitig Flagellin erhalten hatten, geringer aus. Die Suppression war in diesem Falle dosisspezifisch.

Damit kann gezeigt werden, daß die allergenspezifische Proliferation auch mittels HKL-spezifischem Flagellin supprimiert werden kann.

5.7. Messung des Transkriptionsfaktors FoxP3

5.7.1. FoxP3-Expression nach Suppression mit HKL

Wie im einleitenden Kapitel beschrieben, werden in der Literatur Treg oft als CD3(+)CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Zellen beschrieben. Gemäß unserer Hypothese erwarteten wir durch die Gabe von HKL oder Flagellin nicht nur die lieschgrasspezifische Proliferation supprimieren zu können, sondern auch in diesen Kulturen vermehrt Treg vorzufinden.

Die von uns gemessenen Daten zur FoxP3-Expression waren jedoch sehr heterogen.

Die Abbildung 5.13 zeigt die Ergebnisse aus einem beispielhaften Versuch:

Schwarz dargestellt ist die Proliferation der CD3(+)CD4(+) Zellen in Prozent bezogen auf alle CD3(+)CD4(+) Zellen. Farblich dargestellt ist der Anteil der jeweils bezeichneten Zellpopulation in Prozent, wiederum bezogen auf alle CD3(+)CD4(+) Zellen.

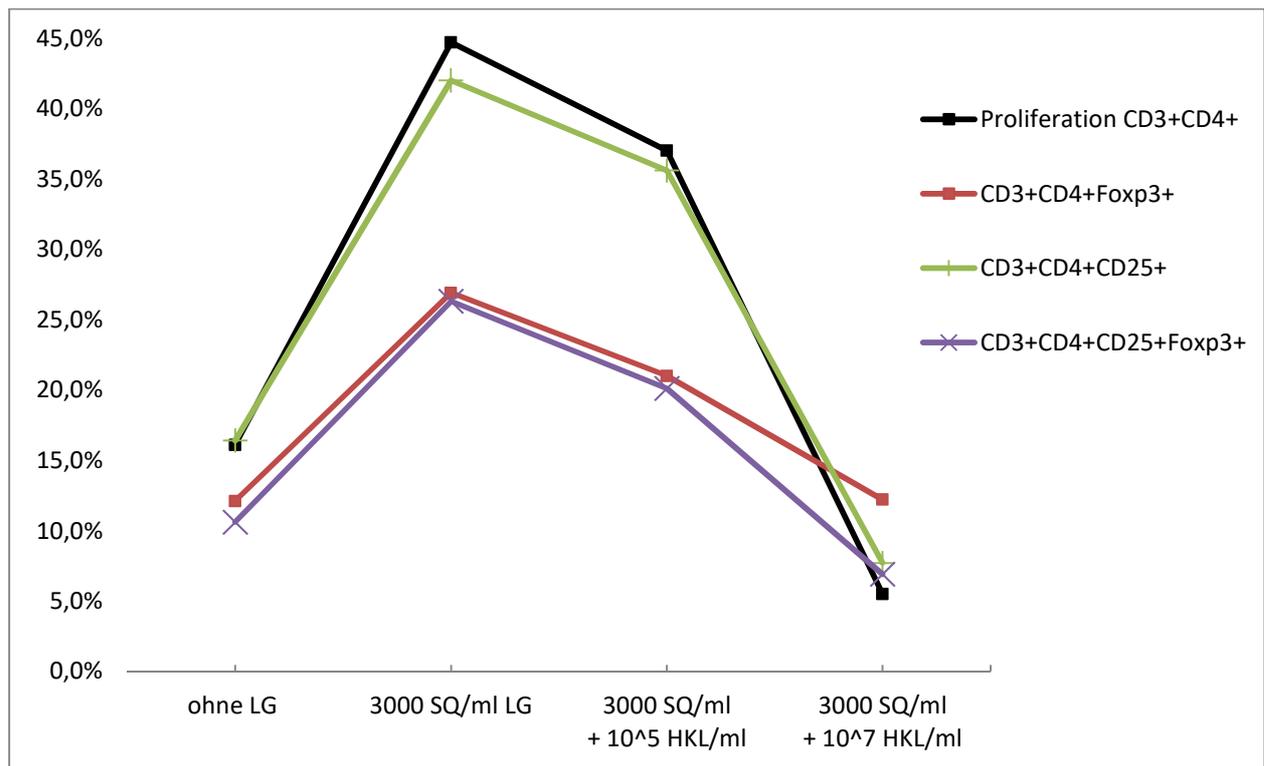
Auf der horizontalen Achse sind die unterschiedlichen Zellkulturen aufgetragen.

Man erkennt, daß in diesem Versuch die Proliferation durch Allergen (3000 SQ/ml Lieschgras) geglückt ist, und sie konzentrationsabhängig durch HKL supprimiert werden konnte.

Man sieht weiterhin, daß die Expression von CD25 und FoxP3 weitgehend korreliert. Damit findet sich der höchste Anteil an CD3(+)CD4(+)FoxP3(+) Zellen bei den ausschließlich mit Allergen stimulierten Zellen, und damit in der Kultur mit der höchsten Proliferation und der stärksten Expression von CD25.

Entgegen unserer Hypothese finden sich jedoch nicht vermehrt FoxP3-exprimierende Zellen in den Kulturen, die durch HKL supprimiert wurden.

Abbildung 5.13: Zusammenhang von FoxP3-Expression und Proliferation



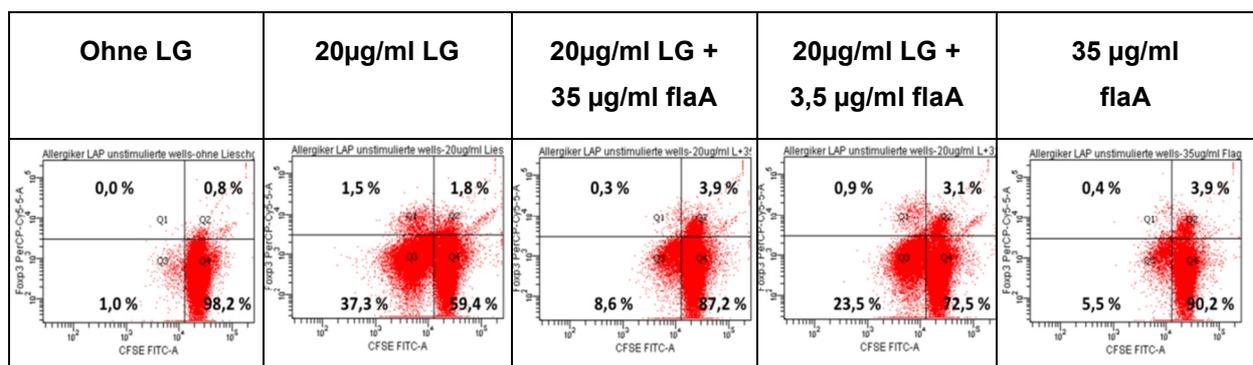
5.7.2. FoxP3-Expression nach Suppression mit Flagellin

Im Folgenden soll die FoxP3-Expression eines Versuches gezeigt werden, bei dem nicht HKL, sondern HKL-spezifisches Flagellin zur Suppression verwendet wurde.

Die Messung wurde an einem 9. Versuchstag nach Inkubation durchgeführt.

Die Darstellung erfolgt in drei Schritten.

Abbildung 5.14: FoxP3 und Proliferation / Flagellin



Man erkennt die durch Allergen bewirkte Proliferation und die dosisabhängige Suppression durch Flagellin. In den dot plots sind, gemäß der Funktionsweise der CFSE-Färbung, in den linken Quadranten die proliferierten und in den rechten Quadranten die unproliferierten Zellen (CFSE^{high}) zu finden.

Betrachtet man alle CD4(+) Zellen, kommt es durch die Stimulation mit Allergenen zu einer verstärkten FoxP3-Expression. Diese Vermehrung findet sich in den proliferierten als auch in den unproliferierten Zellen.

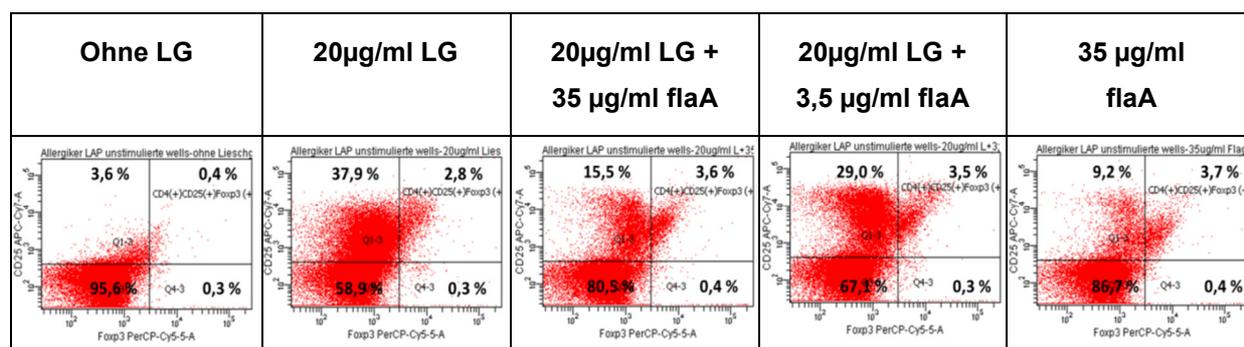
Auch durch die Zugabe von Flagellin kommt es zu einer vermehrten FoxP3-Expression. Bei maximaler Suppression der Proliferation (hier durch 35µg/ml flaA) steigt der Wert auf 3,9% + 0,4%= 4,3% an. Ohne Stimulation finden sich 0,8% FoxP3(+) Zellen. Verglichen jedoch mit der Kultur, in der sich die TH2-Immunantwort abspielt, also der allein mit Lieschgras stimulierten Kultur, fällt diese Steigerung nur gering aus (1,5% + 1,8%= 3,3%).

Im zuvor gezeigten Experiment mit HKL war in der allein mit Lieschgras stimulierten Kultur jedoch die ausgeprägteste FoxP3-Expression aufgefallen.

Insgesamt schien die FoxP3-Expression also mit der Proliferation zu korrelieren.

Im zweiten Schritt wird die FoxP3-Expression in Relation zur CD25-Expression gezeigt:

Abbildung 5.15: FoxP3- und CD25-Expression / Flagellin



Man kann erkennen, daß fast ausschließlich CD25(+) Zellen FoxP3 exprimieren. Durch Flagellin erhöht sich der Anteil FoxP3(+) Zellen auf ein relativ statisches Niveau (3,5% bis 3,7%), unabhängig davon, ob gleichzeitig mit Allergenen inkubiert wurde.

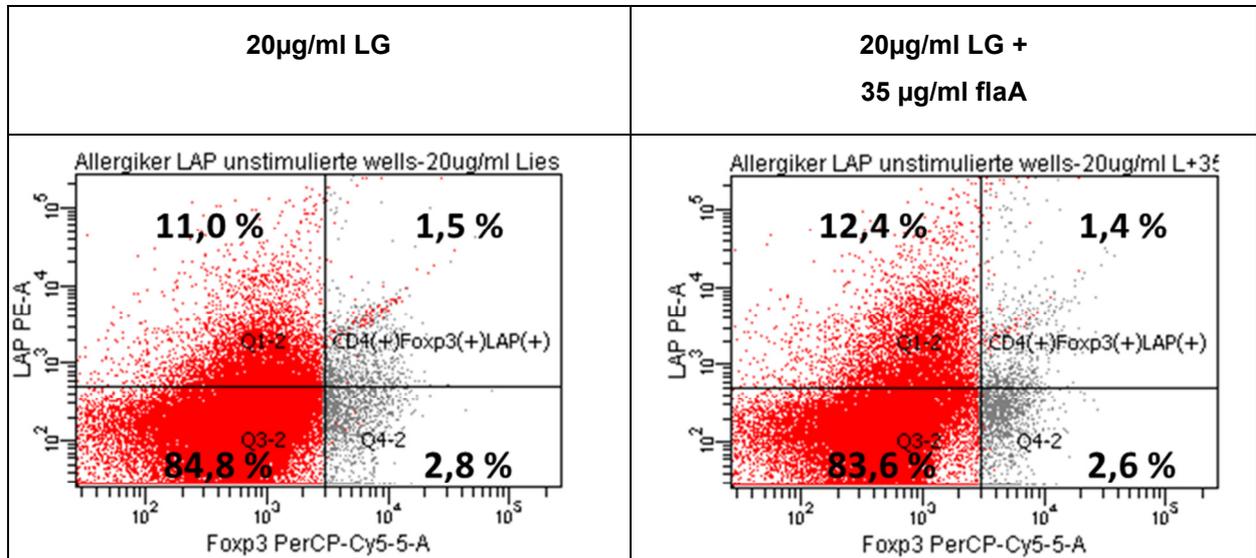
In der Kultur mit Allergenen allein bleibt die FoxP3-Expression etwas geringer (2,8%).

Betrachtet man jedoch die Gesamtpopulation der CD25(+) Zellen, so stehen die 2,8% einem sehr großen Pool von 37,9% CD25(+)/FoxP3(-) Zellen gegenüber.

Nach Zugabe von Flagellin und Lieschgras steigt dieses Verhältnis von FoxP3 (+) zu FoxP3(-) innerhalb der CD25(+) Zellen (3,6% gegenüber 15,5%). Dementsprechend sehen wir zwar nur eine geringe absolute Zunahme FoxP3(+) Zellen durch Flagellin, jedoch einen erhöhten Anteil FoxP3(+) Zellen innerhalb der CD25(+) Population.

Im dritten Schritt der Betrachtung werden die FoxP3- und LAP-Expression einer Kultur mit Allergenen einer Kultur mit Allergenen und Flagellin gegenüber gestellt.

Abbildung 5.16: FoxP3- und LAP-Expression / Flagellin



In unseren Messungen ist nur ein geringer Anteil der LAP(+) Zellen auch FoxP3(+).

Wenn wir also davon ausgehen, daß die TGF- β -produzierenden Zellen Treg sind, so ist überraschend, daß diese nicht vermehrt FoxP3 exprimieren.

In Kapitel 5.8.4 werden weitere Daten zur LAP-Expression gezeigt.

5.8. Zytokinmessungen

Nachdem wir den Einfluss der HKL und des Flagellins auf die allergeninduzierte Proliferation gemessen und die entstandenen T-Zellsubpopulationen mittels Oberflächenmarkern und FoxP3-Expression überprüft hatten, wollten wir Informationen über die sekretorischen Fähigkeiten der Zellen in unseren PBMC gewinnen.

Dazu stimulierten wir die Zellen zur Zytokinproduktion und analysierten die Zytokine IL4, IL10 und IFN- γ .

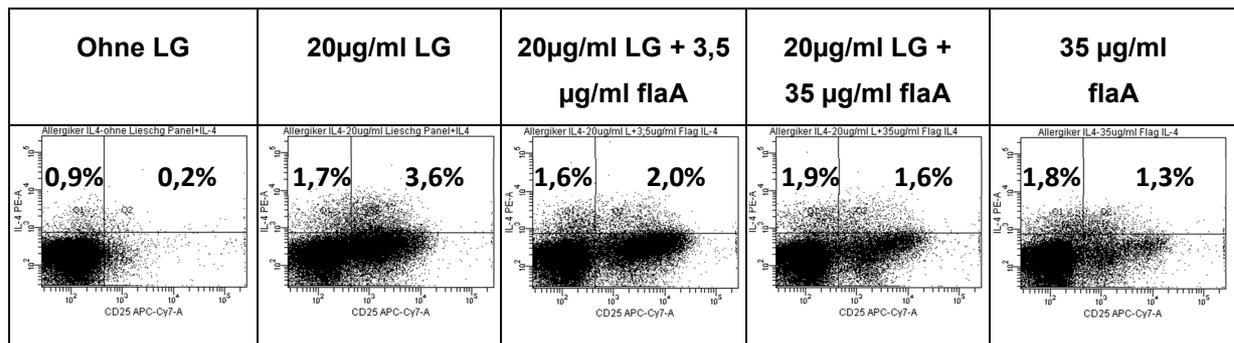
Zusätzlich wiesen wir TGF- β indirekt über den auf Zelloberflächen gebundenen Marker LAP nach. Der Vorteil ist, daß die Oberflächenfärbung keine Perforation der Zellen und keine vorherige Stimulation benötigt.

5.8.1. Interleukin-4

Interleukin-4 gilt, wie im einleitenden Kapitel beschrieben, als Schlüsselzytokin von TH2-Zellen. Entsprechend erwarteten wir das Zytokin vermehrt in den Kulturen mit Allergen, und nur noch vermindert nach Suppression durch Flagellin zu messen.

Die folgende Darstellung zeigt die Ergebnisse.

Abbildung 5.17: IL4-Produktion und CD25-Expression



Die dot plots geben auf der vertikalen Achse IL4 und auf der horizontalen Achse CD25 wieder. Gezeigt wird die Population der CD4(+) Zellen.

Entsprechend unserer Hypothese sieht man die intensivste IL4-Produktion in der Kultur mit dem Allergen (20 µg/ml LG).

