

# **Untersuchung der molekularen Mechanismen der T-Zell Modulation bei der Therapie mit gering dosiertem Cyclosporin A in Patienten mit atopischer Dermatitis**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CLAUDIA BRANDT  
aus Zeitz

2011

Die Arbeit wurde vom 01.10.2005 bis 20.07.2011 am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ria Baumgrass angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: PD Dr. Ria Baumgrass

Disputation am 18.11.2011

Für Moritz.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Grundlagen der T-Zellimmunologie .....	1
1.2	Zentrale und periphere Toleranz .....	2
1.2.1	Charakteristika der Treg-Zellen .....	3
1.2.2	Wirkmechanismen der Treg-Zellen.....	4
1.2.3	Induktion und Expansion von Treg-Zellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	5
1.3	Differenzierung von Th-Zellen in der Peripherie .....	6
1.4	Bedeutung des IL-2 für das Immunsystem .....	9
1.5	Die Aktivierung und Signalweiterleitung in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	9
1.5.1	Initiation der TZR abhängigen Signalkaskade .....	10
1.5.2	Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT .....	12
1.5.3	T-Zell Stimulation <i>in vitro</i> .....	13
1.6	CsA inhibiert die CaN/NFAT abhängige Signaltransduktion .....	14
1.7	Atopische Dermatitis .....	15
1.7.1	Epidemiologie.....	16
1.7.2	Diagnostik .....	16
1.7.3	Ätiologie .....	17
1.7.4	Pathogenese .....	18
1.7.5	Therapieformen.....	21
1.7.6	CsA in der AD Therapie .....	22
1.8	Zielstellung der Arbeit.....	24
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>25</b>
2.1	Chemikalien .....	25
2.2	Antikörper.....	25
2.3	Puffer und Medien .....	26
2.4	Verbrauchsmaterialien .....	27
2.5	Geräte .....	27
2.6	Analyse Software .....	27

2.7	Biologisches Material .....	28
2.7.1	Buffy Coats .....	28
2.7.2	Vollblutproben der Studienteilnehmer.....	28
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Isolation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut.....	29
3.1.1	Isolation humaner mononukleärer Zellen.....	29
3.1.2	Magnetische Zellsortierung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	29
3.2	Zellzahlbestimmung .....	30
3.2.1	Neubauerzählkammer .....	30
3.2.2	Zellzahlbestimmung mittels CASY.....	30
3.2.3	TruCOUNT Technologie.....	31
3.3	Durchflusszytometrie.....	31
3.3.1	Färbung auf Oberflächenmarker.....	32
3.3.2	Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung von Treg- und Teff-Zellen .....	32
3.3.3	Intrazelluläre Färbung .....	33
3.3.3.1	Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 in isolierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	33
3.3.3.2	Färbung von NFATc1, IL-2 und CD3 in Vollblutproben.....	33
3.3.4	Intrazelluläre Färbung mit PJ und DAPI.....	34
3.3.5	Proliferationsfärbung isolierter Zellen mit CFSE und PKH26 .....	34
3.4	Zellkultivierung und Stimulation .....	35
3.4.1	PMA/Ionomycin Stimulation in Vollblutproben .....	36
3.4.2	Anti CD3/CD28 Antikörper Stimulation isolierter Zellen .....	36
3.4.3	SEB Stimulation isolierter T-Zellen .....	37
3.5	Suppressionsassay .....	37
3.6	Statistik .....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
4.1	Etablierung eines Testsystems für die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA in Vollblutproben.....	38
4.1.1	Optimierung der Stimulationsbedingungen für Vollblutproben .....	38
4.1.2	Bestimmung der CsA Empfindlichkeit des Vollbluttestsystems .....	40
4.1.3	Charakterisierung des Vollbluttestsystems.....	41
4.2	Auswirkungen der CsA Therapie auf die Population der Treg-Zellen und die T-Zell Aktivität in AD Patienten .....	43
4.2.1	Gering dosiertes CsA verbessert die klinischen Symptome.....	43
4.2.2	Die T-Zell Aktivität wird durch gering dosiertes CsA partiell inhibiert .....	44
4.2.3	AD Patienten und Kontrollspender weisen äquivalente Zellzahlen peripherer CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen auf .....	47

4.2.4	Die Population der potenziell in die Haut einwandernden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist im peripheren Blut der AD Patienten erhöht .....	49
4.2.5	Der Einfluss von CsA auf die Population der Treg-Zellen .....	50
4.2.5.1	Die CD25 und CD127 Expression der Treg-Zellen wird nicht durch CsA beeinflusst .....	51
4.2.5.2	AD Patienten weisen im peripheren Blut eine erhöhte Anzahl an potenziell in die Haut einwandernden Treg-Zellen auf .....	53
4.2.5.3	Die Treg-Zellen der AD Patienten sind funktionell .....	53
4.2.5.4	Die Therapie mit gering dosiertem CsA führt zu einer vergrößerten Treg-Zell Population .....	55
4.2.6	Nach Absetzen der CsA Therapie bleibt die Anzahl der Treg-Zellen über den untersuchten Zeitraum von acht Wochen stabil .....	58
4.3	Differenzielle Wirkungen von CsA auf Treg- und Teff-Zellen <i>in vitro</i> .....	59
4.3.1	CFSE und PKH26 haben keinen voneinander abweichenden Einfluss auf die Proliferation .....	60
4.3.2	Treg-Zellen proliferieren bei geringen CsA Konzentrationen stärker als Teff-Zellen .....	61
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
5.1	Die T-Zell Aktivierung wird durch gering dosiertes CsA herabgesetzt .....	64
5.1.1	Die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA ist essentiell für die Überwachung der CsA Therapie .....	65
5.1.1.1	Die Verwendung von Vollblutproben ist für die Überwachung der CsA Therapie von Vorteil .....	65
5.1.1.2	Die Überwachung der CsA Pharmakodynamik kann durch spezifische und unspezifische Testsysteme erfolgen .....	66
5.1.1.3	Das etablierte Testsystem ermöglicht die dosisabhängige Bestimmung des biologisch aktiven CsA im Vollblut .....	67
5.1.2	Gering dosiertes CsA führt zu einer partiellen Inhibierung der IL-2 Zytokin Expression .....	68
5.1.3	Gering dosiertes CsA beeinflusst nicht die Frequenz der potenziell in die Haut einwandernden T-Zellen im peripheren Blut .....	70
5.2	Die Population der Treg-Zellen wird durch gering dosiertes CsA moduliert .....	71
5.2.1	Gering dosiertes CsA führt <i>in vivo</i> zu einer Erhöhung der Treg-Zell Zahlen .....	71
5.2.2	Eine CsA abhängige Vergrößerung der Treg-Zell Population kann durch Induktion und/oder Expansion der Treg-Zellen erfolgen .....	74
5.3	Gering dosiertes CsA hat einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der AD Patienten .....	76
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	<b>81</b>

---

<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>97</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Wirkmechanismen der Treg-Zellen.....	5
Abb. 1.2	Differenzierung der Th-Zellen in der Peripherie.....	7
Abb. 1.3	Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen.....	11
Abb. 1.4	Der CsA/CyP Komplex inhibiert die CaN abhängige Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen.....	15
Abb. 1.5	Th-Zell vermittelte AD Pathogenese.....	19
Abb. 1.6	Die Treg-Zell vermittelte Suppression und Regulierung verschiedener AD relevanter Zelltypen.....	21
Abb. 1.7	Stufentherapie bei AD Patienten.....	22
Abb. 4.1	Durchflußzytometrische Messung der NFATc1 und IL-2 Expression in CD3 <sup>+</sup> T-Zellen stimulierter Vollblutproben.....	39
Abb. 4.2	Die <i>ex vivo</i> Behandlung von Vollblutproben mit CsA führt zur Reduzierung der IL-2 und NFATc1 exprimierenden CD3 <sup>+</sup> T-Zellen.....	40
Abb. 4.3	Reproduzierbarkeit und Einfluss der Lager- bzw. Blutentnahmezeit auf die IL-2 und NFATc1 Expression der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen stimulierter Vollblutproben.....	41
Abb. 4.4	Unbehandelte AD Patienten wiesen einen höheren SCORAD Index auf, als AD Patienten unter der Therapie mit gering dosiertem CsA.....	44
Abb. 4.5	Gering dosiertes CsA reduziert die IL-2 Zytokinantwort in stimulierten Vollblutproben von AD Patienten.....	45
Abb. 4.6	Die Einleitung der Therapie mit gering dosiertem CsA führt in AD Patienten zu einer verminderten IL-2 Expression.....	46
Abb. 4.7	Normalspender und AD Patienten mit und ohne CsA Therapie unterscheiden sich nicht in der CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellzahl.....	48
Abb. 4.8	AD Patienten weisen höhere Frequenzen als gesunde Kontrollspender an CLA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im peripherem Blut auf.....	49
Abb. 4.9	Treg-Zellen der AD Patienten und der gesunden Kontrollspender unterscheiden sich nicht in der Expression von CD25, CD127 und FoxP3.....	51
Abb. 4.10	Die Parallelfärbung von intrazellulärem FoxP3 mit zwei verschiedenen FoxP3 Antikörpern.....	52
Abb. 4.11	Treg-Zellen aus dem peripheren Blut von AD Patienten haben die Fähigkeit in die Haut einzuwandern.....	53
Abb. 4.12	Die Treg-Zellen der AD Patienten sind funktionell.....	54