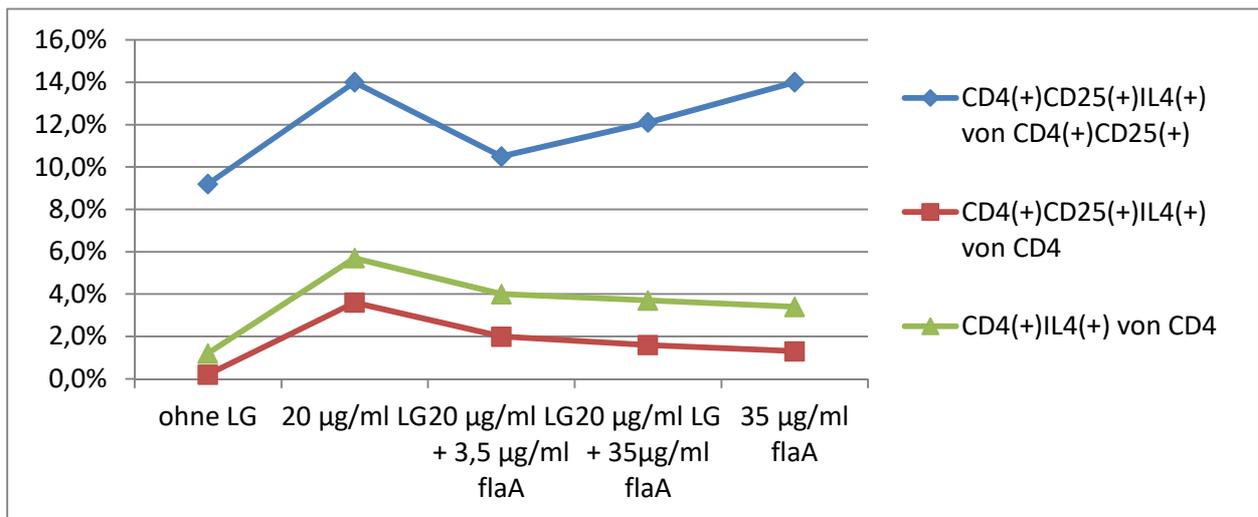
Es ist weiterhin erkennbar, daß die Expression von CD25 zur Produktion von IL4 nicht erforderlich ist, sondern auch CD25-negative Zellen das Zytokin bilden.

Durch Zugabe von Flagellin zum Allergenextrakt wird die Produktion von IL4 insgesamt supprimiert. Dabei zeigt sich ein Rückgang der IL4-Produktion innerhalb der CD25(+) Zellen. Interessant ist, daß die CD25(-) Zellen davon nicht betroffen sind.

Das folgende Diagramm 5.18 betrachtet die Subpopulationen genauer.

Es zeigt die IL4-Produktion der CD4(+) Zellen bezogen auf alle CD4(+) Zellen (grüne Linie), sowie die IL4-Produktion der CD4(+)CD25(+) Zellen einerseits bezogen auf die übergeordnete Population der CD4(+) Zellen (rote Linie), und andererseits bezogen auf sich selbst (blaue Linie).

Abbildung 5.18: IL4-positive Zellen



Die interessanteste Information findet man bei Betrachtung des grünen Graphen: Bezogen auf die CD4(+) Zellen sieht man eine dosisabhängige Suppression der IL4-Produktion.

Betrachtet man die IL4-Produktion der CD25(+) T-Zellen, so zeigt sich der gleiche Effekt, jedoch in quantitativ geringerem Ausmaß, da ja nicht alle CD4(+) Zellen auch CD25(+) sind (rote Linie).

Auch innerhalb der CD4(+)CD25(+) Zellen sieht man eine Suppression der IL4-Produktion, eine Dosisabhängigkeit lässt sich hier jedoch nicht mehr erkennen (blaue Linie).

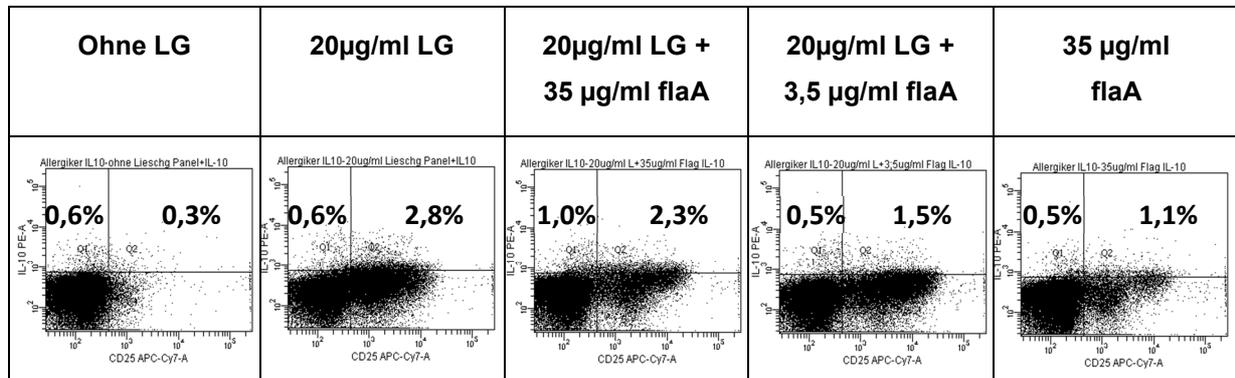
Interessanterweise war in den zuvor gezeigten dot plots (Abbildung 5.17) ein Rückgang der IL4-Expression gerade bei den CD25(+) Zellen erkennbar. Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich durch die sich verschiebenden Verhältnisse im Rahmen der Proliferation. Durch die Steigerung der Flagellinkonzentration kam es zu einer verstärkten Suppression der Proliferation, damit auch zu einer verminderten Expression von CD25. Die verbliebenen CD25(+)IL4(+) Zellen bilden damit einen vergrößerten Anteil der insgesamt kleineren CD25(+) Population.

Wichtig ist, daß sich in unserem Modell die IL4-Produktion in der T-Zell-Kultur eines Allergikers durch Lieschgrasallergen erhöht und durch Flagellin wieder supprimiert werden kann.

5.8.2. Interleukin 10

Interleukin 10 gilt als eines der Hauptzytokine von Treg. Es wird jedoch auch von Monozyten und TH2-Zellen gebildet. Es ist daher nur erschwert im Rahmen unserer Versuche zu interpretieren, da alle drei Zellreihen in unseren PBMC enthalten sind.

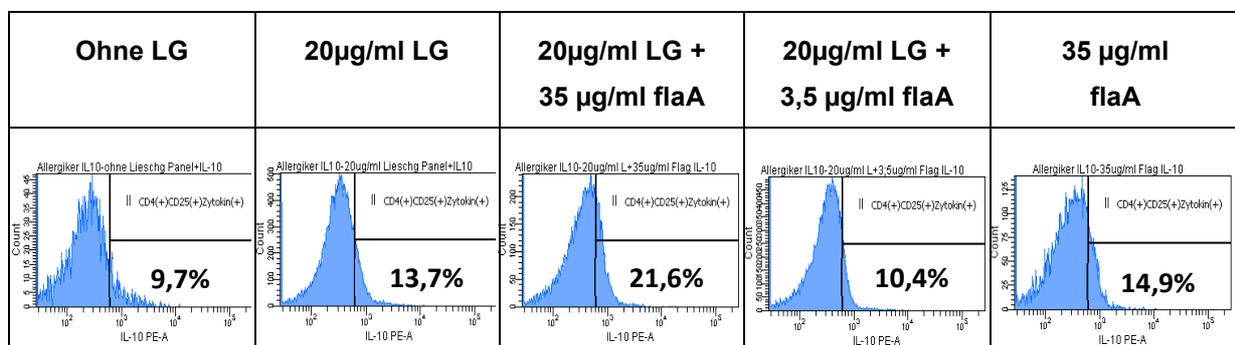
Abbildung 5.19: IL10-Produktion und CD25-Expression



Die dot plots geben auf der vertikalen Achse IL10 und auf der horizontalen Achse CD25 wieder. Gezeigt wird die Population der CD4(+) Zellen. Es ist erkennbar, daß die IL10-Produktion in der Kultur mit dem Allergen (20µg/ml LG) insgesamt am stärksten zunimmt (0,6% + 2,8%). Durch weitere Zugabe der höheren Dosis Flagellin steigt in diesem Versuch der Anteil IL10-produzierender Zellen innerhalb der CD25(-) Population, und sinkt etwas in der CD25(+) Population. In der geringeren Flagellin-Dosis ist der Effekt auf die CD25(-) Zellen nicht mehr sichtbar.

Die folgende Darstellung betrachtet die IL10-Produktion ausschließlich innerhalb der CD25(+) Zellen mit Hilfe von Histogrammen.

Abbildung 5.20: IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Zellen



Bedingt durch den Bezug auf die CD25(+) und nicht mehr auf alle CD4(+) Zellen ergeben sich Werte mit größerer Amplitude.

Andererseits zeigt sich abermals der nun bereits bekannte Effekt durch die kleinere CD25(+) Population im Rahmen der Suppression mit Flagellin. Dies wird sichtbar an der Graduierung der Y-Achse

Auch wenn die IL10-Produktion in den Zellkulturen, die allein mit Allergenextrakt inkubiert wurden, am höchsten war, so sehen wir nun in den Histogrammen bei starker Suppression eine deutliche Zunahme der IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Population. Dieser Effekt war bei der geringeren Dosis Flagellin (3,5 µg/ml) mit quantitativ geringerer Suppression aber nicht mehr nachweisbar.

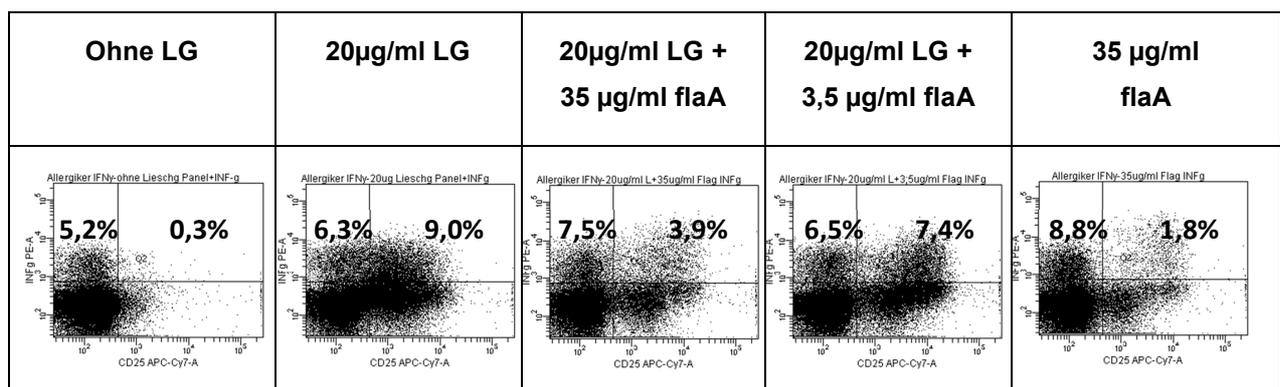
Zusammenfassend sehen wir Hinweise, daß sich durch die gleichzeitige Inkubation der PBMC mit Allergen und Flagellin die IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Zellen erhöht.

5.8.3. Interferon- γ

IFN- γ gilt als Schlüsselzytokin im Rahmen von TH1-dominierten Immunreaktionen. Damit wird es insbesondere bei Infektionen mit intrazellulären Erregern (wie bspw. Listerien) gebildet. Entsprechend wäre eine Zunahme von IFN- γ in Zellkulturen mit Listerien oder auch Flagellin zu erwarten.

Im murinen Modell induzierten Stock et al.²¹ mit Hilfe von HKL Treg, die IL10 und IFN- γ bildeten. Interessant war für uns, ob wir diese Zellen in unserem humanen Modell wiederfinden würden.

Abbildung 5.21: IFN- γ -Produktion und CD25-Expression



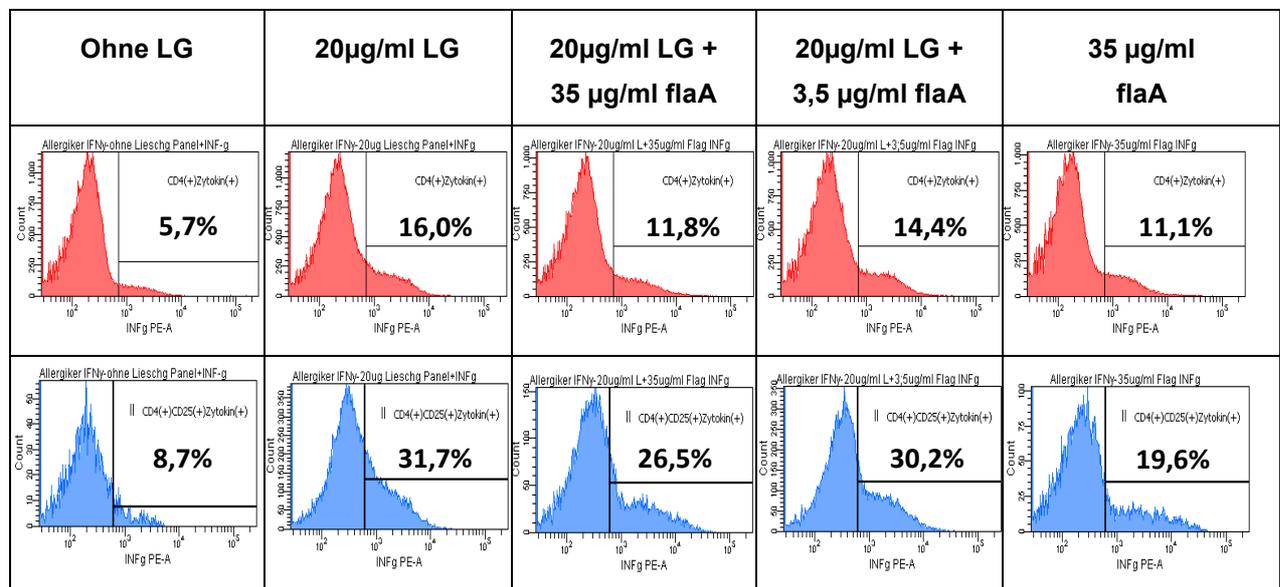
Die dot plots der Abbildung 5.21 zeigen die Ergebnisse. Dargestellt sind ausschließlich CD4(+) Zellen. Abermals wird die Zytokinproduktion der CD25-Expression gegenübergestellt.

Man erkennt eine deutliche Zunahme der IFN- γ -Produktion durch die Zugabe von Allergen. Durch die weitere Zugabe von Flagellin sinkt wiederum der Anteil IFN- γ -produzierender CD4-positiver Zellen.

Diese Senkung hat einen dosisabhängigen Bezug zur Flagellinkonzentration. Flagellin allein hat, wie bei einem Bestandteil eines potentiell intrazellulären Krankheitserregers zu erwarten, eine erhöhte IFN- γ -Produktion zur Folge, jedoch in vergleichsweise geringerem Ausmaß als das Allergen allein.

Betrachtet man die IFN- γ -Produktion in den gewohnten Subpopulationen CD4(+) (rote Histogramme) und CD4(+)CD25(+) (blaue Histogramme), so zeigt sich das gleiche Bild.

Abbildung 5.22: IFN- γ -Produktion innerhalb der CD4(+) und CD4(+)CD25(+) Zellen



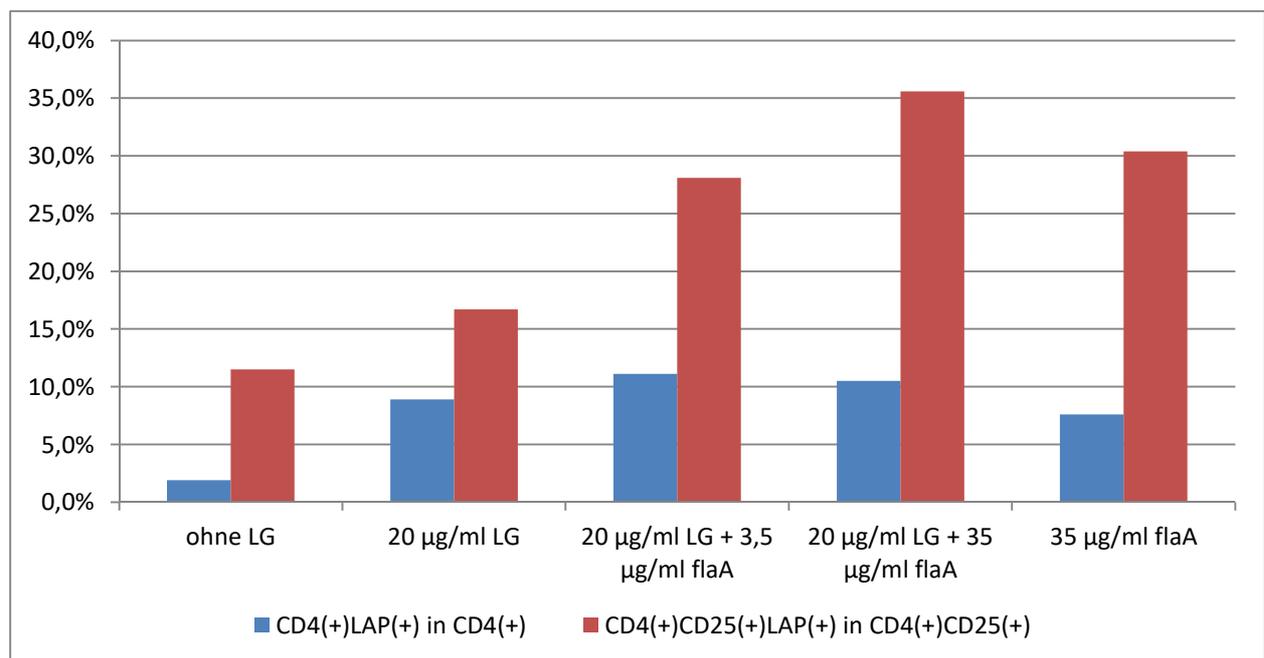
Dabei erkennt man, daß nach Eingrenzung auf CD25 ein höherer Anteil der Zellen IFN- γ produziert als in der CD4(+) Population. Ansonsten finden sich aber die gleichen qualitativen Effekte.

5.8.4. TGF- β / LAP

Wie im einleitenden Kapitel beschrieben, eignet sich der Zelloberflächenmarker LAP um TGF- β -produzierende Zellen zu identifizieren. Uns interessierte, ob die gleichzeitige Inkubation der PBMC mit Lieschgras-Allergen und Flagellin eine Vermehrung TGF- β -produzierender Zellen bewirkt.