---

Abb. 4.13	AD Patienten unter CsA Therapie haben mehr periphere FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Treg-Zellen als unbehandelte AD Patienten und gesunde Kontrollspender.....	56
Abb. 4.14	Die Einleitung der Therapie mit gering dosiertem CsA führt im peripheren Blut der AD Patienten zu einer vergrößerten FoxP3 <sup>+</sup> Treg-Zell Population.....	57
Abb. 4.15	Keine Veränderungen in der Anzahl der FoxP3 <sup>+</sup> Treg-Zellen nach Beenden der CsA Therapie.....	59
Abb. 4.16	CFSE und PKH26 haben keinen differentiellen Einfluss auf die Proliferation.....	60
Abb. 4.17	Punktwolkendarstellung der Treg/Teff-Zell Kokultur zu Beginn und nach erfolgter Kokultivierung.....	61
Abb. 4.18	Treg-Zellen reagieren unempfindlicher als Teff-Zellen auf geringe CsA Konzentrationen.....	62
Abb. 5.1	T-Zellen spielen bei der Entzündungsreaktion in der Haut von AD Patienten eine entscheidende Rolle.....	64
Abb. 5.2	Lineare Regression der IL-2 Expression und der SCORAD Index Werte von AD Patienten.....	69
Abb. 5.3	Lineare Regression der Frequenz an FoxP3 <sup>+</sup> Treg-Zellen und der SCORAD Index Werte von AD Patienten.....	73
Abb. 5.4	Gering dosiertes CsA führt zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes in den AD Patienten.....	77

### III Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Übersicht der Synonyme und Regulationsmechanismen der NFAT Isoformen.....	12
Tab. 2.1	Chemikalien und Hersteller.....	25
Tab. 2.2	Zur T-Zell Stimulation verwendete Antikörper.....	25
Tab. 2.3	Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	26
Tab. 2.4	Verwendete Puffer mit Rezepturen.....	26
Tab. 2.5	Verbrauchsmaterialien und Hersteller.....	27
Tab. 2.6	Verwendete Geräte und Hersteller.....	27
Tab. 2.7	Zur Analyse der experimentellen Daten verwendete Software.....	27
Tab. 2.8	Eigenschaften und klinische Merkmale der Studienteilnehmer.....	28
Tab. 4.1	Charakterisierung des Vollbluttestsystems.....	42
Tab. 4.2	Die IL-2 Expression der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen war sowohl bei der minimal als auch bei der maximal möglichen CsA Konzentration nachweisbar.....	46
Tab. 4.3	Die IL-2 Expression der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) ist über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen stabil.....	47
Tab. 4.4	Die Zellzahlen für CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) stabil.....	49
Tab. 4.5	Übersichtstabelle zur IL-2 Expression und der T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut der Studienteilnehmer.....	50
Tab. 4.6	Keine Veränderung der FoxP3 Expression der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen innerhalb von 2 h nach oraler CsA Einnahme.....	57
Tab. 4.7	Die FoxP3 <sup>+</sup> Treg-Zell Population ist über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) stabil einzelnen Spendern.....	58
Tab. 5.1	Vergleich der Therapie mit gering und höher dosiertem CsA .....	69
Tab. 5.2	Normalisierte ZP der Teff- und Treg-Zellen bei geringen CsA Konzentrationen.....	75

## IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Ria Baumgrass (DRFZ, AG Signaltransduktion) für die Möglichkeit in Ihrem Labor zu arbeiten und die umfassende Betreuung meines Projekts bedanken. Unvergessen sind die Gruppenausflüge und all die anderen Festivitäten, die einen wesentlichen Beitrag an dem harmonischen und freundschaftlichen Arbeitsklima im Labor der AG Signaltransduktion hatten.

Prof. Dr. Rupert Mutzel (FU Berlin, Institut für Biologie) möchte ich für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Prof. Dr. Andreas Radbruch (DRFZ) möchte ich dafür danken, dass ich meine Arbeit an seinem Forschungsinstitut durchführen durfte.

Prof. Dr. med. Margitta Worm (Charité Berlin, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie) und ihren Mitarbeitern, insbesondere Mandana Abdollahnia, Dr. med. Stephanie Soost, Dr. med. Elsbeth Oestmann und Dr. med. Lilla Landeck, möchte ich aufrichtig für die ertragreiche Kooperation, die Bereitstellung der Patientenproben und für die zahlreichen Gespräche über atopische Erkrankungen und die Einblicke in die klinische Dermatologie danken.

Prof. Dr. Petra Reinke (Charité Berlin, Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin) und Peter Liman sei für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen über Pharmakodynamik und Pharmakokinetik gedankt.

Bei dem FCCF Team des DRFZ möchte ich mich für die Unterstützung mit Rat und Tat bei all den großen und kleinen Problem rund um die Durchflusszytometrie bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Labmanagerinnen und den Mitarbeiterinnen der Spühlküche des DRFZ für ihre Hilfsbereitschaft und die Gewährleistung der guten Laborbedingungen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Signaltransduktion. Es war super mit euch zusammenzuarbeiten! Die gemeinsamen Jahre haben uns zusammen geschweißt und ich denke sehr gern an all die gemeinsamen Stunden im Labor und außerhalb des Instituts. Ich möchte mich besonders bei Uwe Benary, Hanna Bendfeldt, Andreas Czech, Stefan Frischbutter, Anne Gompf, Anett Köhler, Stefan Kröger, Melanie Krüger, Solveigh Krusekopf, Britta Lamottke, Yü-Hien Lee, Maria Lexberg, Astrid Menning, Karin Müller, Luisa Neubrandt, Silvia Niebrügge, Vladimir Pavlovic, Martin Pohland, Miriam Podschaske, Tobias Scheel, Michael Schmück, Matthias Sieber, Biljana Smiljanovic und Fanny Wegner bedanken.

Bei Manuela Benary (ITB) bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Regressionsanalyse.

Dem Hypatia Programm der Beuth Hochschule für Technik in Berlin danke ich für ein Stipendium zur Vorbereitung eines Promotionsvorhabens und ein Promotionsstipendium.

Der Sonnenfeld Stiftung sei für das Promotionsstipendium gedankt, das mir die Fortführung meiner Arbeit ermöglichte. Dabei möchte ich mich nicht nur für diese zweijährige Finanzierung bedanken, sondern auch für den Zuspruch und das Interesse von Prof. Dr.-Ing. Dr. med. h.c. Hansjürgen Frhr. von Villiez an meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meinen Freunden für all ihre Unterstützung!!!

Meinen Eltern verdanke ich Alles. Durch ihre Liebe habe ich den Mut und die Kraft all meine Träume zu verwirklichen. DANKE!