Im folgenden Diagramm wird gezeigt, dass die Suppression der allergenspezifischen Proliferation durch Flagellin mit einer deutlichen Erhöhung der LAP-Expression einhergeht.

Abbildung 5.23: LAP-Expression



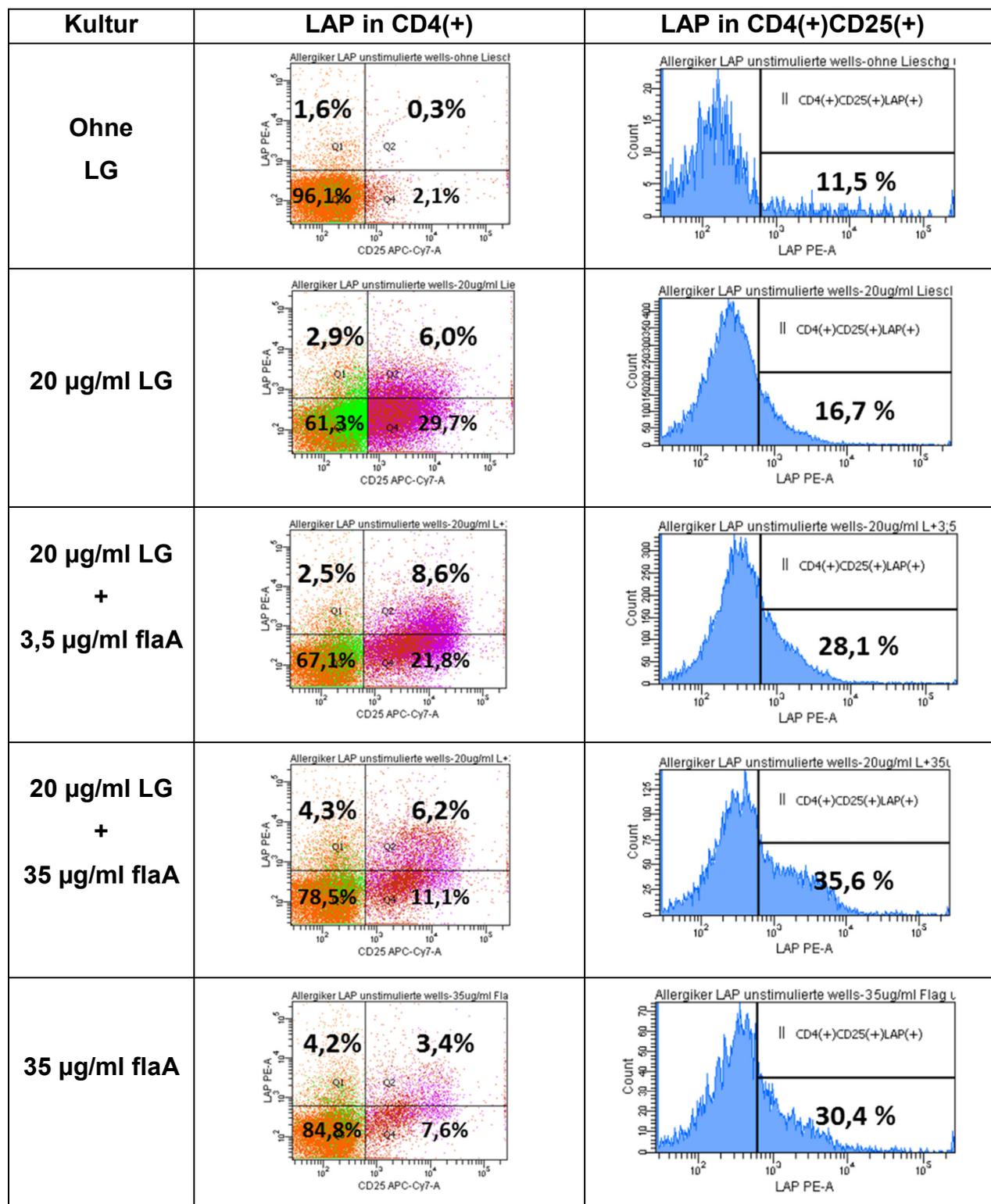
Das Diagramm 5.23 gibt die LAP-Expression innerhalb der CD4(+) Zellen (blaue Balken) sowie auch innerhalb der CD4(+)CD25(+)Zellen (rote Balken) wieder.

Wir sehen, daß eine jedwede durch uns vorgenommene Stimulation, eine Zunahme der LAP-Expression bewirkt. So nimmt auch durch alleinige Stimulation mit Allergen die LAP-Expression zu. Betrachtet man alle CD4(+) Zellen, bewirkt die Stimulation mit Flagellin allein eine ähnliche LAP-Expression wie die Stimulation mit Lieschgrasallergen allein (8,9% und respektive 7,6%).

Jedoch sehen wir, daß bei erfolgreicher Suppression der allergenspezifischen Proliferation durch Flagellin die LAP-Expression innerhalb der CD4(+) Zellen deutlich zunimmt. Betrachtet man nun die CD4(+)CD25(+) Zellen, so erkennt man eine noch deutlichere Zunahme der LAP-Expression durch Zugabe von Flagellin allein, verglichen

mit der Zugabe von Allergen allein (30,4% gegenüber 16,7%). Im einleitenden Kapitel wurde bereits beschrieben, daß nach häufig angewendeten Kriterien regulatorische T-Zellen CD25 exprimieren. Wir interpretieren daher diese vermehrte Expression von LAP innerhalb der CD25(+) Population als vermehrten Anteil regulatorischer T-Zellen.

Abbildung 5.24: LAP-Expression, dot plots und Histogramme



Die Abbildung 5.24 zeigt die dem Balkendiagramm zugrundeliegenden dot plots und Histogramme. Man erkennt, daß die Expression von CD25 für die LAP-Expression nicht zwingend erforderlich ist, da sich LAP-exprimierende CD25(-) Zellen nachweisen lassen. Der deutlichste Anstieg der LAP-Expression findet sich in den Kulturen, die zeitgleich mit Lieschgrasallergenextrakt und Flagellin inkubiert wurden.

Interessant ist, daß die Inkubation mit Flagellin allein bereits eine verstärkte LAP-Expression bewirkt. Jedoch wird dieser Effekt durch die zeitgleiche Auseinandersetzung mit einem Allergen noch deutlich verstärkt.

Es sei daran erinnert, daß es ohne Flagellin (damit nur mit Allergen) in diesem Fall zu einer massiven allergenspezifischen T-Zell-Proliferation kam. Die aktive Suppression dieser Proliferation bewirkte demnach eine weitere Vermehrung der LAP-Expression (und damit der TGF- β -Sekretion).

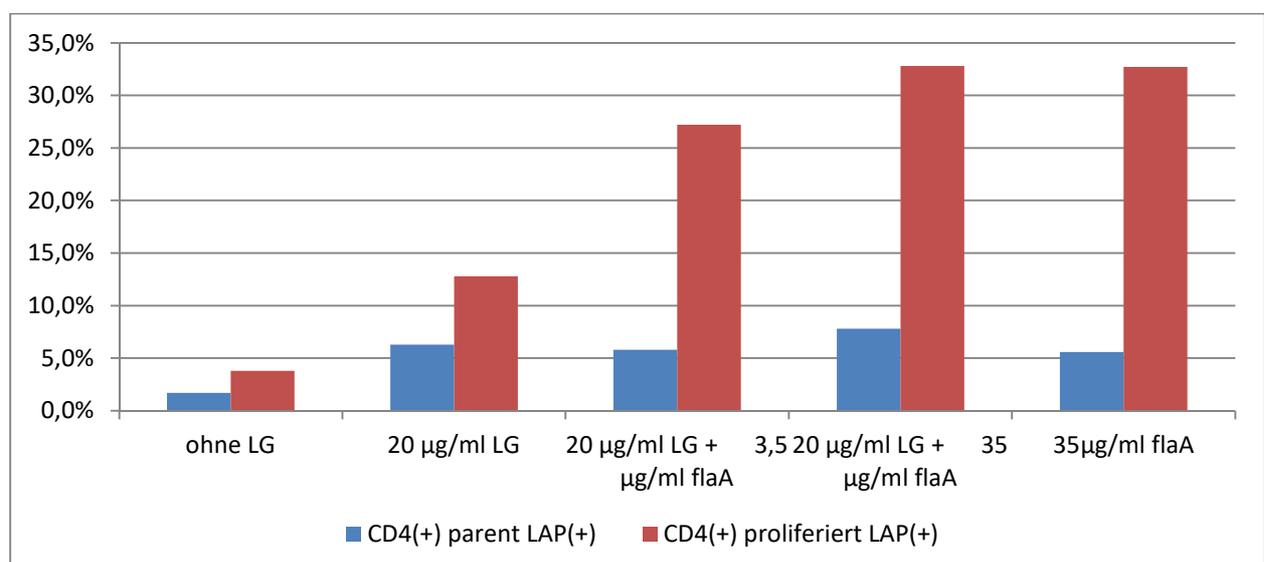
In Anbetracht der Tatsache, daß die Anzahl TGF- β -produzierender Zellen durch Suppression mit Flagellin erhöht wird, gehen wir davon aus Treg induziert zu haben.

Uns interessierte weiterhin, ob die LAP-Expression innerhalb der proliferierten Zellen (CFSE_{low}) Unterschiede zur parentalen Zellgeneration (CFSE^{high}) aufweist.

Die Abbildungen 5.25 und 5.26 stellen die Ergebnisse dar.

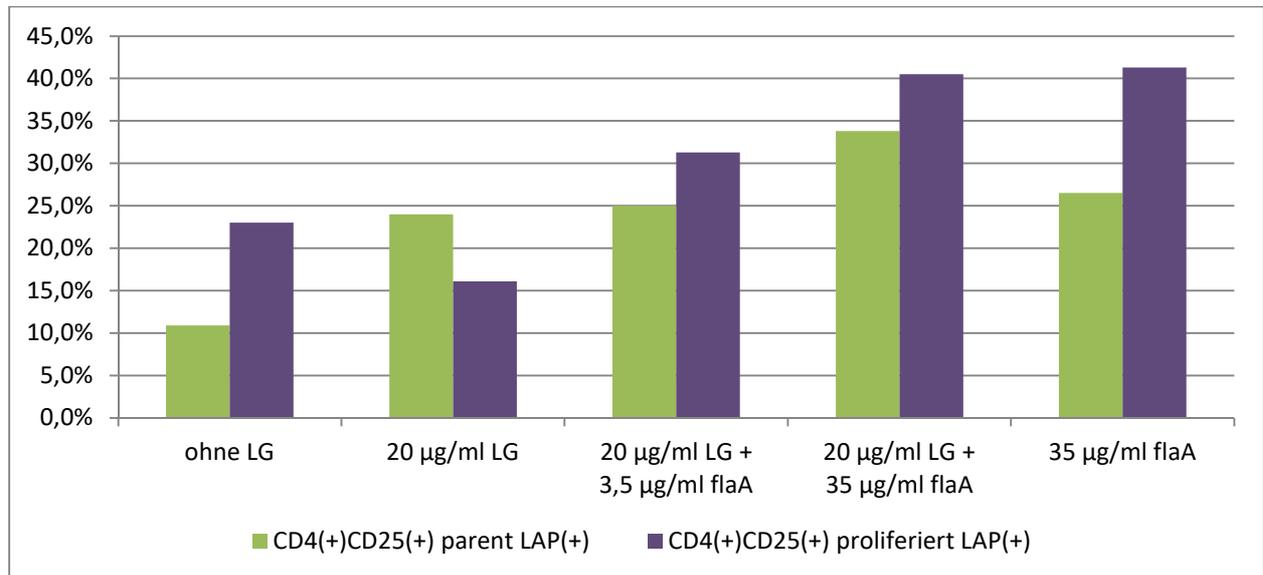
Die Angaben in Prozent beziehen sich jeweils auf den Anteil der LAP(+) Zellen innerhalb der genannten Population. Die blauen Balken zeigen den Anteil LAP(+) Zellen innerhalb der unproliferierten CD4(+) Zellen, die roten Balken den Anteil LAP(+) Zellen innerhalb der proliferierten CD4(+) Zellen.

Abbildung 5.25: LAP-Expression in parentalen und proliferierten CD4(+)Zellen



Die Abbildung 5.26 verfährt analog mit der LAP-Expression der CD25(+) Zellen

Abbildung 5.26: LAP-Expression in parentalen und proliferierten CD25(+)Zellen



Es zeigt sich, daß der Anteil TGF- β -produzierender Zellen innerhalb der proliferierten Zellen größer ist als innerhalb der parentalen Zellgeneration. Dies könnte ein Anhalt dafür sein, daß Treg zu einem großen Teil durch Proliferation entstehen, statt allein durch Differenzierung aus anderen T-Zell-Typen hervorzugehen.

Dieser Effekt zeigt sich in fast allen Kulturen, mit einer Ausnahme: Wir sehen in der CD4(+)CD25(+) Population bei Stimulation mit Allergen allein eine geringere Expression von LAP in der proliferierten Population als in der parentalen Generation.

Das verdeutlicht erneut, daß die im Rahmen der allergischen Reaktion proliferierten CD25(+) Zellen TH2-Lymphozyten sind, die kein TGF- β bilden.

Der relativ hohe Anteil LAP(+) Zellen (23%) in der proliferierten CD4(+) CD25(+) Population (lila Balken) in der Kultur „ohne Lieschgras“ ist nur eingeschränkt verwertbar, da es in dieser Kultur ja zu praktisch keiner Proliferation kam. Diese Population bestand aus nur 17 von insgesamt 111125 events. Prinzipiell ist jedoch denkbar, daß unstimuliert (in diesem Falle ohne Allergen) ein hoher Anteil der CD25(+) T-Zellen auch Treg sind. Die anderen Populationen bestanden aus deutlich mehr Zellen und sind damit aussagekräftiger.

5.9. Apoptose

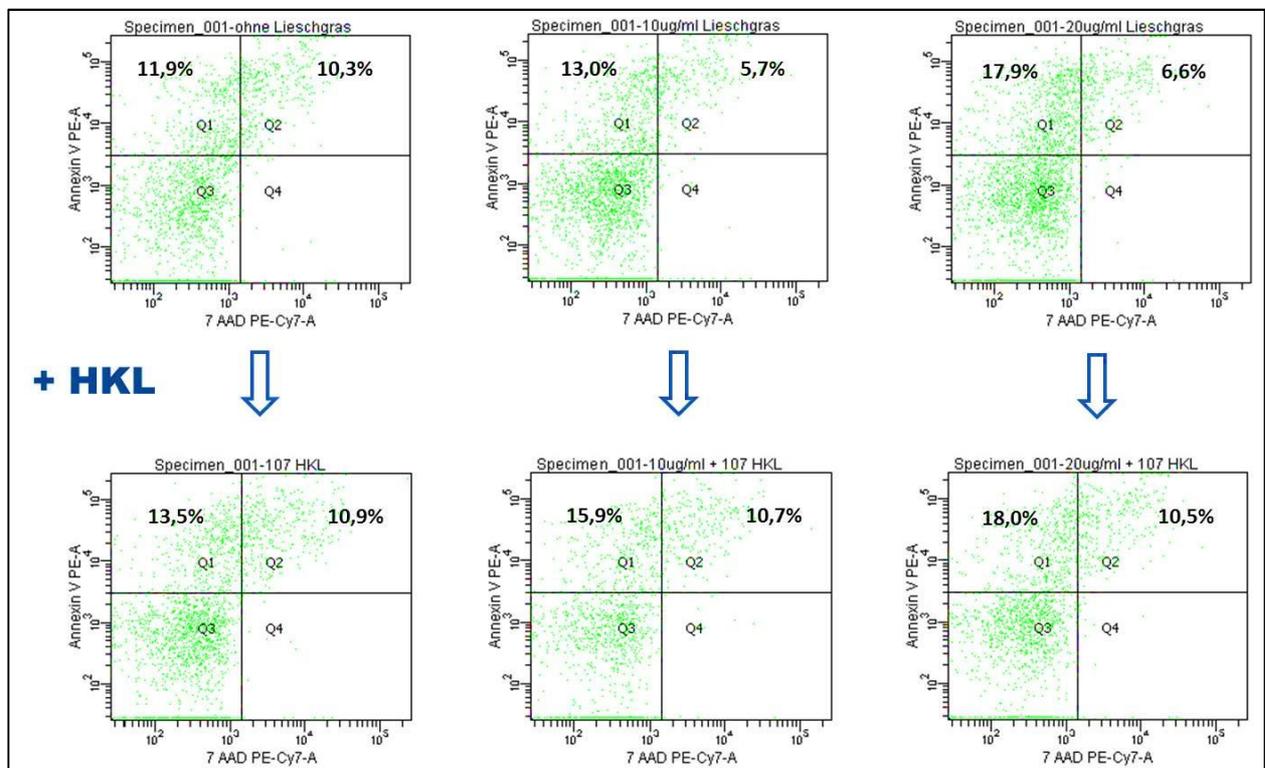
Apoptose spielt im Rahmen von selektiven zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Um zu untersuchen, ob selektive Prozesse eine Rolle bei der Entstehung von Immuntoleranz in unserem Modell spielen, untersuchten wir das Auftreten von Apoptose in unseren Zellkulturen mittels der Annexin-V-Färbung. Unsere Hypothese lautete, daß die immunmodulatorischen Effekte von HKL durch eine Steigerung der Apoptose in reaktiven T-Zellen verursacht werden.

Zuerst wird hier die Veränderung des Apoptose-Verhaltens anhand einer Beispielkultur demonstriert. Danach soll an zwei Messtagen (Tag 6 und Tag 8) gezeigt werden, daß die apoptotischen Prozesse früher einsetzen als die allergenspezifische T-Zell-Proliferation.

5.9.1. Induktion von Apoptose durch HKL

In dieser Analyse wurde erst ein Lymphozytengate gesetzt (nicht dargestellt), und danach der Anteil apoptotischer Zellen in der CD4(+) Population (grün dargestellt) untersucht.

Abbildung 5.27: Apoptose CD4(+) mit und ohne HKL



Früh-apoptotische Zellen sind ausschließlich Annexin V(+) und in den hier dargestellten dot plots daher im Quadranten Q1 zu finden. Verlieren die Zellen die Integrität ihrer Zellmembran und werden nekrotisch, lassen sie sich zusätzlich mit 7AAD färben. Sie finden sich dann in Quadrant Q2.

Nimmt der Grad an Nekrose zu, fragmentieren die Zellen und verlassen das zuvor gesetzte Lymphozytengate (P1). Spätnekrotische Zellen wurden somit in diesen dot plots nicht erfasst.

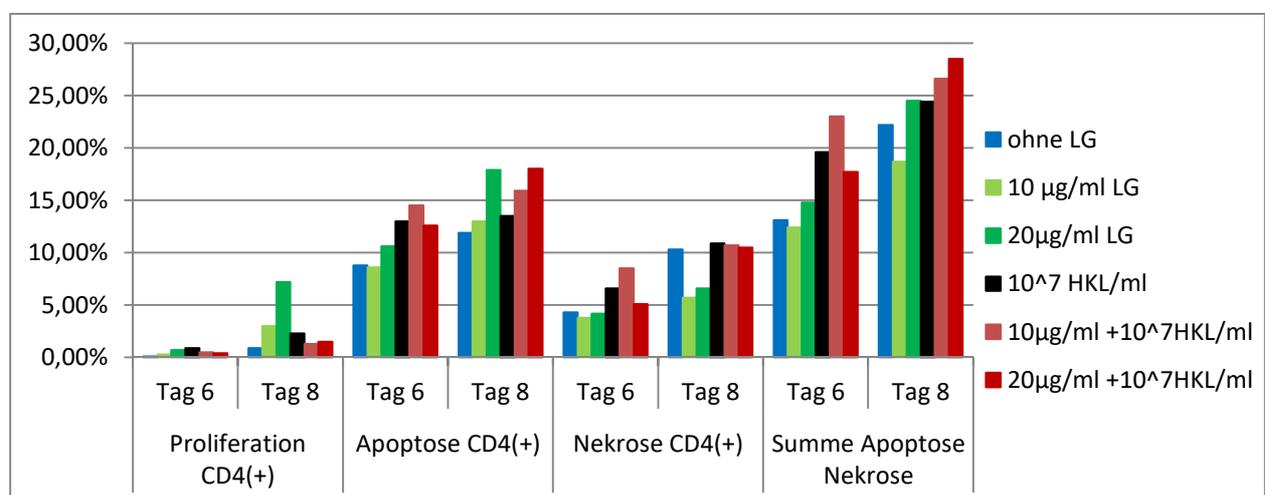
Die Abbildung 5.27 zeigt in der ersten Reihe dot plots einer unstimulierten Kultur (ohne Allergen) sowie jeweils eine Kultur mit steigender Konzentration an Allergen (10 µg/ml und 20 µg/ml). Die darunterliegende Reihe zeigt jeweils eine entsprechend angelegte Zellkultur, die zusätzlich mit 10^7 HKL/ml inkubiert wurde.

Man kann der Grafik entnehmen, daß in allen Kulturen die Zugabe von HKL eine Zunahme des Zelltodes bewirkt (hier an Tag 8 gemessen). Wichtig ist, daß diese Zunahme nicht mit der Proliferation zusammen hängt. Die maximale Proliferation fand sich in der Schale „20 µg/ml Lieschgrasallergen“, die maximale Rate an Apoptose in „20 µg/ml Lieschgasallergen + 10^7 HKL/ml“.

5.9.2. Zeitkinetik der Apoptose durch HKL

Uns interessierte, ab welchem Inkubationstag die durch HKL induzierten apoptotischen Prozesse nachweisbar sind. Dazu bestimmten wir das Ausmaß der Apoptose an mehreren Messtagen. Das Diagramm 5.28 vergleicht die Messtage 6 und 8 eines Versuches. Gleich behandelte Zellkulturen werden jeweils mit der gleichen Farbe dargestellt (bspw. „blau“ für die Zellkultur ohne Allergen und ohne HKL).

Abbildung 5.28: Apoptose CD4(+) mit und ohne HKL



Links wird zuerst die Proliferation der Zellkulturen demonstriert. Man erkennt, daß an Tag 6 die Proliferation noch nicht begonnen hat. An Tag 8 zeigt sich eine konzentrationsabhängige T-Zellproliferation (steigende grüne Balken), welche mit Hilfe von 10^7 HKL/ml supprimiert werden konnte.

In den weiteren Säulenkomplexen rechts neben der Proliferation ist das Apoptoseverhalten der gleichen Zellkulturen an Tag 6 und 8 gegenübergestellt. Man erkennt bereits an Tag 6, dass es durch die Koinkubation von Lieschgrasallergen mit HKL (schwarze und rote Säulen) zu einer Zunahme an CD4(+)Annexin-V(+) und damit apoptotischen Zellen kommt.

Zieht man zusätzlich die Population doppelt-positiver T-Zellen für 7-AAD und Annexin-V in Betracht, also spät-apoptotische und bereits nekrotische Zellen, so wird der Effekt noch deutlicher (Säulen ganz rechts).

HKL induzieren demnach in einigen T-Zellen Apoptose noch bevor es zu einer Lieschgras-spezifischen Proliferation kommt.

Auffällig ist aber auch, daß HKL in Abwesenheit des Allergens (schwarze Balken) ein Ausmaß an Apoptose induzieren, das jenes durch Lieschgras allein (grüne Balken) oder ohne artifizielle Stimuli (blau dargestellt) übertrifft.

An Tag 8 war der Unterschied der Apoptoseinduktion zwischen den Schalen mit HKL (rote Säulen) und ohne HKL (grüne Säulen) nicht mehr so deutlich. Jedoch zeigen sich an diesem Tag funktionell die suppressiven Effekte der HKL durch verminderte Proliferation (7,2% mit Allergen allein gegenüber 1,5% bei Allergen und HKL).

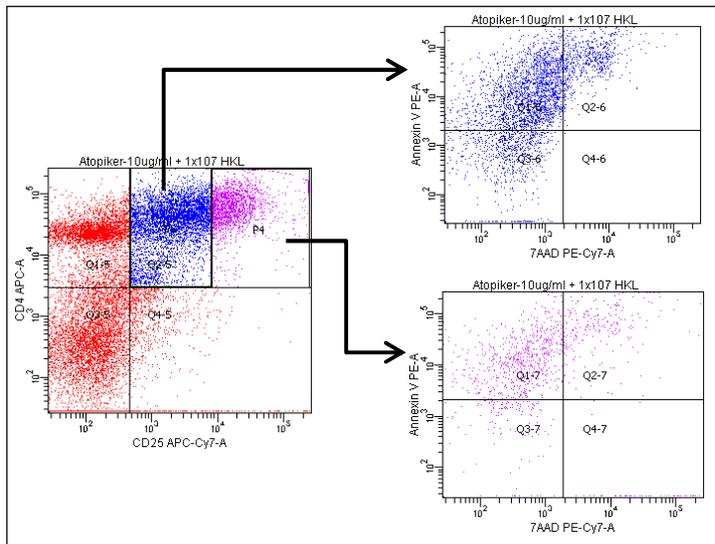
5.9.3. Apoptose durch HKL CD25^{high} gegenüber CD25^{low}

Regulatorische T-Zellen gelten als CD25-hochpositive Zellen. Wir untersuchten, ob sich in unseren Zellkulturen ein Unterschied in der Apoptose von CD25-hochpositiven T-Zellen im Vergleich zu CD25-niedrigpositiven Zellen zeigt.

Die Abbildung 5.29 veranschaulicht das Analyseverfahren. Es wurde ein dot plot erstellt, in dem CD4 gegen CD25 dargestellt wurde. Der doppelt-positive obere rechte Quadrant (hier Q2-5) wurde in zwei Hälften geteilt. Mit der Farbe „blau“ dargestellt sind die CD25^{low} exprimierenden Zellen, „lila“ die CD25^{high} exprimierenden Zellen.

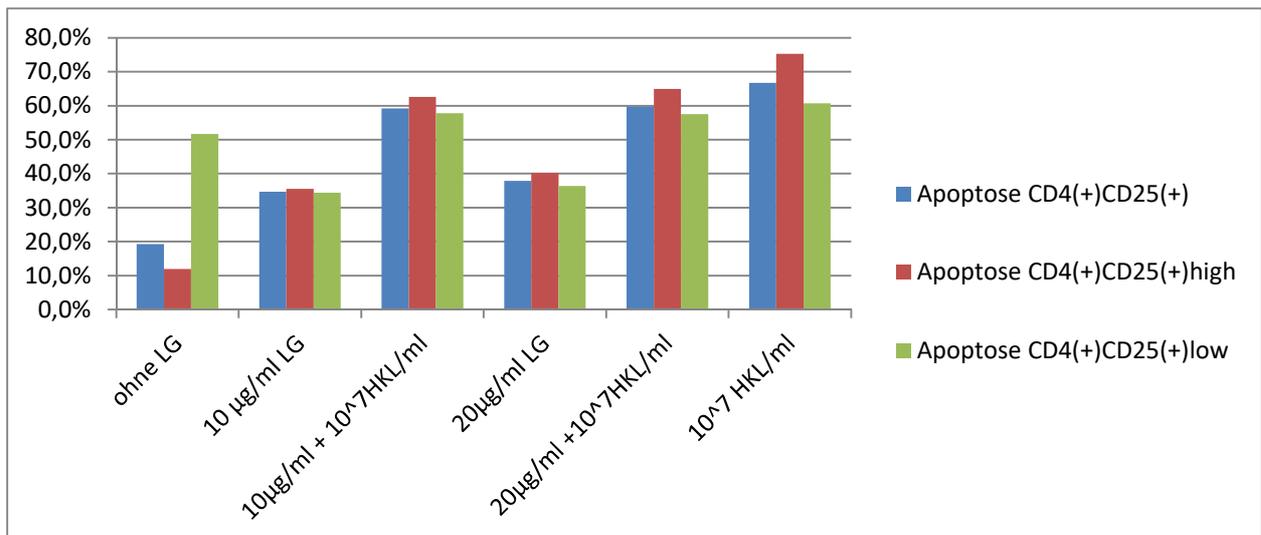
Abbildung 5.29:

Methodik Apoptose in $CD4(+)CD25(+)^{high}$ versus Apoptose $CD4(+)CD25(+)^{low}$



Das Diagramm 5.30 fasst die Ergebnisse zusammen.

Abbildung 5.30: Apoptose $CD4(+)CD25(+)^{high}$ versus Apoptose $CD4(+)CD25(+)^{low}$



In fast allen Schalen zeigte sich eine nur leicht höhere Apoptose in den CD25 stark exprimierenden T-Zellen. Dies war gleich in Kulturen mit und ohne HKL.

Die Apoptoserate zeigt sich damit in der vermeintlich Treg-reichen $CD25(+)^{high}$ -exprimierenden Population nicht wesentlich verändert. Dies steht im Widerspruch zu unserer Hypothese, daß die Selektion von Treg für die gesteigerte Apoptose verantwortlich ist.

Abweichend verhält sich lediglich die Kultur der unstimulierten Zellen („ohne LG“). Hier sehen wir ohne Allergen eine deutlich höhere Apoptose in den CD25-niedrig-exprimierenden Zellen, was auf Apoptose durch Anergie mangels Stimulation schließen lässt. Es gab hier folglich nur sehr wenige Zellen die CD25^{high} exprimierten (183 von insgesamt 40.755 gezählten events).

5.10. Zusammenfassung der Ergebnisse

5.10.1. Entwicklung der Methode

Wir haben eine Methode entwickelt, mit der sich eine allergenspezifische T-Zellproliferation durch Zugabe der Adjuvanzien HKL und HKL-spezifischem Flagellin supprimieren lässt.

Wir verwendeten PBMC, Lieschgrasallergenextrakte sowie HKL und HKL-spezifisches Flagellin. Abgesehen von humanem Serum, das im Rahmen der Blutentnahme mit abgenommen worden war, setzten wir keine zusätzlichen Stimulatoren in Form von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren ein.

Da wir PBMC von Nichtallergikern mit PBMC von Allergikern verglichen haben, können wir klar belegen, daß es zu einer allergenspezifischen Immunreaktion in unseren Versuchen kommt.

Im Weiteren wiederholten wir diese allergenspezifische Proliferation und konnten sie durch zeitgleiche Zugabe von HKL oder HKL-spezifischem Flagellin inhibieren.

Damit haben wir die bereits aus dem murinen Modell bekannten immunmodulatorischen Fähigkeiten von HKL auf ein humanes Zellkulturmodell übertragen, und gezeigt, daß die Effekte auch hier funktionell nachweisbar sind.

Wir wollten jedoch zusätzlich auch die zugrundeliegenden Mechanismen aufdecken und nachweisen, daß die funktionell sichtbaren Effekte durch die Induktion von Treg begründet sind.

Dabei fiel als erstes auf, daß im Gegensatz zu den berichteten Tierversuchen die zeitliche Dauer der Inkubation verlängert war. Die optimalen Messtage zur Analyse der Ergebnisse fanden sich ab Tag 8. Bei den Tierversuchen kamen Dendritische Zellen zum Einsatz, bei uns das Allergen. Das legt nahe, daß die Allergen-Prozessierung und -Präsentation durch APC in unserem Modell einige Tage benötigt.

5.10.2. Nachweis von Treg

Eine Schwierigkeit in unserem Modell war die Interpretation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei sich verschieden entwickelnden Zellpopulationen

Um den durchflusszytometrischen Nachweis der Induktion von Treg zu erbringen, verwendeten wir typische Marker. Bei den folgenden Markern zeigten sich die interessantesten Ergebnisse.

CD25

Der älteste bekannte Treg-Marker ist CD25.

Wir haben gesehen, daß die Expression von CD25 zur Proliferation erforderlich ist, und damit CD25 in rasch proliferierenden Zellkulturen am stärksten exprimiert wird.

Wir fanden damit den größten Anteil CD25(+) Zellen in Zellkulturen von Allergikern, die ausschließlich mit Allergen inkubiert wurden. Durch die erfolgreiche Suppression mit HKL und Flagellin nahm die CD25-Expression wieder ab. Damit eignet sich CD25 allein nicht als Marker für Treg in unserem Modell.

FoxP3

Bei der Untersuchung der Expression des bekanntesten intrazellulären Treg-Markers Foxp3 ergaben sich heterogene Ergebnisse.

Absolut betrachtet korreliert FoxP3 eher mit dem Ausmaß der T-Zell-Proliferation als mit den funktionell sichtbaren immunmodulatorischen Fähigkeiten. Wir sahen die größte Anzahl CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Zellen in den Kulturen, die rege mittels Allergen proliferierten, und geringere Frequenzen in den mit HKL oder Flagellin zusätzlich supprimierten Kulturen. Damit hat FoxP3 zuallererst die Funktion eines Aktivierungsmarkers in unserem Modell.

Betrachteten wir jedoch die FoxP3-Expression innerhalb der CD25(+) Subpopulation, sahen wir Hinweise auf den Nachweis von Treg. So nimmt zwar das Auftreten von CD3(+)CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Zellen mit der Proliferation quantitativ zu, jedoch ist nach erfolgreicher Suppression durch Flagellin der Anteil FoxP3(+) Zellen in der CD25(+) Population höher als in der Kultur ohne Flagellin. Da dies nicht durch die bloße Aktivierung erklärt wird (in den unsupprimierten Kulturen mit Allergen allein fand sich die stärkste Aktivierung), werten wir dies als Hinweis auf induzierte Treg.

LAP

Die Marker für Treg CD25 und FoxP3 werden somit auch bei Aktivierung der Zellen exprimiert, und dadurch sind im Rahmen der Analyse die vermeintlichen Treg von den aktivierten (bspw. rasch proliferierenden) T-Zellen kaum zu unterscheiden.

Wir haben aber auch gezeigt, daß durch die Suppression der allergenspezifischen Proliferation mit Flagellin die LAP-Produktion innerhalb der CD4(+) Zellen zunimmt.

Da im Rahmen einer allergischen Reaktion sich rege teilende TH2-Zellen kein TGF- β bilden, kann man durch Messung von LAP in der CD4(+) Population auf ein vermehrtes Auftreten von Treg schließen. Jedoch wird auch hier der Effekt quantitativ deutlicher, wenn man die CD4(+)CD25(+) Population betrachtet.

Uns interessierte genauer, welche Zellen LAP exprimieren. Dabei verglichen wir die parentalen (CFSE^{high}) mit den proliferierten Zellen (CFSE_{low}). Wir sahen, daß in der Regel die LAP-Produktion in den proliferierten Zellen überwiegt.

Der größte Anteil LAP-exprimierender Zellen findet sich nach erfolgreicher Suppression durch Flagellin. Das kann als Bildung von Treg interpretiert werden. Da hier die LAP-Expression am höchsten innerhalb der proliferierten Zellen ist, lässt sich mutmaßen, daß zur Entstehung von Immuntoleranz die Proliferation regulatorisch kompetenter Zellen ein wesentlicher Mechanismus ist.

Es scheint damit nicht allein zur Umdifferenzierung bereits vorhandener T-Zellen zu kommen.

6. Diskussion

Das Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der im Rahmen eines humanen Modelles *in vitro* eine allergenspezifische T-Zellproliferation bewirkt und in der Folge mittels HKL und HKL-spezifischem Flagellin wieder supprimiert werden kann.

Wir erwarteten, durch diese Immunstimulatoren regulatorische T-Zellen zu induzieren. Wir wollten diese durch spezifische Antikörper in der Durchflusszytometrie nachweisen. Im Folgenden soll im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen schrittweise diskutiert werden, ob wir damit erfolgreich waren.