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der T-Zellimmunologie

Eine wesentliche Aufgabe der Immunologie ist es die verschiedenen und vielschichtigen zellulären und molekularen Mechanismen, die zu Immunantworten führen und zu ihrer Regulation beitragen, zu entschlüsseln. Das anpassungsfähige und hochdifferenzierte Immunsystem gewährleistet einen Schutz gegen eine Vielzahl von Pathogenen und unterbindet zugleich Entzündungsreaktionen gegen körpereigene Strukturen. Im Rahmen einer Immunantwort werden die unspezifischen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und die spezifische Immunabwehr des adaptiven Immunsystems aktiv. Die Spezifität des erworbenen Immunsystems beruht auf der Varianz von B-Zell bzw. T-Zell Rezeptoren (BZR bzw. TZR), welche durch somatische Rekombination von separaten Gensegmenten und verschiedenen Selektionsschritten während der Reifung der Lymphozyten erlangt wird. Der BZR ist ein membrangebundener Rezeptor. Kommt dieser mit dem für ihn spezifischen Antigen in Kontakt, entwickelt sich der B-Lymphozyt zur Plasmazelle und vermittelt eine humorale Immunantwort. Im Gegensatz dazu vermitteln die T-Lymphozyten nach der Bindung des TZR an ein antigenbeladenes MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) Molekül eine zellulär orientierte Immunantwort. Anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 (Cluster of differentiation 4) und CD8 werden die T-Zellen in die zwei funktionell verschiedenen Subpopulationen eingeteilt, die CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen (Th-Zellen) und die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden über MHC I Moleküle Antigene von intrazellulären Viren und Bakterien präsentiert. Die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermitteln über die Expression von Perforin und Granzym die Apoptose in den MHC I tragenden, infizierten Zielzellen (1, 2). MHC II Moleküle werden von den sogenannten professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert und präsentieren dem TZR der CD4<sup>+</sup> Th-Zelle exogene Antigene. Die CD4<sup>+</sup> Th-Zellen spielen innerhalb der adaptiven Immunabwehr eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Choreographie der Immunantwort (3, 4). Verschiedene CD4<sup>+</sup> Th-Zell Populationen nehmen dabei unterschiedliche Aufgaben wahr. Sie verhelfen durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen B-Zellen zur Antikörperproduktion, induzieren bei Makrophagen die Entwicklung der mikrobiziden Aktivität, rekrutieren Neutrophile, Eosinophile und Basophile zum Infektions- und Entzündungsherd, aktivieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen und können direkt auf verschiedene Zellen im Gewebe wirken, z.B. auf Epithelzellen (4, 5).

Die Entstehungs- und Differenzierungsprozesse der hochspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind feinregulierte zelluläre Programme und bedürfen einer Vielzahl von Kontroll- und Regulierungsmechanismen.

## 1.2 Zentrale und periphere Toleranz

Eine bedeutende Aufgabe des Immunsystems ist es zwischen gefährlichen und ungefährlichen Strukturen zu unterscheiden. Der direkte Angriff auf, für den Organismus als gefährlich eingestufte, eindringende Mikroorganismen oder bakterielle Toxine ist erwünscht. Im Gegensatz dazu sind Angriffe auf gesunde, körpereigene Strukturen oder ungefährliche Umweltantigene unerwünscht. Alle Prozesse des Immunsystems, die zur Vermeidung einer zerstörerischen Selbstreaktivität und die zur Unterbindung von Immunreaktionen gegen harmlose Antigene aufgebracht werden, werden als Toleranz bezeichnet.

Die zentrale Toleranz entfaltet sich bei der Reifung der T-Zellen im Thymus. Durch den Prozess der negativen Selektion werden die noch unreifen Lymphozyten, deren TZR eine hohe Affinität gegenüber allgegenwärtigen Autoantigenen aufweist, eliminiert. Stark autoreaktive T-Zellen werden somit entfernt, noch bevor sie den Thymus verlassen und schädigende Autoimmunreaktionen auslösen können (6-10). Trotzdem weisen auch gesunde Individuen autoreaktive T-Zellen in der Peripherie auf (11, 12). Diese T-Zellen tragen TZR die Autoantigene mit einer geringen Affinität binden (13). Erkennen diese reifen, antigenspezifischen T-Zellen Autoantigene in der Peripherie, greifen die Mechanismen der peripheren Toleranz.

Wird einer autoreaktiven T-Zelle ein Autoantigen präsentiert, geht diese auf Grund des Mangels eines kostimulatorischen Signals in den Zustand der Anergie bzw. der funktionellen Inaktivierung über (14). Ist das Autoantigen für die autoreaktive T-Zelle nicht erreichbar bzw. der Gehalt des Autoantigens ist zu gering, um eine T-Zell Antwort auszulösen, spricht man von der Ignoranz des Autoantigens (15, 16). Der wohl effektivste Mechanismus, um eine Autoimmunreaktion zu vermeiden, ist die Apoptose der autoreaktiven T-Zelle. Der sogenannte aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD; activation induced cell death) wird dabei durch die Erkennung des Selbstantigens ausgelöst (17). Einen sehr entscheidenden Faktor bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz stellen die Treg-Zellen dar (6, 7, 18). In den letzten Jahren wurde die Population der FoxP3 (Forkhead box P3) exprimierenden Treg-Zellen intensiv untersucht, da ihr Fehlen oder Funktionsverlust zur Herabsetzung der Selbsttoleranz und damit zu schweren Immunerkrankungen führt (19, 20).

Da die vorliegende Arbeit sich auf die FoxP3 exprimierenden Treg-Zellen fokussiert, werden im Folgenden die charakteristischen Eigenschaften und Wirkmechanismen der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen detailliert beschrieben.

### 1.2.1 Charakteristika der Treg-Zellen

Die FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen sind spezialisierte T-Zellen, die die Aktivierung, die Expansion und die Funktion anderer Immunzellen supprimieren können. Sie sind für die Erhaltung der Selbsttoleranz unentbehrlich und spielen eine entscheidende Rolle bei der Prävention von Autoimmunerkrankungen oder unangemessenen Immunantworten, wie sie bei allergischen Erkrankungen auftreten (21-24).

Die Population der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen umfasst ca. 5 – 10 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut (20, 25) und beinhaltet zwei Arten von Treg-Zellen. Neben den sich im Thymus entwickelnden nTreg- (natürlich vorkommende Treg) Zellen entstehen die iTreg- (induzierte Treg) Zellen in der Peripherie aus naiven T-Zellen, wenn diese in Gegenwart von TGFβ, IL-2 und über den TZR stimuliert werden (21, 26, 27) (siehe Abb. 1.2). Die nTreg-Zellen entwickeln sich im Thymus aus FoxP3 negativen Thymozyten und durch die Selektion der TZR mit hoher Avidität, der CD28 Kostimulation und der Expression hoch affiner IL-2 (Interleukin-2) Rezeptoren (28, 29). Die induzierten iTreg-Zellen sind den nTreg-Zellen phänotypisch sehr ähnlich, eine exakte Unterscheidung der Funktionen der iTreg-Zellen von den nTreg-Zellen ist daher kaum möglich (4). Beide Treg-Zell Populationen zeichnen sich durch einen anergen Phänotyp aus. Sie exprimieren nach Stimulation mit einem Antigen keine oder kaum Effektorzytokine wie IL-2, IL-4 oder IFNγ (30, 31). Die Treg-Zellen sind in der Lage, über verschiedene Mechanismen (siehe Abs. 1.2.2) die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen (DZ) zu supprimieren (31). Die konstitutiv hohe Expression an CD25 ist ein wesentliches Merkmal der Treg-Zellen. Obwohl alle aktivierten Th-Zellen CD25 exprimieren, ist die CD25 Expression der Treg-Zellen wesentlich höher und nicht aktivierungsabhängig. Die Th-Zellen exprimieren CD25 dagegen nur transient und in einem geringeren Maße (4, 32). Die Bedeutung von CD25 für die Treg-Zellen wird durch Defizite in der CD25 Expression oder Funktionsverlustmutationen im CD25 Gen deutlich. Diese führen zu fehlerhaften Treg-Zellen und resultieren in Allergien oder schwerwiegenden immunologischen Erkrankungen (19, 33). Weitere charakteristische Merkmale der Treg-Zell Population sind eine hohe Expression von GITR (Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) und CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) (4, 18, 31). Im Gegensatz dazu exprimieren Treg-Zellen das Oberflächenmolekül CD127 nur in sehr geringem Maße. Die Kombination der CD4, der CD25 und der geringen CD127 Expression erlaubt die Identifizierung und Isolierung peripherer Treg-Zellen, die sich durch ihren suppressiven Phänotypen und die hohe Expression an FoxP3 auszeichnen (4, 34) (siehe Abb. 4.12).

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist nicht nur das am besten charakterisierte Treg-Zell spezifische Molekül, sondern die FoxP3 Expression ist auch für die Ausbildung eines Treg-

Zell Phänotyps und die suppressive Funktion der Treg-Zellen unabdingbar (18, 31, 35). Der proximale FoxP3 Promoter weist verschiedene Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) und AP1 (Activator Protein 1) auf (25). Darüber hinaus beeinflusst NFAT die Aktivität der FoxP3 Enhancerregion und reguliert somit die Induktion von FoxP3 in den peripheren iTreg-Zellen (36). FoxP3 unterdrückt die Expression von IL-2 und CD127 und fördert, im Gegensatz dazu, die Expression von CD25, CTLA4 und dem TGF $\beta$  Rezeptor (18, 35). Eine Funktionsverlustmutation im FoxP3 Gen führt zu einer schwerwiegenden Autoimmunerkrankung, dem IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) Syndrom (22, 37). Charakteristisch für diese Erkrankung sind ein Defizit an funktionellen Treg-Zellen, die Manifestierung von Allergien, eine Eosinophilie, die Erhöhung von IgE Serumwerten und eine Dermatitis (38, 39). Wie konventionelle T-Zellen benötigen die Treg-Zellen eine Stimulation über den TZR und ein adäquates kostimulatorisches Signal, um ihre volle suppressive Aktivität zu entfalten (40). Im Folgenden werden die einzelnen Wirkmechanismen erläutert, die der Treg-Zell vermittelten Suppression zu Grunde liegen.

### 1.2.2 Wirkmechanismen der Treg-Zellen

Für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind die Treg-Zellen unabkömmlich. Ihre immunsuppressive Wirkung auf Effektor T- (Teff) Zellen erfolgt durch inhibitorische Zytokine, Zelllyse, Störung des Metabolismus und durch die Beeinflussung der Reifung und Funktion der DZ (siehe Abb. 1.1).

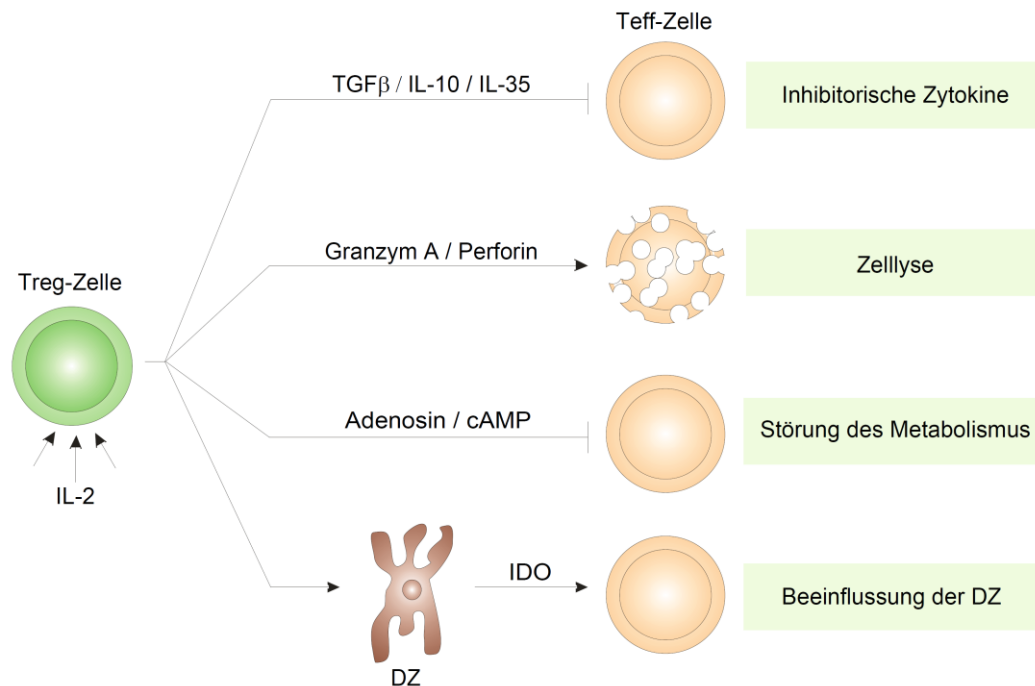
Die Ausschüttung der inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF $\beta$ , das auch membrangebunden über Zell-Zell Kontakte wirksam ist, ermöglicht den Treg-Zellen ihre immunsuppressive Wirkung zu vermitteln. Darüber hinaus besitzt TGF $\beta$  die Fähigkeit iTreg-Zellen zu induzieren (41, 42). Um die maximale inhibitorische Kapazität entfalten zu können, exprimieren die Treg-Zellen ein weiteres Zytokin, IL-35 (43).

Die Suppression einer Teff-Zelle kann auch über die Zelllyse erfolgen. Neben den natürlichen Killerzellen und den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen auch die Treg-Zellen die Fähigkeit eine zytotoxische Aktivität zu vermitteln. Durch die Sekretion von Granzym A und Perforin erfolgt die Lyse der Zielzelle (44-46).

Des Weiteren sind die Treg-Zellen in der Lage den Metabolismus der Teff-Zellen zu beeinflussen. Zum einen zeichnen sich Treg-Zellen durch die sehr hohe Expression von CD25 aus und binden lokal vorhandenes IL-2. Damit entziehen sie den Teff-Zellen das für ihre Teilung und das Überleben notwendige IL-2 (47-49). Zum anderen produzieren Treg-Zellen, in Abhängigkeit von den Ektoenzymen CD39 und CD73, Adenosinnukleoside, die über die Bindung an den Adenosinrezeptor 2A die Teff-Zellen in ihrer Funktion hemmen (41).



Die Adenosinrezeptoraktivierung der Teff-Zellen führt darüber hinaus zu einer vermehrten Ausschüttung von TGF $\beta$  und fördert somit die Generierung von iTreg-Zellen (50). Kürzlich wurde gezeigt, dass Treg-Zellen durch den Transfer von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) über Gap Junctions die T-Zellen in ihrer Funktion hemmen (51).



**Abb. 1.1 Wirkmechanismen der Treg-Zellen.**

Die Treg-Zellen vermitteln über eine Vielzahl an Mechanismen ihre immunsuppressive Wirkung auf die Teff-Zellen.

Da Treg-Zellen auch die Reifung und Funktion von DZ beeinflussen können, modulieren sie auf diesem Wege indirekt die Teff-Zell Aktivierung. Über die Bindung zwischen dem Treg-Zell exprimierten CTLA4 und den dendritischen CD80/CD86 wird in DZ die Expression von IDO (Indoleamin-2,3-Dioxygenase) induziert. Das Molekül IDO entfaltet seine immunsuppressive Wirkung in der Zielzelle über den Tryptophan Katabolismus (52-55). Das Oberflächenmolekül LAG3 (Lymphozyten Aktivierungsgen 3) ermöglicht Treg-Zellen die Reifung von DZ zu inhibieren. LAG3 führt, über die Bindung an das von DZ exprimierte MHC II Molekül, zur Unterdrückung der DZ Reifung und zur Reduzierung der immunstimulatorischen Kapazität der DZ (56, 57).

### 1.2.3 Induktion und Expansion von Treg-Zellen *in vivo* und *in vitro*

FoxP3 exprimierende Treg-Zellen sind für die Erhaltung der Toleranz und der Homöostase des Immunsystems unentbehrlich. Die Modulation der Treg-Zellzahl stellt eine mögliche Behandlungsstrategie für Autoimmunerkrankungen oder Allergien dar (58). Eine Erhöhung

der Treg-Zellzahl kann einerseits durch die Induktion neuer Treg-Zellen in der Peripherie oder durch die gezielte Expansion der Treg-Zell Population erfolgen.