6.1. Ist die Proliferation in unserem Modell allergenspezifisch?

Um den Nachweis der Allergenspezifität zu erbringen, inkubierten wir Zellkulturen von Nichtallergikern und Allergikern mit Lieschgrasallergenextrakt.

In Kapitel 5.1. wurde dargestellt, daß die Inkubation von PBMC eines Nichtallergikers mit Lieschgrasallergenextrakt nur zu einer minimalen T-Zellproliferation führt. Jedoch führte die Inkubation von PBMC eines Probanden mit subjektiv beschriebenem Heuschnupfen und serologisch gesicherter Sensibilisierung gegen Lieschgrasallergen zu einer deutlichen Proliferation. Dies hatten wir in Tests mit mehreren Nichtallergikern bestätigen können.

In den weiteren Versuchen mit PBMC der Allergiker wurden regelmäßig Kulturen ohne Allergenextrakt und solche mit Allergenextrakt derselben Blutentnahme gleichzeitig inkubiert. Somit lief in jedem Versuch praktisch eine Kontrollkultur „ohne Allergen“ mit. Dabei konnte regelmäßig gesehen werden, daß die Inkubation mit dem Allergen eine deutliche T-Zellproliferation bewirkte, die bei den Allergikern ohne Allergen ausblieb.

Durch diese zwei Arten der Kontrolle sehen wir die Allergenspezifität unseres Modelles als bewiesen an.

Auch beim Nichtallergiker fand sich ein, wenn auch geringes, Ausmaß der Proliferation von T-Zellen durch Allergen. Wir denken, daß auch beim Gesunden eine immunologische Auseinandersetzung mit dem Allergen stattfindet (Allergenpräsentation und Reaktion). Jedoch bleibt bei Immuntoleranz eine unerwünscht ausgeprägte Reaktion aus.

Die Verwendung von Allergenen zur spezifischen T-Zell-Proliferation wurde bereits vor uns praktiziert. 2003 zeigten Rimaniol *et al.*⁸⁹, dass sie mit Lieschgrasallergenextrakt

CD4(+) T-Zellen von Lieschgrasallergikern zur Proliferation *in vitro* stimulieren konnten. Diese Proliferation fiel weitaus stärker aus als bei Nichtatopikern, oder bei Atopikern mit anderen Sensibilisierungen. Sie verglichen die Proliferation auf Lieschgrasallergenextrakt mit der Proliferation auf gereinigtes Tuberkulin-Proteinderivat (PPP) und auf Tetanustoxoid (TT). Die Proliferation auf PPP und TT erfolgte bei allen drei Probandengruppen in gleicher Höhe, ganz im Gegenteil zur Proliferation auf Lieschgrasallergen. Daraus schlussfolgerten sie, dass die erzielte Proliferation allergenspezifisch sei.

Um die Proliferation zu bewerten, errechneten Rimaniol *et al.* den Stimulationsindex (SI). Der SI berechnet sich aus dem Prozentsatz von Zellen, die auf ein bestimmtes Antigen proliferieren geteilt durch den Prozentsatz von Zellen, die spontan in Medium proliferieren. Sie werteten bereits $SI \geq 2$ als proliferative Antwort. Wir überstiegen dieses Mindestmaß in der Regel deutlich.

Im in Kapitel 5.1 gezeigten Beispiel zeigte sich eine maximale Proliferation von 38,6% beim Allergiker durch Lieschgrasallergenextrakt, verglichen mit 4,8% ohne Allergen. Daraus resultiert rechnerisch ein Stimulationsindex von 8,04.

Der Vergleich der 38,6% Proliferation des Allergikers mit den 7,7% des Nichtallergikers ergäbe zwar auch einen hohen SI, ist jedoch unserer Ansicht nach irreführend.

Wir beobachteten bereits bei PBMC nur eines Allergikers in unterschiedlichen Experimenten sehr variable Ergebnisse der maximalen Proliferation. Dementsprechend ist der quantitative Vergleich zweier Probanden nicht sinnvoll.

Im Rahmen unserer Versuche deutete sich jedoch an, daß einige Probanden eher zu ausgeprägten T-Zellproliferationen neigen. Wir sahen einen tendenziellen Zusammenhang der klinisch beschriebenen Symptomatik der Probanden mit der zumeist erreichten Proliferation. Die Probanden 1 (spezifisches IgE 4,83 kUA/l) und 2 (19,5 kUA/l) berichteten über eine hohe saisonale klinische Belastung durch Gräserpollen. Demgegenüber berichtete Proband 3 (16,4 kUA/l) über eine größere Schwere der Symptomatik im Kindesalter, aber in den letzten Jahren nur noch über geringe Probleme. Proband 4 (24,2 kUA/l) wies zwar ein hohes spezifisches IgE gegen Lieschgras auf, erlebt die Pollenflugsaison jedoch nur mit geringer klinischer Beeinträchtigung.

Dies geht einher mit regelmäßig ausgeprägter Proliferation der Probanden 1 und 2 und für unsere Versuche eher unbefriedigenden Proliferationen der Probanden 3 und 4.

Damit korreliert unsere Proliferation eher mit der Klinik als dem Ausmaß der spezifischen Sensibilisierung. Für eine Analyse dieser Korrelation ist unsere Kohorte zu klein. Auch wurde die klinische Beeinträchtigung nicht systematisch erfragt, da dies nicht im Fokus unserer Arbeit stand. Auch lässt sich hieraus aufgrund der großen individuellen Schwankungsbreite kaum ein klinisches Testverfahren ableiten.

Zusammenfassend sehen wir die Allergenspezifität in unseren Experimenten für belegt an. Das Ausmaß der Proliferation ist deutlich und liefert viele Zellen für die durchflusszytometrische Analyse auch kleiner T-Zellsubpopulationen.

6.2. Vergleich der Allergenextrakte

Wir verglichen zwei unterschiedliche Allergenextrakte. Dazu verwendeten wir einerseits eine kommerziell erhältliche Pricktestlösung von ALK-Scherax mit einem auf dem freien Markt nicht erhältlichen Produkt von Allergopharma.

Wir inkubierten Blut aus einer Blutentnahme eines allergischen Probanden mit beiden Extrakten, um danach die Proliferation quantitativ vergleichen zu können.

Da ALK-Scherax die Allergendosis in SQ/ml angibt, Allergopharma jedoch in $\mu\text{g/ml}$, ist der absolute Allergengehalt leider nicht direkt vergleichbar.

Die SQ-Einheiten von ALK-Scherax korrelieren nach Anfrage beim Hersteller direkt mit den enthaltenen Majorallergenen, das Verhältnis der einzelnen Allergenkomponenten (Major- und Minorallergene) sei von Charge zu Charge innerhalb bestimmter Toleranzbereiche gleich. Ein Umrechnungsfaktor in $\mu\text{g/ml}$ wurde nicht genannt.

Im Produkt von Allergopharma können nach Angabe von Prof. Fiebig alle Haupt- und Minorallergene (Phl p 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6, 7, 10, 11, 12,13) qualitativ nachgewiesen werden. Die dominierenden Hauptallergene Phl p 5a/b werden mittels ELISA quantifiziert. Bei Allergopharma werden zur Stimulation von PBMC Extraktprotein-Endkonzentrationen von 0,1-1,0-10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

In ersten Versuchen mit dem ALK-Produkt hatten wir 3000 SQ/ml als Optimaldosis für unsere Versuche bestimmt. Da das Lysat 100.000 SQ/ml enthält, setzten wir bei 3000 SQ/ml damit 30 μl Lysat je Milliliter Kultur ein.

Das Allergopharma-Produkt wurde zu einer Stocklösung von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. In einem nicht gezeigten Versuch testeten wir unterschiedliche Konzentrationen des Extraktes in PBMC und ermittelten 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ als optimale Menge.

20µg/ml entsprechen demnach 20 µl Stocklösung je Milliliter Zellkultur. Damit erzielten wir eine über doppelt so ausgeprägte Proliferation wie mit dem ALK-Produkt (40,6% gegenüber 20,0%).

Für die unterschiedliche Potenz der Allergenextrakte gibt es mehrere denkbare Ursachen:

So ist es möglich, daß die Allergopharma-Stocklösung deutlich mehr Allergen je Volumen enthält als die ALK-Pricktestlösung. Für unsere Versuche war jedoch wichtig, eine hohe spezifische Proliferation durch ein möglichst geringes Volumen Allergenextrakt zu bewirken, damit es nicht das für die Ernährung der Zellen wichtige Zellmedium aus den 2 ml Gesamtmenge „verdrängt“. Da hier in unserem Versuch das Allergopharmaprodukt in dieser Hinsicht deutlich überlegen war, verwendeten wir fortan nur noch dieses.

Auch ist bekannt, daß Lieschgras-Allergiker gegen unterschiedliche Allergene des Lieschgrases sensibilisiert sein können. Falls beide Extrakte eine unterschiedliche Zusammensetzung an Allergen-Epitopen beinhalten, könnte dies die unterschiedliche Potenz bei unterschiedlichen Probanden erklären.

Beide Lösungen sind aber für den experimentellen Gebrauch in unserem Modell gut geeignet.

6.3. Bestimmung optimaler Messtage

Kapitel 5.3 beschreibt, wie wir das optimale Zeitfenster zur durchflusszytometrischen Analyse unserer Zellen bestimmten.

Dazu untersuchten wir abermals zuerst Zellkulturen eines Nichtallergikers. Es zeigte sich, daß mit längerem Voranschreiten des Experimentes auch hier T-Zellproliferation stattfand, die jedoch keinen Zusammenhang mit der Zugabe von Allergen und der Allergendosis hatte. Wir werten diese Proliferation daher als unspezifisch, und gehen davon aus, daß solche unspezifischen Artefakte auch bei Allergikern auftreten. Eine lange Dauer des Experimentes gefährdet daher dessen Aussagekraft.

Bei Zellkulturen von Allergikern zeigte sich eine dosisspezifische T-Zellproliferation an Tag 8. Bei Voranschreiten des Versuches bis zum zwölften Tag kehrte sich dieser Zustand praktisch um. Es trat auch hier eine ausgeprägte Proliferation in Kulturen ohne Allergen auf. Zudem proliferierten die Kulturen mit geringer Allergendosis reger als die mit hoher Dosis.

Dies steht jedoch nicht im Gegensatz zur Allergenspezifität. Wir führen dies auf den Verbrauch von Medium durch die Proliferation zurück. Wir hatten unsere Kulturen nach Inkubation nicht mehr „nachgefüttert“.

So wurde bei früher reichlicher Proliferation durch Allergen vermutlich bereits so viel Energie verbraucht, daß an Tag 12 kein geeignetes Medium mehr für eine Proliferation zur Verfügung steht. Ein geringeres Ausmaß der Proliferation ermöglicht demnach eine längere Proliferationsdauer.

Da bei längerer Dauer jedoch wie gezeigt auch die unspezifische Proliferation zunimmt, wollten wir so zeitig wie möglich messen. Wir verglichen daher auch Zellen nach sechs und acht Tagen. Hierbei ergibt sich das Problem, daß nach 6 Tagen noch keine nennenswerte Proliferation nachweisbar ist. Für unsere Versuche gilt also einerseits spät genug zu messen, um eine Proliferation zu sehen, aber früh genug, bevor Artefakte durch unspezifische Proliferation zunehmen.

Anhand dieser Ergebnisse werten wir den optimalen Tag zur Auswertung zwei Tage nach Beginn der Proliferation. In der Regel war das der achte Tag nach Inkubation.

Im einleitenden Kapitel wurde erklärt, daß unsere Hypothesen auf Vorerfahrungen aus einem murinen Modell beruhen. Im Rahmen dieses Modells wurden aus unterschiedlich behandelten Mäusen dendritische Zellen (DC) entnommen und *in vitro* die durch sie ausgelöste T-Zellproliferation gemessen. Diese begann sofort nach DC-Gabe. Nach 48h waren bereits bis zu 4 Zellteilungen nachweisbar.

Wir sehen damit ein deutlich späteres Auftreten der T-Zell-Proliferation in unserem Modell verglichen mit dem murinen Modell.

Im murinen Modell wurden dendritische Zellen, die sich bereits *in vivo* mit Allergen und HKL auseinandergesetzt hatten, zur *in vitro*-Stimulation der T-Zellen verwendet. Dies stellt sozusagen eine Abkürzung dar. Bei uns muss jedoch die Allergenprozessierung und -Präsentation durch APC erst noch erfolgen. Wir vermuten hierin die Ursache für die längere Dauer unserer Experimente.

6.4. Suppression der allergenspezifischen Proliferation

In Kapitel 5.5 wurde die Eignung von HKL gezeigt, eine allergenspezifische Proliferation durch Lieschgrasallergenextrakt wieder zu supprimieren. Dieser Effekt konnte ab einer Allergenkonzentration von 100 SQ/ml bis 3000 SQ/ml sogar dosisspezifisch nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß eine höhere HKL-Dosis auch deutlicher supprimiert.

Der Effekt war bei einer niedrigen Dosis von Allergenextrakt (30 SQ/ml) und dementsprechend geringen allergenspezifischen Proliferation nicht nachweisbar. Hier kam es zu einer Verstärkung der Proliferation.

Dies erklären wir durch die durch HKL selbst induzierte Proliferation. Bei 30 SQ/ml kam es nur zu einer geringen allergenspezifischen Proliferation, so daß die HKL-induzierte Proliferation die Proliferation durch Allergenextrakt überwog.

Ein Hauptproblem bei der Arbeit mit HKL ist daher, daß die T-Zellen teilweise deutlich auf die HKL-Gabe proliferieren. Ähnlich zum Ausmaß der allergenspezifischen Proliferation auf Allergen ist das Ausmaß der Proliferation auf HKL sehr variabel und nicht vorhersehbar. Bei intensiver Proliferation auf HKL ist keine Suppression der allergenspezifischen Proliferation mehr messbar.

HKL interagieren stark mit TLR2 und aktivieren NF- κ B und wirken dadurch auf sehr viele Zellarten. Eine T-Zellproliferation auf HKL ist somit nicht verwunderlich.

Ihre suppressiven Fähigkeiten zeigen die HKL in unserem Modell jedoch nur, wenn die durch sie vermittelte Proliferation gering bleibt.

Da sich die Proliferation auf HKL nicht vermeiden lässt, suchten wir nach Auswegen. Generell kommen viele Bestandteile der HKL als die eigentlichen Immunmodulatoren in Frage.

In Kapitel 3.2 wurde bereits erläutert, daß Stock *et al.* in Tierversuchen mit Hilfe unterschiedlichen knockout-Maustypen einzelne Komponenten der HKL untersucht hatte. Ein Organ der Listerien, über das nur wenige Bakterien verfügen sind Flagellen. Diese sind aus Proteinbausteinen gebaut, dem Flagellin. Flagellin bindet an TLR-5.

In Stocks Mausmodell blieb die Frage offen, ob die immunmodulatorischen Fähigkeiten der HKL auf Flagellin zurückzuführen sind.

Die Arbeitsgruppe Scheurer und Schülke stellte uns freundlicherweise von ihnen selbst hergestelltes rekombinantes und LPS-freies Flagellin zur Verfügung.

Hiermit war eine dosisspezifische Suppression der allergenspezifischen Proliferation möglich. Flagellin war in unserem Modell auch den HKL überlegen. Es stellt einen geringeren eigenen Proliferationsstimulus dar. Hiermit gelang die Suppression der allergenspezifischen Proliferation in größerer Regelmäßigkeit.

Der von uns eingesetzte Dosisbereich lag zwischen 3,5 µg/ml und 35 µg/ml. Dies scheint sehr viel, verglichen mit den sonst eingesetzten 10^7 HKL/ml.

Das Gewicht von Listerien oder gar der Flagellen ist bisher nie bestimmt worden. In der Literatur finden sich insgesamt sehr unterschiedliche Daten zum Gewicht von Bakterien. Einem Team um Prof. Craighead gelang es 2004 jedoch ein *E. coli*-Bakterium zu wiegen⁹⁰. Es wog 665 Femtogramm (also 665×10^{-15} g). Von dieser Messung ausgehend wiegen 10^7 *E. coli*-Bakterien 6,65 µg. Der Hauptbestandteil von Bakterien ist Wasser. Es wird geschätzt, daß die Trockenmasse ca. 20% der Gesamtmasse beträgt. Die Trockenmasse von 10^7 *E. coli* betrüge somit schätzungsweise 1-2µg. Unsere HKL wurden gefriergetrocknet, bestehen also vermutlich im Wesentlichen auch aus Trockenmasse. Zudem sind *E. coli* deutlich größer als Listerien.

Wir liegen daher vermutlich mit den eingesetzten 35 µg Flagellin über dem Gewicht, das 10^7 HKL an Flagellin tragen.

Es ist aber denkbar, daß natürlich vorkommendes Flagellin potenter als rekombinant hergestelltes Flagellin ist. So könnte beispielsweise die räumliche Anordnung als Flagelle vorteilhaft sein. Vielleicht sind aber auch mehrere Komponenten der HKL im Zusammenspiel für die immunmodulatorischen Fähigkeiten verantwortlich.

Da es beim Einsatz von HKL eine im Modell unerwünschte Proliferation gibt, ist klar, daß man die HKL-Dosis nicht beliebig steigern kann. Das Flagellin zeigt hier weniger unerwünschte Wirkungen.

In unserem Modell zeigt sich, daß das rekombinante Flagellin die gleichen suppressiven Fähigkeiten hat wie HKL und in der eingesetzten Dosis den HKL überlegen ist.

6.5. Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen

Nachdem wir also zeigen konnten, daß sich prinzipiell die allergenspezifische T-Zellproliferation durch HKL und Flagellin supprimieren lässt, wollten wir durch Phänotypisierung der Zellen analysieren, ob dies durch die Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt wird.