Neben den sich im Thymus entwickelnden nTreg-Zellen können iTreg-Zellen auch in der Peripherie aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen entstehen (siehe Abb. 1.2). *In vitro* und *in vivo* Versuche mit naiven, murinen Zellen zeigen, dass suboptimale Stimulationsbedingungen die Induktion von iTreg-Zellen unterstützen (59, 60). Zum einen führt eine geringe Antigenkonzentration *in vivo* zur höchsten Anzahl FoxP3 exprimierender Zellen (59) und zum anderen erhöht sich die Frequenz der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen *in vitro* durch die Stimulation mit geringen anti CD3 Antikörper Konzentrationen (60).

Durch die Stimulation mit anti CD3, anti CD28 Antikörpern und IL-2 ist *in vitro* die Expansion von funktionellen Treg-Zellen möglich (61). Untersuchungen zur *in vivo* Expansion hingegen gestalten sich auf Grund der komplexen experimentellen Bedingungen schwierig. Aber der Einsatz entzündungshemmender Medikamente im Tiermodell, z.B. die Behandlung der experimentellen Colitis bei Mäusen mit Prednisolonderivaten, weist auf einen Zusammenhang zwischen einer immunsuppressiven Therapie und einer *in vivo* Expansion von Treg-Zellen hin (62).

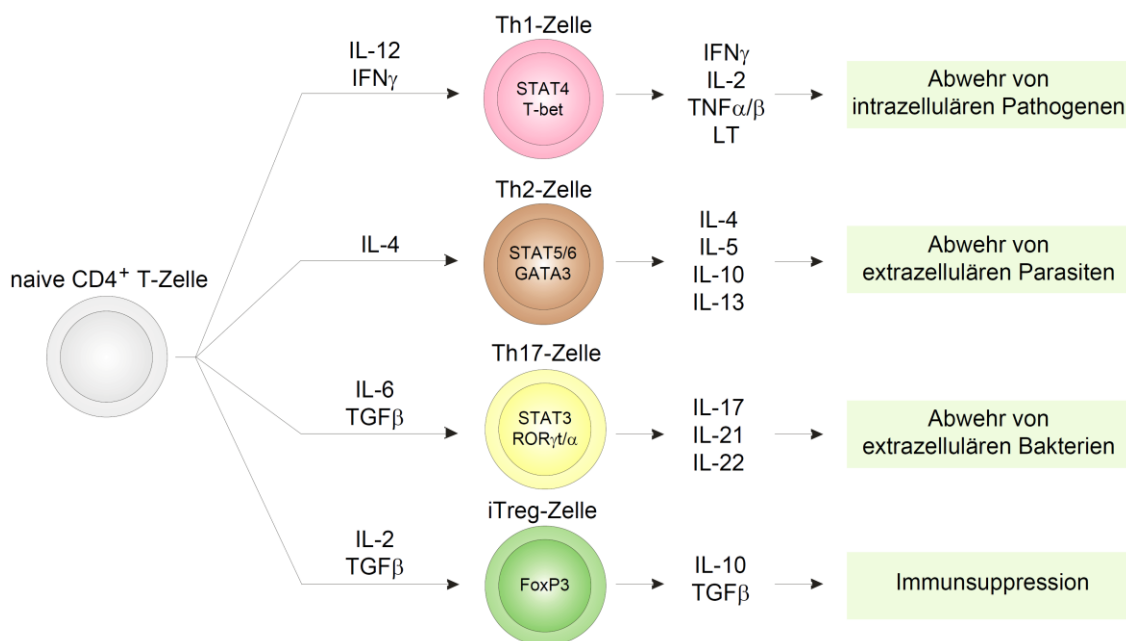
### 1.3 Differenzierung von Th-Zellen in der Peripherie

Verschiedene Th-Zell Subpopulationen entwickeln sich in der Peripherie aus naiven T-Zellen. Die naiven T-Zellen, die im Folgenden auch als Th0-Zellen bezeichnet werden, entstehen im Thymus aus lymphoiden, knochenmarksstämmigen Vorläuferzellen und werden nach dem Durchlaufen verschiedener Selektionsprozesse in die Peripherie entlassen. Treffen die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert, differenzieren zu Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen und nehmen als Teff-Zellen vielfältige Aufgaben wahr. Die Differenzierung in verschiedene Th-Zell Subpopulationen ist ein feinregulierter Prozess. Gesteuert wird dieser Prozess durch die TZR Aktivierung, den vorhandenen Zytokinen, den involvierten kostimulatorischen Molekülen und die Stärke jedes einzelnen dieser ausgelösten Signalewege (63, 64). Die Phänotypen der entstehenden Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen zeichnen sich durch ihre individuellen Zytokinprofile, charakteristische Transkriptionsfaktoren und durch ihre biologischen und immunmodulatorischen Funktionen aus (4, 64) (siehe Abb. 1.2).

#### Th1-Zellen

Die Th1-Zellen sind eine der ersten beschriebenen Th-Zell Subpopulationen. Sie exprimieren vorzugsweise das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$ , aber auch IL-2, TNF- $\alpha$  (Tumor

Nekrose Faktor- $\alpha$ ), TNF- $\beta$  und Lymphotoxin (LT) (3, 5, 65). Th1-Zytokine stimulieren Immunantworten des angeborenen Immunsystems und T-Zell Antworten gegen intrazelluläre Pathogene, z.B. Bakterien, Hefen, Parasiten oder Viren (66-68), indem sie Makrophagen, natürliche T-Killerzellen und zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren (4, 63). Unkontrollierte Th1-Antworten sind in der Pathogenese von Typ I Diabetes, Multipler Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen involviert (4, 69, 70). Die Th1-Zellen entstehen aus naiven T-Zellen, wenn diese in der Gegenwart von IL-12 und IFN- $\gamma$  und durch die Bindung hoch affiner Antigene an den TZR aktiviert werden. Das IL-12 stammt dabei vornehmlich von aktivierten Makrophagen oder DZ (71-73). Der Transkriptionsfaktor STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4) wird durch die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor aktiviert und induziert direkt die IFN- $\gamma$  Produktion und die Expression des IL-12 Rezeptors  $\beta$ 2 und des Transkriptionsfaktors T-bet (3). Der Th1-Zell spezifische Transkriptionsfaktor T-bet vermittelt ebenfalls die Produktion von IFN- $\gamma$  und unterdrückt darüber hinaus die Ausschüttung von Th2-Zytokinen (63, 74, 75) (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 Differenzierung der Th-Zellen in der Peripherie.**

Zusammenfassung der für die Entstehung der Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zell Population entscheidenden Zytokine. Des Weiteren sind die typischen, von den einzelnen T-Zell Subpopulation exprimierten Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und die charakteristische Funktion aufgeführt.

## Th2-Zellen

Die Population der Th2-Zellen wurde zur selben Zeit wie die Th1-Zellen identifiziert. Sie zeichnen sich durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus (5, 65). Die Th2-Immunantwort ist gegen Helminthen und andere extrazelluläre Parasiten gerichtet (66, 67). Neben der Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen, induzieren Th2-Zellen,

insbesondere über IL-4, die Reifung von B-Zellen zu IgE produzierenden Zellen und unterstützen somit die humorale Immunität (5, 64, 76). Überschießende Th2-Antworten sind charakteristisch für atopische Erkrankungen und Allergien (5, 76). Die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen erfolgt in Gegenwart von IL-4 und der Bindung eines gering affinen Antigens an den TZR (68, 71). Das IL-4 wird neben den Th2-Zellen selbst auch von Mastzellen, Eosinophilen und natürlichen Killerzellen exprimiert (4). Der Transkriptionsfaktor STAT6 wird durch die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor aktiviert und ist entscheidend für die Th2-Differenzierung (77, 78). Die IL-2 vermittelte STAT5 Aktivierung trägt ebenfalls zur Th2-Differenzierung bei (4). Über STAT6 erfolgt die Induzierung des Transkriptionsfaktors GATA3, der für die Erhaltung des Th2-Phänotyps und der Th2-Zytokinexpression unabkömmlich ist (4, 68) (siehe Abb. 1.2).

### **Th17-Zellen**

Etwa 20 Jahre nach Entdeckung der Th1- und Th2-Zell Populationen, wurde eine IL-17 produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zell Population entdeckt, die Th17-Zellen (79, 80). Neben der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-17a und IL-17f zeichnen sich die Th17-Zellen durch die Produktion von IL-21 und IL-22 aus (3, 5, 64). Über die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen und anderen T-Zellen vermitteln Th17-Zellen Immunantworten gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (81, 82). Eine bedeutende Rolle wird den Th17-Zellen bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose und der rheumatoiden Arthritis zugeschrieben (4, 81, 82). Die Differenzierung in Th17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6 und TGFβ gefördert (3) und durch IL-23 stabilisiert und aufrechterhalten (3, 83). Die Transkriptionsfaktoren RORγt (Retinoic acid-related orphan receptor γt), RORα und STAT3 sind für die Generierung von Th17-Zellen und deren IL-17 Expression entscheidend (3, 84) (siehe Abb. 1.2).

### **Treg-Zellen**

Die Treg-Zellen stellen die vierte große Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar (29) und zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 aus (27). Die Treg-Zellen spielen bei der Erhaltung der Selbsttoleranz und bei der Regulation von Immunantworten eine wichtige Rolle. Damit unterscheiden sie sich von den anderen Th-Subpopulationen, die Immunantworten fördern (21, 26) (siehe Abs. 1.2.1 und Abb. 1.2).

## 1.4 Bedeutung des IL-2 für das Immunsystem

IL-2 ist ein  $\alpha$  helicales, 15 kDa großes Protein, das überwiegend durch aktivierte T-Zellen produziert wird. Für die T-Zell abhängige IL-2 Genexpression ist die in Abschnitt 1.5 und in Abbildung 1.3 dargestellte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP1 und NF $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) notwendig.

IL-2 bindet an einen hoch affinen Rezeptorkomplex, der sich aus drei Untereinheiten, dem IL-2 Rezeptor  $\alpha$  (CD25), dem IL-2 Rezeptor  $\beta$  (CD122) und dem  $\gamma$ c Rezeptor (CD132) zusammensetzt (85, 86). Die IL-2 Rezeptoren werden vorzugsweise von Treg-Zellen und kürzlich aktivierten T-Zellen exprimiert (85). Die Bindung des IL-2 an seinen Rezeptor führt über eine positive Rückkopplungsschleife zur Erhöhung der initialen CD25 Expression (87). Die IL-2 Rezeptor abhängigen Signalwege führen über die Aktivierung der Mitogenassoziierten Proteinkinasen (MAPK) und der Phosphatidylinositol 3 Kinasen (PI3K) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (88).

Ursprünglich wurde IL-2 als Wachstumsfaktor definiert. Es fördert die T-Zell Aktivierung und Expansion von Th1- und Th2-Zellen (89) (siehe Abs. 1.4). Doch IL-2 ist ein Zytokin mit vielfältigen Wirkungen. Neben dieser proliferationsfördernden Wirkung verstärkt IL-2 den Fas vermittelten ACID. IL-2 inhibiert die Entwicklung von proinflammatorischen Th17-Zellen, stimuliert natürliche Killerzellen sowie B-Zellen und ist sehr bedeutend für die Entwicklung, das Überleben und die Funktionalität von Treg-Zellen (85, 86, 89) (siehe Abb. 1.2). Die Bedeutung von IL-2 für die Toleranzmechanismen wird durch eine IL-2/IL-2 Rezeptor Defizienz deutlich. Diese mündet nicht wie erwartet in einer Immundefizienz, sondern äußert sich in einer entzündlichen Autoimmunerkrankung (90, 91). Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass diese Autoimmunerkrankung primär auf einen Mangel an Treg-Zellen und der daraus resultierenden fehlenden Toleranz zurückzuführen ist (92).

IL-2 zeichnet sich durch seine zentrale Rolle innerhalb des Immunsystems aus. Es fördert nicht nur die Prozesse der Immunität, sondern reguliert auch Prozesse der Toleranz.

## 1.5 Die Aktivierung und Signalweiterleitung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

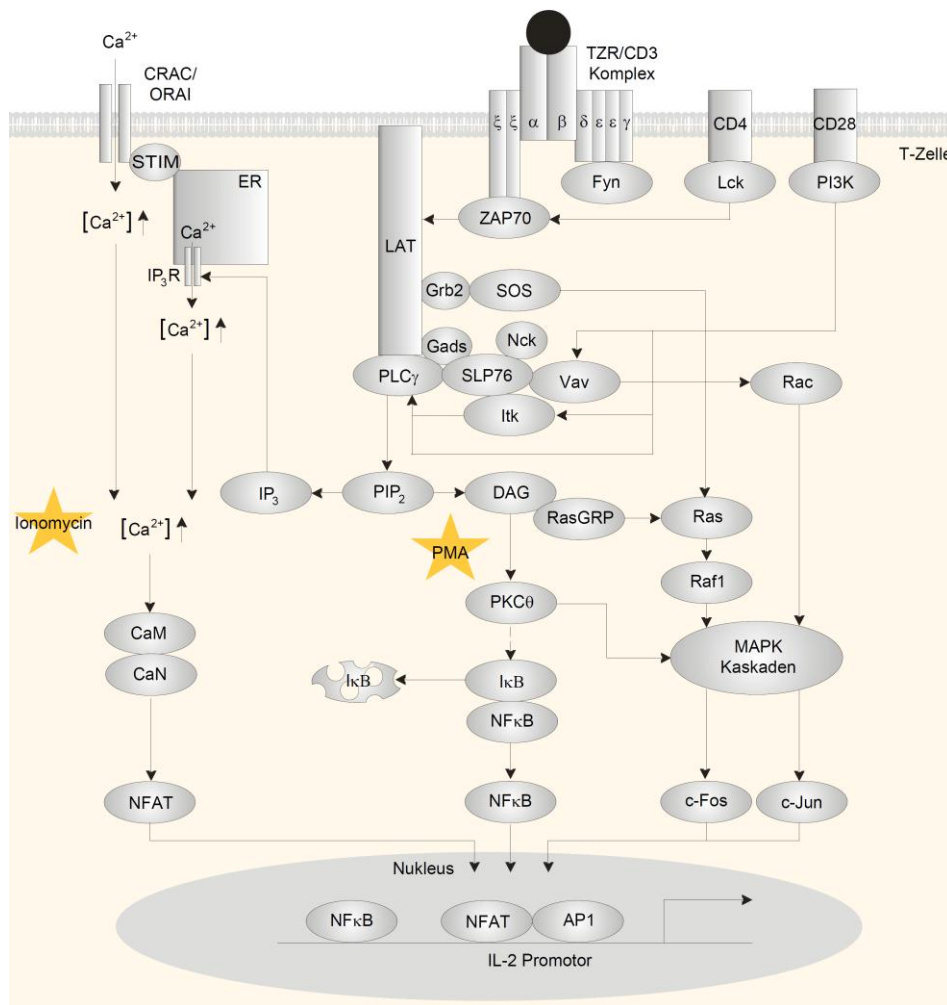
T-Zellen exprimieren den TZR Komplex. Dieser setzt sich aus dem TZR und der membranständigen CD3 Molekülgruppe zusammen. Die Antigenerkennung und die Initiierung intrazellulärer Signale, die in einer adäquaten T-Zell Antwort münden, sind die wesentlichen Aufgaben dieses TZR Komplexes. Der TZR besteht aus einer Ligand bindenden  $\alpha/\beta$  bzw.  $\gamma/\delta$  Untereinheit und einem  $\zeta$  Homodimer. Allerdings werden die  $\gamma/\delta$  TZR nur von einer Minderheit der T-Zellen exprimiert. Das  $\zeta$  Homodimer stellt zusammen mit den invarianten CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  Ketten die signal-gebende Untereinheit des TZR Komplexes dar (93, 94). Die intrazellulären Fortsätze dieser  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  und  $\zeta$  Ketten tragen charakteristische

Sequenzmotive für die Tyrosinphosphorylierung, die sogenannten ITAM (Immunoreceptor tyrosin based activation motif), die für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle entscheidend sind. Die Bindung des TZR an sein spezifisches, durch MHCII Moleküle präsentiertes Antigen, wird durch den CD4 Korezeptor unterstützt (95-97). Ein weiteres kostimulatorisches Signal wird über die Bindung des CD28 Korezeptors an die von APZ exprimierte CD80/CD86 Liganden und der daraus resultierenden Aktivierung der PI3K vermittelt (98, 99). CD28 unterstützt die TZR abhängigen Signalwege und trägt u.a. zur Aktivierung der MAPK Kaskade sowie der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB bei (100, 101). Neben dem sehr starken und stabilen CD28 Kostimulus weisen die T-Zellen mit CD2, CD5, 4-1BB, ICOS (Inducible co stimulator) und CD134 weitere Korezeptoren auf (101). CD4 und CD28 unterstützen insbesondere die initialen, durch die Proteintyrosinkinase (PTK) Aktivität geprägten Signale und beeinflussen die T-Zell Antwort sowohl quantitativ als auch qualitativ (93, 102). Der Komplex aus Signalproteinen, die an der antigenspezifischen Aktivierung der T-Zelle beteiligt sind, wird als immunologische Synapse bezeichnet (103).