Ursprünglich hatten wir erwartet, nach erfolgreicher Suppression vermehrt CD25(+)FoxP3(+), ICOS und CTLA-4 exprimierende Zellen vorzufinden. Diese sollten erwartungsgemäß die Zytokine IL10 und TGF- β bilden.

Im Ergebnisteil wurde gezeigt, daß dies so nur bedingt nachweisbar war. Im Folgenden wird auf die einzelnen Ergebnisse eingegangen.

6.5.1. CD25, ICOS und CTLA-4

Der älteste bekannte Marker für regulatorische Zellen ist CD25⁵³.

Wie im einleitenden Kapitel beschrieben, ist CD25 jedoch nicht spezifisch für Treg, sondern wird bei der T-Zell-Aktivierung durch IL2 exprimiert.

In Kapitel 5.4 wurde dargestellt, daß in unserem Modell fast alle proliferierten Zellen CD25 exprimieren. Daher erweist es sich bei uns primär als T-Zell-Aktivierungsmarker.

In Kapitel 5.5.1 wurde die CD25-Expression der Proliferation sowie der Expression von CTLA-4 und ICOS gegenüber gestellt. CTLA-4 wurde nur gering und in ähnlichem Ausmaß in allen Kulturen exprimiert. Ein klarer Trend ließ sich nicht erkennen.

Wie im einleitenden Kapitel beschrieben, führt die Bindung zwischen CD28 und seinem Liganden auf APC zu einer Aktivierung der T-Zelle mit anschließender IL2-Produktion. CTLA-4 ist ein inhibitorischer Gegenspieler zu CD28 und verhindert seine Signalübertragung.

Dabei soll CTLA-4 auch für die regulatorische Funktion von Treg von Bedeutung sein⁵⁶. Somit kann CTLA-4 einerseits als Treg-Marker verwendet werden, und sollte zudem bei Beendigung einer T-Zell-Aktivierung vermehrt exprimiert werden. Daher erwarteten wir bei erfolgreicher Suppression der allergenspezifischen T-Zellproliferation eine ausgeprägte Expression von CTLA-4. Auch wenn im dargestellten Experiment sich bei Allergen plus HKL die stärkste Expression fand, so war dies nicht in allen Experimenten so, und erfüllte damit nicht unsere Erwartungen.

Als Marker für Treg in unserem Modell eignet sich CTLA-4 nicht.

Dies kann wiederum daran liegen, daß CTLA-4 insbesondere bei Beendigung einer Immunantwort exprimiert wird. Denkbar ist, daß wir in unserem Zeitrahmen nur aktive Immunreaktionen beobachten. Auch die Entwicklung von Immuntoleranz ist ein aktiver Prozess. Die Suppression ist damit kein Ende einer Proliferation, sondern eine andere Differenzierung. Das kann der Grund sein, warum wir keine vermehrte CTLA-4-Expression nachweisen können.

ICOS galt früher als treibende Kraft in TH2-Immunantworten⁵⁷. ICOS ist jedoch auch für die Bildung von Anergie, also Immuntoleranz erforderlich, und sogar ein direkter Marker für nTreg. Durch die Aktivierung von ICOS können Treg induziert werden⁵⁸. Daher erwarteten wir, mittels ICOS Rückschlüsse auf Treg machen zu können.

ICOS fördert zudem die Bildung von IFN- γ . Dieses Zytokin wird insbesondere von TH1-Zellen gebildet, beispielsweise im Rahmen einer Immunantwort auf intrazelluläre Krankheitserreger wie Listerien. Auch daher hätten wir bei Zugabe von der Höchstdosis HKL eine maximale ICOS-Expression erwartet.

Wir sahen jedoch, daß die Expression ungefähr mit der Proliferation korrelierte. Die höchste ICOS-Expression sahen wir in der Kultur, die nur eine geringe Suppression durch 10^5 HKL/ml aufwies, jedoch nur unwesentlich höher als in der Kultur, die rege auf Allergen proliferierte. Bei maximaler Suppression durch 10^7 HKL/ml wurde auch die Expression von ICOS deutlich gemindert.

Somit bleibt die Rolle von ICOS in unserem Modell unklar. Die Expression entspricht aber eher der klassischen Wertung als TH2-Marker.

Als Marker für Treg in unserem Modell eignet sich ICOS daher auch nicht.

6.5.2. **FoxP3**

FoxP3 gilt als der spezifische Marker für Treg schlechthin. Daher hatten wir erwartet, nach Suppression mit HKL oder Flagellin vermehrt CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Zellen nachweisen zu können. In Kapitel 5.7 wurden exemplarisch unsere Ergebnisse aus einem Versuch mit HKL und einem Versuch mit Flagellin gezeigt.

Leider konnte auch hier unsere Hypothese nicht klar bestätigt werden.

Im Versuch mit HKL zeigte sich eine klare Korrelation der FoxP3-Expression mit der Proliferation. Dies sahen wir in vielen Versuchen. Auch von anderen Autoren wurde mehrfach berichtet, daß FoxP3 bei der Aktivierung von Effektor-T-Zellen vorübergehend

hochreguliert wird. Es besteht dann kein direkter Zusammenhang zu suppressiven Fähigkeiten^{16 76}. Diese Beobachtung bestätigen wir.

Überraschenderweise sahen wir im gezeigten Versuch mit Flagellin (Kapitel 5.7.2) ein etwas anderes Bild. Wir sahen in fast allen Kulturen mit Flagellin eine ähnlich ausgeprägte FoxP3-Expression von rund 4%. Dabei bestand der Großteil der FoxP3(+) Zellen aus nicht proliferierten CFSE hochpositiven Zellen.

In der Kultur, die nur mit Allergen inkubiert worden war, verteilte sich die FoxP3 Expression zu gleichen Teilen auf nicht proliferierte und proliferierte Zellen, lag jedoch mit 3,3% etwas unterhalb der durch Flagellin bewirkten FoxP3-Expression.

Daraus ließe sich ableiten, daß durch Zugabe von Flagellin Treg induziert wurden.

Eine zweite Beobachtung stört jedoch dieses Bild:

Betrachteten wir nämlich die Korrelation von FoxP3 und der LAP-Expression, so zeigte sich, daß bei uns die meisten TGF- β -produzierenden Zellen FoxP3(-) waren. Das widerspricht dem gängigen Bild von Treg.

Dies kann ein Artefakt der Färbung sein. Wir waren so vorgegangen, daß zuerst die Zelloberflächen mit LAP-Antikörpern gefärbt wurden, und in Folgeschritten die intrazelluläre FoxP3-Färbung durchgeführt wurde. Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellen perforiert werden und „schrumpfen“, was sich gut durchflusszytometrisch im Vorwärtsstreulicht beobachten lässt. Reichlich exprimierte Oberflächenmoleküle, für die es Antikörper mit hoher Affinität gibt, wie CD3 und CD4, lassen sich nach dieser aggressiven Prozedur weiterhin nachweisen. Sensiblere Färbungen wie auch LAP können davon jedoch beeinträchtigt werden. Somit kann es sein, daß die von uns gemessenen FoxP3(+) Zellen entweder im Rahmen der Färbung ihr LAP verloren haben, oder daß auch hier FoxP3 nicht mit dem Vorhandensein von Treg korreliert.

Daher, und aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse mit HKL, können wir auch FoxP3 allein nicht als Marker für Treg in unserem Modell empfehlen.

6.5.3. Zytokinmessungen

Zur Charakterisierung von T-Zellen können die durch sie gebildeten Zytokine genutzt werden.

In dieser Arbeit nicht dargestellt haben wir unsere Versuche Zytokine mittels ELISA in Überständen zu messen. Ein Vorteil hierbei wäre der schonende Umgang mit den Zellen. Wir fanden jedoch, mit Ausnahme von IFN- γ , nur ausgesprochen geringe

Mengen von Zytokinen in den Überständen, die größtenteils im untersten Nachweisbereich der verfügbaren ELISA-Kits lagen. Daher war die verlässliche Bestimmung von Dreifachwerten kaum möglich und relevante Unterschiede zwischen den Kulturen waren nicht nachweisbar.

Deshalb wurde die intrazelluläre Messung von Zytokinen in der Durchflusszytometrie gewählt. Dies ist leider kein schonender Prozess. Vor der erforderlichen Perforation ist eine Stimulation der Zellen zur Zytokinproduktion notwendig.

Bei den Zytokinmessungen lag unser Fokus einerseits auf allen CD4(+) Zellen. Wir untersuchten aber auch die Zytokinproduktion innerhalb der CD25(+) Zellen und fanden hierbei interessante Effekte.

Wie bereits diskutiert, erweist sich CD25 in unseren Versuchen vornehmlich als Aktivierungsmarker. Die meisten Treg gelten jedoch auch als CD25(+). Wir erwarteten daher innerhalb der CD25(+) Zellen Treg zu finden, und überprüften, ob nach Flagellin-Gabe Treg-spezifische Zytokine vermehrt und TH2-spezifische Zytokine vermindert produziert werden.

IL4 und IL10

IL4 ist das klassische TH2-Zytokin. Durch die Stimulation der Zellen mit Allergenextrakt zeigte sich erwartungsgemäß ein Anstieg der IL4-Produktion insgesamt, wobei die CD25(+) Zellen in größerem Ausmaß betroffen waren. Durch Suppression der Proliferation mit Flagellin war die IL4-Produktion wiederum rückläufig. Spannenderweise waren nun aber praktisch nur die CD25(+) Zellen betroffen. Wir sehen also weiterhin eine gewisse IL4-Produktion bei CD25(-) T-Zellen, jedoch in der aktivierten Population einen deutlichen Rückgang.

Die Messung intrazellulärer Zytokine hat technisch bedingt einen gewissen Verlust der Oberflächenfärbungen zur Folge. Da es sich nicht mit unserer bisherigen Erfahrung deckt, daß TH2-Zellen im Rahmen der Immunantwort kein CD25 exprimieren, ist es möglich, daß wir hier eine eigentlich CD25(+) Population messen, von der der CD25-Antikörper nur „abgewaschen“ wurden.

Auf jeden Fall findet die IL4-Expression erwartungsgemäß durch Allergen ihr Maximum und kann durch Flagellin supprimiert werden.

Dies ist ein Beleg, daß Flagellin TH2-Antworten supprimieren kann.

Aufgrund der geringeren Spezifität von IL10 waren hierbei die Ergebnisse nicht so eindeutig. Zusammengefasst sehen wir eine Zunahme der IL10-Produktion durch Allergen. Nach weiterer Zugabe von Flagellin beobachten wir ambivalente Effekte. Bezogen auf den gesamten CD4(+) Zellpool können wir bei 35 µg/ml Flagellin eine weitere Zunahme von IL10 in der CD25(-) Population messen, die bei 3,5 µg/ml nicht mehr nachweisbar war. Bei beiden Konzentrationen sahen wir jedoch einen Rückgang der IL10-Produktion durch die CD25(+) Zellen (bezogen auf alle CD4(+) Zellen).

Anders stellt sich dies jedoch dar, wenn wir nur noch die CD25(+) Zellen beobachten. Durch Lieschgras-Stimulation sehen wir eine leichte Steigerung der IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Population verglichen mit der Kultur ohne Allergen. Diese Aussage ist kritisch zu sehen, da ohne Allergen nur wenige Zellen überhaupt CD25 exprimierten. Interessant ist aber ein weiterer deutlicher Anstieg von IL10 bei 35 µg/ml Flagellin-Dosis, die bei 3,5 µg/ml nun nicht mehr nachweisbar war.

Durch Flagellin-Zugabe bewirken wir demnach absolut eine Abnahme CD25(+)IL10(+) Zellen, wobei innerhalb der CD25(+) Zellen die IL10-Produktion wiederum zunimmt. Dieser scheinbare Widerspruch bedingt sich durch das verminderte Vorkommen CD25(+) Zellen in den Kulturen mit Flagellin.

Diese Ambivalenz der Ergebnisse macht die Deutung sehr schwierig.

IL4 ist das Schlüsselzytokin von TH2-Zellen, wohingegen IL10 von vielen Zellen, unter anderem Treg und TH2-Zellen gebildet wird. Das spiegelt sich in unserem Ergebnis wieder. Durch Flagellin supprimieren wir die TH2-gesteuerte IL4-Produktion klar. Unsere IL10-Messungen sprechen dafür, daß wir zwei gegenläufige Populationen gleichzeitig messen. Da wir unserer Hypothese nach durch Flagellin TH2-Zellen supprimieren, aber Treg induzieren, bildet die TH2-Population in Folge weniger IL10, und die Treg vermehrt.

Die Zunahme der IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Zellen, in der wir auch die Treg vermuten, bei gleichzeitig einer absoluten Abnahme der IL10-Produktion bezogen auf alle CD4(+) Zellen kann ein Hinweis darauf sein, daß Treg induziert wurden. Schließlich bilden Treg nur eine kleine Teilpopulation aller CD4(+) Zellen, verglichen mit ihrem größeren Anteil innerhalb der CD25(+) Zellen.

Da CD25 als Aktivierungsmarker insbesondere im Rahmen einer TH2-Reaktion vermehrt exprimiert wird, wir jedoch den höchsten Anteil IL10(+) Zellen innerhalb der

CD25(+) Zellen in der durch Flagellin supprimierten Kultur finden, ist dies ein Hinweis, daß das IL10 in diesem Falle durch suppressiv wirksame T-Zellen, vermutlich Treg, gebildet wurde.

IFN- γ

Interferon- γ ist das wichtigste Zytokin im Rahmen TH1-dominierter Immunreaktionen. Es wird bei Infektionen mit intrazellulären Erregern (wie Listerien) vermehrt gebildet. Entsprechend erwarteten wir eine Zunahme von IFN- γ in den Zellkulturen mit Flagellin. Dies konnten wir auch beobachten, was wir als Hinweis darauf werten, daß Flagellin *in vitro* ähnliche Immunreaktionen auslösen kann wie Listerien *in vivo*.

Überrascht waren wir jedoch, die intensivste IFN- γ -Produktion bei Inkubation mit Allergen allein zu finden. Es widerspricht unserer Erwartung, daß wir im Rahmen einer deutlichen TH2-Reaktion mit nachvollziehbarer allergenspezifischer Proliferation CD4(+) Zellen und vermehrter IL4-Produktion gleichzeitig eine intensive Produktion eines TH1-Zytokins vorfinden. Insbesondere eines, das bekanntermaßen TH2-Zellen supprimiert.

Wir vermuten, daß durch die rege Proliferation und dadurch bestehende IL2-Stimulation auch IFN- γ -produzierende Zellen immer ungezielt mitstimuliert werden. In der Folge bewirkt eine rege Proliferation auch eine rege IFN- γ -Produktion. Dies kann möglicherweise sogar ein sinnvoller selbstregulatorischer Prozess sein. So könnte hierdurch eine überschießende TH2-Reaktion mittels IFN- γ gedrosselt werden. Im murinen Modell wurde nachgewiesen, daß eine Behandlung mit rekombinantem IFN- γ eine allergisch bedingte hyperreaktive Atemwegsreaktion antagonisieren kann⁹¹.

Dies würde auch dem klassischen TH1/TH2-Paradigma entsprechen, nach dem TH1-Zellen als Gegenspieler der TH2-Zellen galten. Konsequenterweise weiter gedacht, müssten die TH1-Zellen dann jedoch im Falle erfolgreicher Suppression überwiegen, und dann wären hier die höchsten IFN- γ -Mengen zu erwarten gewesen. Dem war jedoch nicht so. Wir sehen daher keinen Beleg für das historische TH1/TH2-Paradigma.

Stock *et al.* hatten im murinen Modell die Induktion eines Treg-Typus beobachtet, der Charakteristika von TH1-Zellen aufwies und daher IFN- γ bildete.

Falls sich in unseren Kulturen der gleiche Treg-Typus bildet, so lässt er sich aufgrund der beschriebenen starken Expression von IFN- γ und CD25 im Rahmen der TH2-Reaktion jedoch nicht nachweisen.

LAP

TGF- β ist ein besonders interessantes Zytokin, da es als Schlüsselzytokin von Treg gilt. Erfreulicherweise ist hier sein Nachweis indirekt über LAP auf der Zelloberfläche möglich.

Entsprechend unserer Hypothese finden wir die intensivste TGF- β -Produktion in den Zellkulturen, die gleichzeitig Allergen und Flagellin erhalten hatten. Bezogen auf alle CD4(+) Zellen sahen wir überraschenderweise jedoch eine fast gleich intensive Produktion des Zytokins bei „Allergen allein“, wie in Kapitel 5.8.4 im *Diagramm „LAP-Expression“* gezeigt wurde. Wir vermuten, daß durch die rege Proliferation auch TGF- β -produzierende Zellen unspezifisch mitstimuliert werden, wie bereits im Kapitel IFN- γ diskutiert wurde.

Wie auch bei IL10 gesehen ändert sich das Bild, wenn man nur noch die CD25(+) Zellen betrachtet.

Wir konnten zeigen, daß durch Flagellin der Anteil LAP-exprimierender Zellen innerhalb dieser Population deutlich zunimmt. Dabei liegt der Prozentsatz bei „Flagellin allein“ zwischen den Werten der beiden eingesetzten Flagellinkonzentrationen in Kombination mit Allergen.

Daraus ließe sich schlussfolgern, daß Flagellin auch in Abwesenheit eines Allergens TGF- β -produzierende Zellen, und damit vielleicht Treg, induzieren kann. Diese könnten dann bei gleichzeitigem Vorhandensein einer allergischen Reaktion suppressiv wirken. Das stellt dann aber auch in Frage, ob die Suppression wiederum allergenspezifisch ist.

Beachtenswert war die gleichzeitige Messung von FoxP3 und LAP, die bereits in Kapitel 5.7 erwähnt wurde. Bei unserer Messung war der Großteil der LAP-exprimierenden Zellen FoxP3(-).

Da wir von FoxP3 als Aktivierungsmarker ausgehen, wäre verständlich, wenn die Masse der Foxp3(+) kein LAP exprimiert. Warum jedoch die LAP(+) Zellen kein FoxP3 exprimieren ist unklar.