### 1.5.1 Initiation der TZR abhängigen Signalkaskade

Eines der ersten intrazellulären Ereignisse nach der Ligation des TZR ist die Aktivierung der PTK Lck und Fyn (104, 105). Sie phosphorylieren die ITAM und ermöglichen der ZAP70 (ζ chain associated protein kinase of 70 kDa), einer weiteren PTK, über ihre SH2 Domänen an die ITAM zu binden. Dort erfolgt die Lck abhängige Phosphorylierung und Aktivierung der ZAP-70 (101, 106). Die Adapterproteine LAT (Linker for activated T-cells) und SLP76 (Cytosolic adapter protein src homology 2 domain containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa) sind wichtige Substrate der ZAP70 und für den weiteren Ablauf der TZR abhängigen Signaltransduktion von großer Bedeutung. Sie arrangieren einen aus verschiedenen Signalmolekülen bestehenden Komplex, um die optimale Aktivität der einzelnen Komponenten zu ermöglichen (93, 101). Die phosphorylierten Tyrosinreste des LAT dienen als Bindungsstelle für die PLCγ (Phospholipase Cy) und die Adapterproteine Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) und Gads (Grb2 related adapter downstream of Shc) (107). Vav, Nck und Itk (IL-2 induced tyrosine kinase) sowie Gads und PLCγ binden an SLP76 (108). Die Ausbildung dieses proximalen Signalkomplexes mündet in der Itk abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung der PLCγ (109). Unterstützt werden diese initialen Signalprozesse durch die CD28 Ligation, der PI3K Aktivierung (98, 99) und der Wirkung der PI3K auf ihre Substrate PLCγ, Itk und Vav (110). Die PLCγ spaltet PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat) in DAG (Diacylglycerol) und IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-Triphosphat), zwei für die T-Zell Funktion bedeutsame sekundäre Botenstoffe. DAG aktiviert zwei Signaltransduktions-

wege, die durch die GTPase Ras und die Proteinkinase  $\theta$  (PKC $\theta$ ) vermittelt werden und resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF $\kappa$ B (siehe Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen.**

Die Stimulation des TZR Komplexes und der Korezeptoren CD4/CD28 führt über die Aktivierung der Kinasen Fyn, Lck, PI3K und ZAP70 zur Ausbildung eines LAT, SLP76, PLC $\gamma$ , Grb2, Gads, Vav, Nck und Itk beinhaltenden Signalkomplexes. Dieser proximale Signalkomplex mündet in der Aktivierung des PLC $\gamma$  Signalweges und der Generierung der sekundären Botenstoffe DAG und IP $_3$ . IP $_3$  führt über den Ca $^{2+}$  Einstrom und der Aktivierung der Ca $^{2+}$  und CaM (Calmodulin) abhängigen Phosphatase CaN (Calcineurin) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und der NFAT abhängigen IL-2 Gentranskription. DAG vermittelt über die PKC $\theta$  die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B liegt inaktiv, gebunden an seinen Inhibitor I $\kappa$ B (Inhibitor von NF $\kappa$ B) im Zytosol ruhender Zellen vor (111, 112). Die stimulations-induzierte Degradierung von I $\kappa$ B führt zum Freiwerden des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der über die Bindung an die DNA die Transkription verschiedene Gene induzieren kann (111). Der dimere Transkriptionsfaktor AP1 setzt sich aus den Proteinen c-Fos und c-Jun zusammen, die über die sog. MAPK Kaskaden aktiviert werden. SOS (Son of sevenless) oder RasGRP (Ras guanyl nucleotide releasing protein) vermitteln die Expression und Aktivierung von c-Fos über die Ras/Raf/ MEK (MAPK Erk kinase)/ ERK 1/2 (Extracellular signal regulated kinase 1/2) Kaskade (113-115). Eine weitere MEK1 (MAP/Erk kinase kinase 1) / MKK4 (Mytogen activated protein kinase kinase 4) / JNK (c-jun N terminal kinase) Kaskade wird über Ras, Vav/Rac oder die PKC $\theta$  eingeleitet und aktiviert den Transkriptionsfaktor c-Jun (115-119). Die *in vitro* Stimulation mit PMA und Ionomycin führt über die direkte Aktivierung der PKC bzw. den massiven Ca $^{2+}$  Einstrom ins Zytoplasma zur Aktivierung aller sich anschließenden Signalkaskaden.

Neben der PKC $\theta$  initiierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B weisen neuste Untersuchungen auch auf eine CaN abhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B hin (120).

Das  $IP_3$  löst einen  $Ca^{2+}$  Einstrom aus dem extrazellulären Raum und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytoplasma aus und aktiviert den  $Ca^{2+}$  abhängigen CaN/NFAT Signaltransduktionsweg (121, 122) (siehe Abb. 1.3).

### 1.5.2 Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT

Das während einer TZR Stimulation gebildete  $IP_3$  bindet an die  $IP_3$  Rezeptoren ( $IP_3R$ ) des ER und initiiert die Öffnung der ER  $Ca^{2+}$  Speicher und den  $Ca^{2+}$  Einstrom in das Zytoplasma. Neigen sich diese  $Ca^{2+}$  Speicher dem Ende, aggregieren die STIM (Stromal interaction molecule) Proteine in der ER Membran und binden die ORAI ( $Ca^{2+}$  release activated  $Ca^{2+}$  channel protein) Moleküle des CRAC ( $Ca^{2+}$  release activated  $Ca^{2+}$ ) Kanals. Die CRAC Kanäle in der Zellmembran werden geöffnet und extrazelluläres  $Ca^{2+}$  gelangt in die Zelle (123, 124).  $Ca^{2+}$  ist ein universeller sekundärer Botenstoff mit einer zentralen Rolle in vielen Zelltypen. In T-Zellen beeinflussen  $Ca^{2+}$  Signale die Proliferation, die Differenzierung, die Apoptose sowie die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (125, 126). Der  $Ca^{2+}$  Einstrom führt zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$  Konzentration und aktiviert den CaN/NFAT Signalweg (siehe Abb. 1.3).

Die Serin/Threonin Proteinphosphatase CaN ist ein Heterodimer, das sich aus einer katalytischen, CaM bindenden Untereinheit, dem 59 kDa CaN-A und einer regulatorischen Untereinheit, dem 19 kDa CaN-B, zusammensetzt (127, 128). Eine autoinhibitorische Domäne blockiert im inaktiven Zustand das aktive Zentrum von CaN. Die Bindung von  $Ca^{2+}$  und CaM führt zu einer Konformationsänderung und zum Freiwerden des aktiven Zentrums (128, 129). Eine Vielzahl von Proteinen kann durch das aktivierte CaN dephosphoryliert werden (130). Zu den wichtigsten CaN Substraten zählen die Transkriptionsfaktoren der NFAT Familie (131). Die Dephosphorylierung von NFAT führt zur Aktivierung sowie zur Translokation in den Zellkern und dort zur NFAT abhängigen IL-2 Gentranskription (132, 133).

Tab. 1.1 Übersicht der Synonyme und Regulationsmechanismen der NFAT Isoformen.

NFAT Protein	Synonym	Regulation
NFATc1	NFATc, NFAT2	$Ca^{2+}$ / CaN
NFATc2	NFATp, NFAT1	$Ca^{2+}$ / CaN
NFATc3	NFATx, NFAT4	$Ca^{2+}$ / CaN
NFATc4	NFAT3	$Ca^{2+}$ / CaN
NFAT5	NFATz, NFATL1, TonEBP	Osmotischer Stress

Fünf verschiedene Mitglieder zählt die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren. NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5 (siehe Tab. 1.1). NFAT5 unterscheidet sich deutlich



von den vier klassischen NFAT Transkriptionsfaktoren. NFAT5 wird nicht vorherrschend in Lymphozyten exprimiert, nicht CaN abhängig reguliert und liegt kontinuierlich im Zellkern vor. Im Folgenden wird NFAT5 nicht näher betrachtet (132, 134, 135).