Zur Messung von FoxP3 müssen die Zellen perforiert und mehrfach gewaschen werden. Durch diesen Vorgang können oberflächlich gebundene Antikörper wieder verloren gehen. Dies sollte jedoch in allen Zellen gleichmäßig erfolgen und als Erklärung unbefriedigend.

Es ist jedoch denkbar, daß einige Treg nach ihrer Bildung FoxP3 wieder deaktivieren und dennoch weiter TGF- β bilden.

Es kann auch sein, daß wir nur einen Teil der FoxP3(+) Zellen mit der Färbung erfassen. Wir haben die FoxP3-Antikörper stets vorsichtig titriert, um unspezifische Bindung zu vermeiden. Das wäre ein weiterer Grund, FoxP3 in unserem Modell nicht als Treg-Marker zu verwenden.

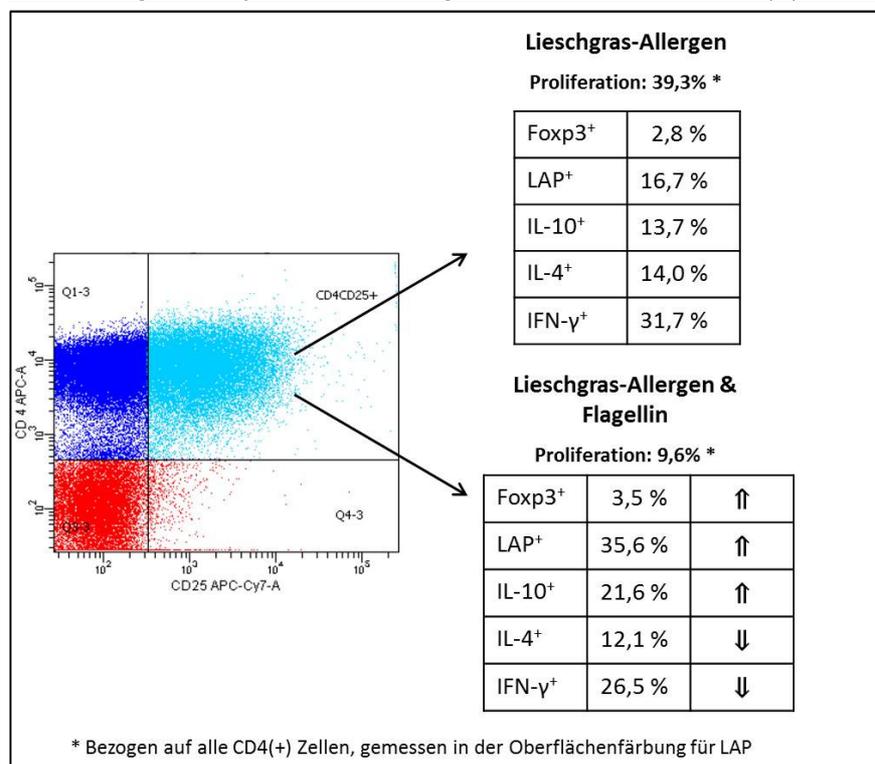
Folgt man den Daten stringent, so hätten wir FoxP3(-) Treg induziert. Treg wie Tr1-Zellen sind beispielsweise Foxp3(-)⁹², können es jedoch aktivieren. Die Existenz von Tr1-Zellen als eigene Population ist allerdings umstritten.

Die von Stock im murinen Modell mit HKL beschriebenen TH1-like Treg exprimieren FoxP3. Es gibt durchaus Ähnlichkeiten zwischen den von Stock beschriebenen TH1-like-Treg und Tr1-Zellen (der Hauptunterschied ist die Produktion von IFN- γ). Es liegt daher im Rahmen des Möglichen, daß wir hier einen ähnlichen Zelltyp gefunden haben.

6.5.1. Zytokine innerhalb der CD25(+) Population

Da wir in der CD25(+) Population Treg vermuten, analysierten wir gezielt die Zytokinproduktion dieser Zellen. Die Abbildung 6.1 fasst die dabei gemessenen Resultate zusammen.

Abbildung 6.1: Zytokinmessungen innerhalb der CD4(+)CD25(+) Zellen



Bei dieser gemeinsamen Darstellung der Zytokine ergibt sich ein eindrucksvoller Effekt. Innerhalb der CD4(+)CD25(+) Population sehen wir, daß durch die gleichzeitige Inkubation mit Lieschgrasallergen und HKL-spezifischem Flagellin die Expression von des Treg-Markers FoxP3 als auch der Treg-spezifischen Zytokine TGF- β und IL10 zunimmt. Im Gegensatz werden die TH1- und TH2-Zytokine IFN- γ und IL4 etwas vermindert gebildet.

In der Population, in der also Treg zu erwarten sind, sehen wir damit eine deutliche Zunahme von Treg-spezifischen Zytokinen, eine Abnahme der TH1- und TH2-typischen Zytokine sowie eine verstärkte Expression des Treg-Markers FoxP3.

Dies korreliert mit Erkenntnissen einer Arbeitsgruppe aus Belgien, die PBMC von Asthmatikern mit PBMC von Nichtasthmatikern verglich. Sie fand zwar die gleiche Menge CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T-Zellen in beiden Gruppen, konnten aber eine verminderte FoxP3-Expression innerhalb der CD4(+)CD25(high) Subpopulation von Asthmatikern ausmachen⁹³.

Geht man also davon aus, daß bei der Arbeit mit PBMC der Nachweis von Treg bei Betrachtung der CD25(+) Population sinnvoll ist, so ist uns in diesem Falle der Nachweis gelungen.

Da bei Messung von LAP dieser Kunstgriff jedoch nicht erforderlich war, schlagen wir im Rahmen unserer Versuche CD4(+)LAP(+) und spezifischer CD4(+)CD25(+)LAP(+) als Treg-Marker vor.

6.6. Apoptose als Mechanismus der Immuntoleranz

In Kapitel 5.9 konnte gezeigt werden, daß HKL das Vorkommen von Apoptose steigern. Besonders deutlich nimmt die Apoptose durch die gleichzeitige Inkubation mit Lieschgras-Allergenextrakt und HKL zu und übersteigt das Ausmaß der allein durch HKL induzierten Apoptose.

Dies verdeutlicht, daß synergistische oder zumindest summatorische Mechanismen zwischen HKL und Allergen zugrunde liegen müssen.

Besonders interessant ist die chronologische Betrachtung der Apoptose. Die Apoptosesteigerung tritt bereits vor Beginn der nachweisbaren T-Zell-Proliferation ein.

Die zuerst einsetzende verstärkte Apoptose führt demnach zu einer Suppression der allergenspezifischen Proliferation.

Da die Apoptose vor der Proliferation beginnt, gehen nicht ausschließlich fertig differenzierte allergenspezifische TH2-Zellen in Apoptose. Vielmehr scheinen die HKL in frühere Prozesse der Allergenprozessierung oder –Präsentation einzugreifen.

Somit ist denkbar, daß die Bildung allergenspezifischer TH2-Zellen behindert wird und stattdessen Selektionsprozesse zur Bildung regulatorischer T-Zellen stattfinden.

Um diese Schlussfolgerung zu stützen untersuchten wir auch das Apoptose-Verhalten CD25hochpositiver gegenüber CD25 niedrigpositiven Zellen. Hätte die Apoptose in CD25^{high} gegenüber CD25_{low} überwogen, so wären wir von einem deutlichen Hinweis auf Selektionsprozesse zur Bildung von Treg ausgegangen. Da wir dies nicht fanden, können wir diese Hypothese leider nicht untermauern.

Denkbar ist aber auch, daß CD25^{high} ein schlechter Marker in unserem hochproliferativen Modell ist, und ein vermehrtes Vorkommen von Treg somit von einer großen Population aktivierter T-Zellen überlagert wird.

6.7. Stärken und Schwächen unseres Modelles

Da die Ergebnisse unserer Arbeit heterogener waren, als wir erwartet hatten, sollen hier die Stärken und Schwächen unseres Modelles gegenübergestellt werden.

6.7.1. Stärken

Wir konnten die bisher nur im murinen Modell bekannten immunmodulatorischen Fähigkeiten von HKL und Flagellin erstmals auf ein humanes Modell übertragen und nachweisen, daß auch hier vor Allergie schützende Mechanismen vermittelt werden können.

Unser Modell leistet damit die folgenden Dinge:

APC nehmen das Lieschgras-Allergen auf und prozessieren es erfolgreich. T-Zellen reagieren darauf in adäquater Weise. TH2-Zellen bilden typische Zytokine. Es kommt zu einer allergenspezifischen Proliferation.

Eine Suppression dieser allergenspezifischen T-Zellproliferation ist wiederum durch HKL und Flagellin möglich.

Dieser sichtbaren Suppression vorausgehend lässt sich eine gesteigerte Apoptose CD4(+) Zellen nachweisen. Bei erfolgter Suppression kommt es zu einer Vermehrung TGF- β -produzierender T-Zellen.

Innerhalb der CD25(+) Zellen kommt es bei Suppression zu einer Zunahme der Expression von FoxP3 und des Treg-typischen Zytokins IL10.

6.7.2. Schwächen

Das Schwanken der allergenspezifischen T-Zell-Proliferation bei Nutzung von PBMC ist ein bekanntes Problem. Es findet sich auch bei unserem Modell wieder.

Zusätzlich zeigte sich, daß HKL und in geringerem Ausmaß auch Flagellin einen eigenen Proliferationsreiz darstellen. Das Ausmaß dieser Proliferation schwankte, ähnlich wie das Ausmaß der allergenspezifischen Proliferation. Die Suppression der allergenspezifischen Proliferation gelang aber nur, wenn die durch HKL oder rFlaA bedingte Proliferation gering blieb. Dies können wir bislang nicht aktiv beeinflussen.

Ein zweites Problem ist die lange Dauer der Experimente. Wir benötigen mindestens 8 Tage, um eine Proliferation zu beobachten. Mit der Dauer der Experimente nimmt jedoch auch das Ausmaß an unspezifischen Reaktionen zu. Nach unserer Erfahrung können wir jedoch in einem Zeitfenster von 8 bis maximal 11 Tagen noch zuverlässige Informationen sammeln.

Schwierig gestaltete sich auch die Interpretation unserer durchflusszytometrischen Ergebnisse.

Wir verglichen in der Regel Kulturen ohne Stimulanzen mit allergenhaltigen Kulturen sowie Kulturen mit Allergen und HKL oder Flagellin. Wohingegen ohne Allergen die PBMC kaum proliferierten, proliferierten die anderen Kulturen teils sehr rege.

Da jedoch die meisten Treg-Marker auch bei Aktivierung von T-Zellen exprimiert werden, lassen sich Treg in proliferierenden Populationen nur schwer nachweisen.

Zugespielt beschrieben zeigt sich der folgende Effekt: Durch Proliferation erhöht sich der Anteil CD25(+) Zellen. Halbiert sich nun im Rahmen erfolgreicher Suppression der Anteil CD25(+) Zellen, so muss sich der Anteil FoxP3(+) Zellen im CD25(+) Pool verdoppeln, um bezogen auf den Gesamtpool gleich groß zu bleiben. Je erfolgreicher wir also supprimieren, desto mehr muss sich der Anteil FoxP3(+) Zellen erhöhen, um überhaupt bemerkt zu werden. Daher ist es sinnvoll, gezielt die Zusammensetzung der CD25(+) Population zu betrachten, um dieses mathematische Problem zu umgehen. Als wir dies taten, sahen wir, wie beschrieben auch Hinweise auf die Induktion von Treg.

Bedauerlich ist der Mangel wirklich spezifischer Marker für Treg. So lange es diese nicht gibt, werden sich Treg in unserem Modell auch nicht sicher nachweisen lassen.

6.8. Unterschiede zu den Versuchen im murinen Modell

Stock *et al.* induzierten in ihren murinen Experimenten mit HKL eine Art Treg, die IL10 und IFN- γ produzierte, T-bet, FoxP3 und große Mengen ICOS exprimierte. Sie nannten diesen Typus „TH1-like Treg“²¹.

Stock konnte in seinen Versuchen mit einem hochspezifischen Modell arbeiten. So verwendete er BALB/c Mäuse, die weitgehend miteinander genetisch identisch sind. Diese Mäuse wurden mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und die Effekte später mittels adoptiv übertragenen DO11.10 CD4(+) Zellen gemessen, die ausschließlich gegen OVA spezifisch sind. Diese DO11.10 Zellen stammen wiederum von Mäusen, die keine CD25(+) Treg bilden.

Die HKL im murinen Modell waren wiederum zum Zeitpunkt der Immunisierung gegeben worden. Die Mäuse können im Labor weitgehend von Umwelteinflüssen abgeschirmt werden.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied beider Versuchsarten liegt darin, daß das murine Modell *in vivo* arbeiten konnte, wohingegen wir die Zellen *in vitro* stimuliert haben.

In unserem Fall liegt auch die Sensibilisierung gegen Allergen in der Vergangenheit. Wir versuchten eine bereits bestehende Allergie *in vitro* zu kurieren, wogegen im murinen Modell die Allergieentstehung verhindert wurde

Unsere Probanden erleben tagtäglich eine Vielzahl von Immunreaktionen. Die PBMC dürften also bei jeder Blutentnahme Zytokine und Zellen unterschiedlicher Zusammensetzung und Aktivierung enthalten, die teilweise bereits dabei sind auf unterschiedliche Ereignisse zu reagieren.

Um dies zumindest teilweise auszublenden, wurde daher in jedem Versuch eine Kultur ohne Allergen und ohne HKL oder FlaA mitgeführt, damit spontane Proliferationen nicht erfasst werden. Dies kam in der Regel auch nicht vor.

Da die von Stock induzierten Treg Charakteristika von TH1-Zellen aufwiesen, untersuchten auch wir die Expression von T-bet in unserem Modell. Leider waren zum Zeitpunkt der Experimente nur Antikörper gegen T-bet im Rahmen hochpolarisierter Bedingungen erhältlich. Unter unseren Versuchsbedingungen ließen sich damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen zeigen.

Man kann hinterfragen, ob die bei Versuchen mit humanen PBMC nachgewiesenen Treg wirklich durch die Versuche induziert wurden oder bereits seit der Blutentnahme vorhanden waren. Ob wir also nur einen aktuellen Immunstatus der Probanden unabhängig von unseren Versuchen prüfen.

Das können wir klar verneinen. Wir haben in jedem Versuch Kulturen mit ausschließlich Allergen mitgeführt. Hätten die HKL oder das Flagellin keinen immunmodulatorischen Effekt, so hätte es auch keinen Unterschied zu den Kulturen mit Allergen allein geben dürfen.

6.9. Ausblick

In zukünftigen Versuchen sollte überprüft werden, ob die durch uns induzierten Treg wirklich allergenspezifisch wirken. Dazu könnte man nach erfolgreicher Suppression die (vermeintlichen) Treg den Kulturen mittels FACS-Sorting oder MACS entnehmen.

Diese Treg müssten zusammen mit neuen PBMC und Allergen kultiviert werden. Dabei sollte es sich um Kulturen mit zwei unterschiedlichen Allergenen handeln. Einerseits um Kulturen mit dem gleichen Allergen, unter dem die Treg gebildet wurden und andererseits ein zweites Allergen, gegen das der Proband gleichermaßen allergisch gewesen sein muss.

Wenn die Treg eine erneute allergenspezifische Proliferation supprimieren könnten aber beim zweiten Allergen weniger wirksam wären, so wären sie allergenspezifisch.

Es wäre auch sehr spannend zu prüfen, ob das von der Arbeitsgruppe Scheurer und Schülke entwickelte Fusionsprotein⁵¹ durch seine unmittelbare Nähe von Allergen und Immunadjuvans der Wirkung von Flagellin allein überlegen ist.

Bezüglich der Apoptose wissen wir noch nicht, ob die von uns nachgewiesene gesteigerte Apoptose kausal für die Suppression verantwortlich ist und welche Zellen genau in Apoptose gehen.

Wir haben mit unseren Versuchen viele Fragen aufgeworfen. Aus unserer Arbeit ergeben sich jedoch Hinweise, daß eine kurative Behandlung von Allergien mittels Adjuvanzien in Zukunft möglich sein kann.

Wir hoffen damit einen kleinen Teil zur Erforschung der Entstehung von Immuntoleranz beigetragen zu haben.

7. Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen sind ein weit verbreitetes Problem, das global an Bedeutung zunimmt. Auf zellulärer Ebene beruhen diese Erkrankungen auf einer (pathologischen) Immunantwort von T-Zellen gegen Antigene, die für den Organismus keine Bedrohung darstellen. Dabei findet eine T-Zelldifferenzierung zu allergenspezifischen TH2-Effektorzellen statt, die in B-Zellen eine spezifische IgE-Produktion bewirken. Diese Immunglobuline sind spezifisch gegen das auslösende Allergen gerichtet.

Spezifische regulatorische T-Zellen können allergische Immunantworten supprimieren.

Unsere Hypothese war, dass HKL in Anwesenheit von Allergenen bei Allergikern die Bildung regulatorischer T-Zellen induzieren. Dabei vermuteten wir, dass Flagellin ein Schlüsselprotein der Listerien bei der Vermittlung dieses Effektes darstellt.

Wir haben ein humanes Zellkulturmodell entwickelt, mit dem es möglich ist, in PBMC-Kulturen von Allergikern durch Zugabe von Allergenextrakt eine T-Zell-Proliferation zu bewirken. Diese Proliferation bleibt in PBMC-Kulturen von Nicht-Allergikern aus. Daraus schließen wir, dass die T-Zell-Proliferation allergenspezifisch ist. Gemäß unserer Hypothese erwarteten wir die Proliferation durch gleichzeitige Zugabe von HKL oder dem HKL-spezifischen Protein Flagellin wiederum supprimieren zu können.

Wir haben gezeigt, daß diese aus dem murinen Modell bekannte Suppression auch in einem humanen Modell *in vitro* möglich ist.

Wir konnten nachweisen, daß es durch HKL zu einer gesteigerten Apoptose der CD4(+) Zellen kommt, die der allergenspezifischen Proliferation vorausgeht. Wir vermuten daher, daß selektive Prozesse stattfinden, die eine Proliferation von TH2-Zellen verhindern. Wir fanden Hinweise, daß es hierbei zur Bildung von Treg kommt.

Bei Einsatz von listerienspezifischem Flagellin zeigte sich eine geringere Neigung der T-Zellen unspezifisch zu proliferieren, was in unserem Modell einen großen Vorteil gegenüber HKL darstellt.

Der Nachweis von Treg gestaltete sich jedoch schwierig, da die meisten Treg-Marker auch Aktivierungsmarker sind und wir durch Allergen eine ausgeprägte T-Zellaktivierung bewirken.

Als guter Marker erwies sich LAP. Damit konnte gezeigt werden, daß es im Rahmen der durch Flagellin bewirkten Suppression der allergenspezifischen Proliferation zu einer

Vermehrung TGF- β produzierender Zellen kommt. Da TGF- β im Wesentlichen von Treg gebildet wird, sehen wir hierin einen direkten Beleg für die Induktion von Treg.

Bei alleiniger Betrachtung der CD4(+)CD25(+) Population konnten wir auch eine Zunahme der IL10-Produktion sowie auch der FoxP3-Expression und eine Abnahme der Produktion der TH1-und TH2-typischen Zytokine IFN- γ und IL4 nachweisen. Wir sehen dies als Beleg, daß es innerhalb der (durch Aktivierung bedingt großen) CD25(+) Population einen Wandel hin zu einem vermehrten Anteil von Treg gegeben hat.

Ein Großteil der LAP-exprimierenden Zellen war FoxP3(-). Das kann dafür sprechen, daß der Tr1-Subtyp von Treg induziert worden ist. Dies widerspricht jedoch dem Fund der vermehrten FoxP3-Expression in der CD25(+) Population, was auf eher klassische iTreg hindeutet.

Bis spezifischere Treg-Marker zur Verfügung stehen werden wir die Frage nach dem Treg-Subtypus nicht beantworten können.

Wir konnten damit erstmals die aus Tierexperimenten bekannten immunmodulatorischen Fähigkeiten von HKL und HKL-spezifischem Flagellin auf ein humanes Modell übertragen. Wir sehen in ihnen potentielle Kandidaten für einen kausalen Therapieansatz von Allergien.

8. Abkürzungsverzeichnis

| <i>Abkürzung</i> | Bedeutung |
|------------------|--|
| A5 | Annexin-V |
| AHR | hyperreaktive Atemwegsreaktion |
| AIM-V | ein Zellkulturmedium |
| cDC | konventionelle dendritische Zelle, Synonym MDC |
| CR4 | Komplementrezeptor 4 |
| DC | dendritische Zelle |
| DMSO | Dimethylsulfoxid, ein organisches Lösungsmittel |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| HKL | heat-killed <i>Listeria monocytogenes</i> |
| IL | Interleukin, Bsp. IL2 für Interleukin-2 |
| IFN | Interferon |
| iTreg | Induzierte regulatorische T-Zelle |
| LAP | latency associated peptide |
| LM | <i>Listeria monozytogenes</i> |
| MDC | myeloide dendritische Zelle |
| MHC | major histocompatibility complex |
| nTreg | Natürliche regulatorische T-Zelle |
| PCD | programmed cell death, programmierter Zelltod |
| PDC | plasmazytoide dendritische Zelle |
| RPMI-1640 | ein Zellkulturmedium |
| PMT | Photomultipliertube |
| TCR | T cell receptor / T-Zell-Rezeptor |
| TGF | transforming growth factor |
| TH1 / TH2 | T-Helfer-Zelle Typ 1 / Typ 2 |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| (+) | positiv, bspw. CD3(+) für eine CD3 exprimierende Zelle |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |

9. Abbildungsverzeichnis / Tabellen

9.1. Abbildungen

| Abbildung | Seite |
|---|--------------|
| Abbildung 2.1: Überblick über das Immunsystem | 8 |
| Abbildung 2.2: CD4(+) T-Zellen | 10 |
| Abbildung 2.3: Allergische Reaktion Typ 1 | 19 |
| Abbildung 4.1: Prinzip der CFSE-Färbung | 47 |
| Abbildung 4.2: Apoptose-Nachweis mittels Annexin V | 49 |
| Abbildung 4.3: PBMC im FSC gegen SSC | 53 |
| Abbildung 4.4: Alle events mit CD3 gegen CD4 | 53 |
| Abbildung 4.5: CD3(+)CD4(+) im FSC gegen SSC | 54 |
| Abbildung 5.1: T-Zell-Proliferation des Nichtallergikers ohne Allergen | 56 |
| Abbildung 5.2: Nachweis der Allergenspezifität der Proliferation | 58 |
| Abbildung 5.3: Vergleich der Allergenextrakte | 59 |
| Abbildung 5.4: Proliferation eines Nichtallergikers im zeitlichen Verlauf | 60 |
| Abbildung 5.5: Proliferation eines Allergikers im zeitlichen Verlauf | 61 |
| Abbildung 5.6: Gegenüberstellung der Proliferation Tag 6 und Tag 8 | 62 |
| Abbildung 5.7: CD25 und beginnende Proliferation an Tag 6 | 63 |
| Abbildung 5.8: CD25 und beginnende Proliferation an Tag 8 | 64 |
| Abbildung 5.9: Proliferation CD3(+)CD4(+) Zellen ohne Lieschgras- Allergen und HKL | 65 |
| Abbildung 5.10: Suppression der lieschgrasspezifischen Proliferation durch HKL | 65 |
| Abbildung 5.11: ICOS- und CTLA-4- Expression | 66 |
| Abbildung 5.12: Suppression durch Flagellin (Tag 9) | 67 |
| Abbildung 5.13: Zusammenhang von FoxP3-Expression und Proliferation | 69 |
| Abbildung 5.14: FoxP3 und Proliferation / Flagellin | 69 |
| Abbildung 5.15: FoxP3- und CD25-Expression / Flagellin | 70 |
| Abbildung 5.16: FoxP3- und LAP-Expression / Flagellin | 71 |
| Abbildung 5.17: IL4-Produktion und CD25-Expression | 72 |
| Abbildung 5.18: IL4-positive Zellen | 72 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 5.19: IL10-Produktion und CD25-Expression | 74 |
| Abbildung 5.20: IL10-Produktion innerhalb der CD25(+) Zellen | 74 |
| Abbildung 5.21: IFN- γ -Produktion und CD25-Expression | 75 |
| Abbildung 5.22: IFN- γ -Produktion innerhalb der CD4(+) und CD4(+)CD25(+) Zellen | 76 |
| Abbildung 5.23: LAP-Expression | 77 |
| Abbildung 5.24: LAP-Expression, dot plots und Histogramme | 78 |
| Abbildung 5.25: LAP-Expression in parentalen und proliferierten CD4(+)Zellen | 79 |
| Abbildung 5.26: LAP-Expression in parentalen und proliferierten CD25(+)Zellen | 80 |
| Abbildung 5.27: Apoptose CD4(+) mit und ohne HKL | 81 |
| Abbildung 5.28: Apoptose CD4(+) mit und ohne HKL | 82 |
| Abbildung 5.29: Methodik Apoptose in CD4(+)CD25(+)high versus Apoptose CD4(+)CD25(+)low | 84 |
| Abbildung 5.30: Apoptose CD4(+)CD25(+)high gegenüber CD4(+)CD25(+)low | 84 |
| Abbildung 6.1: Zytokinmessungen innerhalb der CD4(+)CD25(+) Zellen | 102 |

9.2. Tabellen

| Tabelle | Seite |
|---|--------------|
| Tabelle 2.1: T-Helfer-Zell-Subtypen | 15 |
| Tabelle 4.1: Geräte | 36 |
| Tabelle 4.2: Verbrauchsmaterialien | 37 |
| Tabelle 4.3: Verwendete Software | 37 |
| Tabelle 4.4: verwendete Lösungen | 38 |
| Tabelle 4.5: konjugierte Antikörper und Färbungen für die Durchflusszytometrie | 39 |
| Tabelle 4.6: Allergenextrakte | 40 |
| Tabelle 4.7: HKL und Flagellin | 40 |
| Tabelle 4.8: Probanden | 41 |
| Tabelle 4.9: Laser und Filter BD FACSCanto II | 45 |

10. Literaturverzeichnis

1. Lotvall J, Ekerljung L, Ronmark EP, Wennergren G, Linden A, Ronmark E, et al. West Sweden Asthma Study: prevalence trends over the last 18 years argues no recent increase in asthma. *Respir Res* 2009;10:94.
2. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351(9111):1225-32.
3. Schlaud M, Atzpodien K, Thierfelder W. [Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2007;50(5-6):701-10.
4. Weinberg EG. Urbanization and childhood asthma: an African perspective. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(2 Pt 1):224-31.
5. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* 2009;129(7):1628-42.
6. Murphy KP, Mowat A. *Janeway's Immunobiology*. 8. ed. ed. London [u.a.]: Garland Science, 2012.
7. Male DK. *Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006.
8. Sack U TA, Rothe G. *Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: S. Karger-Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, 2007.
9. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 2009;126(2):177-85.
10. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112(5):1557-69.
11. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009;70(4):326-36.
12. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 2009;10(7):689-95.
13. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):13031-6.
14. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J* 2012;26(6):2253-76.
15. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science, 2008.
16. Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol* 2008;38(4):925-7.
17. Verbsky JW. Therapeutic use of T regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(3):252-8.
18. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, Nomura T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;305:51-66.
19. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126(2):375-87.
20. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30(5):626-35.
21. 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.
22. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21(10):1105-11.

23. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1353-62.
24. Wang JC, Kobie JJ, Zhang L, Cochran M, Mosmann TR, Ritchlin CT, et al. An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J Immunol Methods* 2009;341(1-2):106-16.
25. Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):503-11.
26. Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo IB, Halin C, Cheng G, van der Velden AW, et al. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6(10):1029-37.
27. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173(7):4433-42.
28. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007;204(1):105-15.
29. Liu P, Li J, Yang X, Shen Y, Zhu Y, Wang S, et al. Helminth infection inhibits airway allergic reaction and dendritic cells are involved in the modulation process. *Parasite Immunol* 2010;32(1):57-66.
30. Lüllmann H. *Pharmakologie und Toxikologie*, 2001.
31. Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 2007;39(6):440-56.
32. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80(3 Pt 1):225-35.
33. Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11(2):139-45.
34. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299(6710):1259-60.
35. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):969-77; quiz 78.
36. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* 2007;212(6):433-9.
37. Braun-Fahrlander C, von Mutius E. Can farm milk consumption prevent allergic diseases? *Clin Exp Allergy* 2011;41(1):29-35.
38. Roussel S, Sudre B, Reboux G, Waser M, Buchele G, Vacheyrou M, et al. Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: A nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environ Res* 2011.
39. Dittrich AM, Erbacher A, Specht S, Diesner F, Krokowski M, Avagyan A, et al. Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 2008;180(3):1792-9.
40. Flohr C, Quinnell RJ, Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2009;39(1):20-32.
41. Frick OL, Teuber SS, Buchanan BB, Morigasaki S, Umetsu DT. Allergen immunotherapy with heat-killed *Listeria monocytogenes* alleviates peanut and food-induced anaphylaxis in dogs. *Allergy* 2005;60(2):243-50.
42. Burnet FM, Fenner F. *The production of antibodies*. 2d ed. Melbourne,: Macmillan, 1949.
43. Zhang H, Kong H, Zeng X, Guo L, Sun X, He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med* 2014;12:125.

44. Kamtsiuris P, LM. Überblick über Kennzahlen und Charakteristika des Kinder- und Jugendgesundheits surveys. Berlin: Robert Koch-Institut, Seestr. 10, 13353 Berlin, 2006.
45. Freitag NE, Port GC, Miner MD. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):623-8.
46. Werber DD. Ausbruch von Listeriose in Deutschland und Österreich - Update, 2010.
47. Todesfälle durch Listeriose in Dänemark: <http://www.aerzteblatt.de/>, 2014.
48. Hansen G, Yeung VP, Berry G, Umetsu DT, DeKruyff RH. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18. *J Immunol* 2000;164(1):223-30.
49. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011;25(6):491-502.
50. Berg Jeremy M. *Biochemie*. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl., 2007.
51. Schulke S, Burggraf M, Waibler Z, Wangorsch A, Wolfheimer S, Kalinke U, et al. A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(6):1340-48 e12.
52. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38(1):13-25.
53. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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* 1995;155(3):1151-64.
54. Tai X, Van Laethem F, Sharpe AH, Singer A. Induction of autoimmune disease in CTLA-4-/- mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(34):13756-61.
55. Magott-Procelewska M. Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells. *Ann Transplant* 2004;9(3):13-8.
56. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;322(5899):271-5.
57. Sperling AI, Bluestone JA. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol* 2001;2(7):573-4.
58. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002;8(9):1024-32.
59. Galicia G, Kasran A, Uyttenhove C, De Swert K, Van Snick J, Ceuppens JL. ICOS deficiency results in exacerbated IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol* 2009;29(4):426-33.
60. Tuettenberg A, Huter E, Hubo M, Horn J, Knop J, Grimbacher B, et al. The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 2009;182(6):3349-56.
61. Savelkoul HF, van Ommen R. Role of IL-4 in persistent IgE formation. *Eur Respir J Suppl* 1996;22:67s-71s.
62. O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol* 2009;10(9):929-32.
63. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30(5):646-55.
64. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev* 2008;226:41-56.

65. Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, Young RA, et al. The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(42):17876-81.
66. Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol* 2011;707:3-17.
67. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609):1057-61.
68. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.
69. Hannehalli S, Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* 2009;10(4):233-40.
70. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004;172(9):5149-53.
71. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 2007;27(5):786-800.
72. Huter EN, Puskosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM. TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol* 2008;38(7):1814-21.
73. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009;114(18):3727-35.
74. Dorsey MJ, Petrovic A, Morrow MR, Dishaw LJ, Sleasman JW. FOXP3 expression following bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Immunol Res* 2009;44(1-3):179-84.
75. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(10):5986-93.
76. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007;19(4):345-54.
77. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(8):589-98.
78. Lecoeur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* 2002;265(1-2):81-96.
79. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2941-53.
80. Hughes D, Mehmet H. *Cell proliferation & apoptosis*. Oxford: BIOS Scientific, 2003.
81. Schulke S, Waibler Z, Mende MS, Zoccatelli G, Vieths S, Toda M, et al. Fusion protein of TLR5-ligand and allergen potentiates activation and IL-10 secretion in murine myeloid DC. *Mol Immunol* 2010;48(1-3):341-50.
82. Inui K, Oreffo RO, Triffitt JT. Effects of beta mercaptoethanol on the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Cell Biol Int* 1997;21(7):419-25.
83. Becton DaC. BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, May 2006:158.
84. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999;77(6):499-508.
85. Parish CR, Glidden MH, Quah BJ, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol* 2009;Chapter 4:Unit4 9.

86. Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan Y. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;37(6):379-85.
87. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2):107-24.
88. Pichler WJ. [The significance of Fc-IgG and Fc-IgM receptors on human T-lymphocytes (author's transl)]. *Klin Wochenschr* 1981;59(3):99-109.
89. Rimaniol AC, Garcia G, Till SJ, Capel F, Gras G, Balabanian K, et al. Evaluation of CD4+ T cells proliferating to grass pollen in seasonal allergic subjects by flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2003;132(1):76-80.
90. Ilic BC, H. G.; Krylov, S.; Senaratne, W.; Ober, C.; Neuzil, P. Attogram detection using nanoelectromechanical oscillators. *Journal of Applied Physics* 2004;95(7):3694-703.
91. Yoshida M, Leigh R, Matsumoto K, Wattie J, Ellis R, O'Byrne PM, et al. Effect of interferon-gamma on allergic airway responses in interferon-gamma-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(4):451-6.
92. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007;4(4):269-75.
93. Provoost S, Maes T, van Durme YM, Gevaert P, Bachert C, Schmidt-Weber CB, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 2009;64(10):1539-46.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hendrik Wiesner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Induktion einer spezifischen Immuntoleranz durch hitzeinaktivierte *Listeriae*
monozytogenes und Flagellin

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

keine

Unterschrift des Doktoranden

12. Curriculum Vitae

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

13. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer, Prof. Dr. Philippe Stock für die vielen Gespräche, Ratschläge und Hilfe bei der Planung der Experimente bedanken. Auch für die Möglichkeit des freien Arbeitens und Gestaltens der Versuche bin ich ihm sehr dankbar, insbesondere aber auch für seine Geduld.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden in enger Zusammenarbeit in unserer kleinen Arbeitsgruppe geplant und durchgeführt. Mein ausdrücklicher Dank gilt daher auch Viola Kohlrutz, die mich in die verwendeten Methoden eingewiesen und bei den Versuchen eng mit mir zusammengearbeitet hat.

Im Weiteren unterstützt haben mich Loreen Ehrlich, Christine Seib und Helmut-Alexander Meyer. Auch bei diesen möchte ich mich hiermit bedanken!

Bei Stefan Scheurer und Stefan Schülke bedanke ich mich für das von ihnen hergestellte Flagellin, das sie mir unentgeltlich zur Verfügung gestellt haben.

Bei Professor Fiebig möchte ich mich ebenso für das von ihm zur Verfügung gestellte Wiesenlieschgras-Extrakt bedanken, das bei den meisten Versuchen zum Einsatz kam.

Jenseits des Fachlichen gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Frau und meinen Kindern, die mir sehr geduldig immer wieder Freiräume zum Arbeiten geschaffen und mich motiviert haben - und vor allem immer da waren.