Die konventionellen NFAT Isoformen besitzen neben den veränderlichen N und C terminalen Domänen, eine regulatorische und eine DNA bindende Domäne. Die regulatorische Domäne beinhaltet die Kernlokalisierungssequenz und eine Bindungsstelle für die Phosphatase CaN, die sich durch die konservierte PxlIT Sequenz auszeichnet (132, 136). Erfolgt nach der TZR Stimulation die CaN abhängige Dephosphorylierung der Serinreste wird durch eine Konformationsänderung die Kernlokalisationssequenz frei. Das aktivierte NFAT gelangt in den Nukleus (133). Im Zellkern bindet NFAT an die regulatorischen DNA Domänen seiner Zielgene, z.B. IL-2. Durch die kooperative Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, insbesondere mit AP1, wird eine optimale DNA Bindung und transkriptionelle Aktivität realisiert (133, 137). Neben IL-2 reguliert NFAT weitere für die T-Zell Antwort bedeutende Zytokine, wie IL-4 und IFN $\gamma$  (132, 133).

Um die Lokalisierung von NFAT im Zellkern, die hohe DNA Bindungsaffinität und die NFAT abhängige Gentranskription aufrecht zu erhalten, ist eine kontinuierliche CaN Aktivität erforderlich (135). Ein Abfallen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration oder die Hemmung der CaN Aktivität durch die Behandlung mit Cyclosporin A (CsA) (siehe Abs. 1.6), führt zur sofortigen Rephosphorylierung von NFAT und dem Export aus dem Zellkern. Die NFAT Rephosphorylierung wird u.a. durch die konstitutiven Kinasen CK1 (Casein Kinase 1) und GSK3 (Glykogensynthase Kinase 3) vermittelt (138, 139).

Die Proteine NFATc1 und NFATc2 sind die am häufigsten in peripheren T-Zellen vorkommenden NFAT Isoformen. Sie haben stark überlappende Funktionen, aber unterscheiden sich bemerkenswerterweise sehr in der Form ihrer Expression (140). In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Isoform NFATc1 betrachtet. NFATc1 wird stark durch eine TZR abhängige Aktivierung induziert und durch NFATc2 sowie durch sich selbst, in einer autoregulatorischen Schleife weiter amplifiziert. Im Gegensatz dazu wird die NFATc2 Isoform konstitutiv in T-Zellen synthetisiert (140, 141).

### 1.5.3 T-Zell Stimulation *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Stimulation der T-Zellen *in vitro*. Um möglichst physiologische Stimulationsbedingungen zu simulieren, wurden verschiedene Stimulanzen verwendet.

Monoklonale Antikörper gegen CD3 und gegen CD28 simulieren eine TZR Aktivierung mit entsprechendem Kostimulus und der darauf aufbauenden Signalprozesse. Diese Antikörperstimulation vermittelt eine angemessene T-Zell Aktivierung mit Zytokinproduktion

und Proliferation (142). Die monoklonalen Antikörper gegen CD3 und gegen CD28 werden löslich oder an die Zellkulturplatte gebunden eingesetzt.

Des Weiteren können bestrahlte APZ in Kombination mit dem Superantigen SEB (*Staphylococcus* Enterotoxin B) eine adäquate T-Zell Antwort mit IL-2 Expression und T-Zell Proliferation induzieren. SEB wird von *Staphylococcus aureus* produziert und über MHCII der APZ den T-Zellen präsentiert, wo SEB seine Wirkung als potenter Aktivator entfalten kann (143, 144).

Unter der Verwendung der membrangängigen Substanzen PMA (Phorbol-12-myristyl-13-acetat) und Ionomycin wird dagegen der initiale Signalkomplex, der sich unmittelbar an die TZR bzw. Kostimulusaktivierung anschließt, umgangen (145). Das Calciumionophor Ionomycin verursacht einen massiven  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom und aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Signalwege, wie den CaN/NFAT Signalweg (123). PMA wirkt direkt auf die PKC, aktiviert diese und die sich anschließenden Signalprozesse (146) (siehe Abb. 1.3).

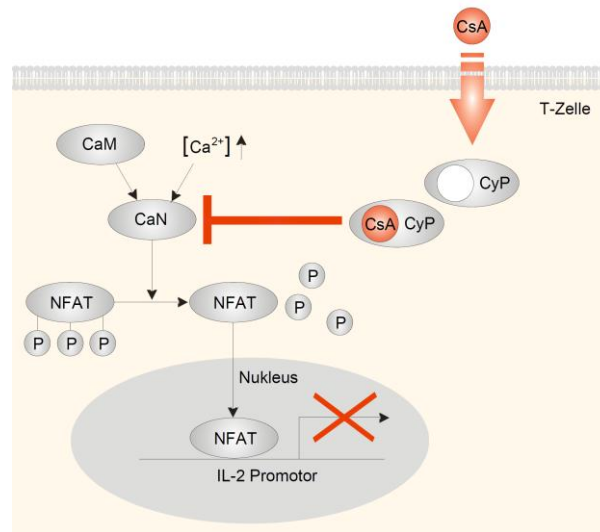
## 1.6 CsA inhibiert die CaN/NFAT abhängige Signaltransduktion

Die Abstossungsreaktion von Organen und die „Transplantat gegen Wirt“ Reaktion stellen schwerwiegende immunologische Probleme in der Transplantationsmedizin dar und limitieren diese potenziell lebensrettenden Maßnahmen (135).

Der 1976 erstmals aus dem Pilz *Tolypocaldium inflatum* isolierte Metabolit CsA (147) ist eines der potentesten Immunsuppressiva. Seit dem Beginn der klinischen Anwendung 1983 revolutionierte dieses zyklische, aus elf Aminosäuren bestehende Peptid die Transplantationsmedizin und trägt wesentlich zur Verbesserung der Überlebensraten der Patienten bei (135, 148, 149). Die biologische Verfügbarkeit und die systemische Beseitigung des CsA wird durch das Cytochrom P450 System in der Leber kontrolliert (150). CsA inhibiert die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Serin/Threonin Phosphatase CaN, indem es mit seinem intrazellulären Rezeptor, dem Immunophilin Cyclophilin (CyP), komplexiert (151, 152). Immunophiline sind weitverbreitete Enzyme mit einer Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Aktivität und nehmen neben der Proteinfaltung verschiedene weitere Funktionen innerhalb der Zelle wahr (153). Die *cis-trans* Isomerase Aktivität des CyP wird durch die Bindung von CsA inhibiert. Der CsA/CyP Komplex ist ein nicht kompetitiver Inhibitor für CaN und blockiert den Zugang zum aktiven Zentrum von CaN und dessen NFAT Bindungsstelle (154-156). Die Dephosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT wird unterdrückt (siehe Abb. 1.4).

Die Inhibierung der NFAT abhängigen Gentranskription führt zur Reduzierung oder Blockierung der Expression verschiedener Zytokine, z.B. IL-2 oder  $\text{IFN}\gamma$  (157), Oberflächenmoleküle, z.B. CD25 und CD134 (158) und anderer durch die T-Zell Aktivierung

induzierte Proteine (159). Infolgedessen wird die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen verhindert (160, 161).



**Abb. 1.4 Der CsA/CyP Komplex inhibiert die CaN abhängige Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen.**

CaM und  $Ca^{2+}$  aktivieren die Serin Theronin Phosphatase CaN. CaN initiiert über die NFAT Dephosphorylierung die NFAT abhängige IL-2 Gentranskription. Das Immunsuppressivum CsA bindet seinen intrazellulären Rezeptor CyP. Der CsA/CyP Komplex inhibiert die CaN Aktivität und führt dadurch zum Abbruch der CaN/NFAT abhängigen Gentranskription und der IL-2 Expression.

Die immunsuppressiven Eigenschaften von CsA sind nicht nur in der Transplantationsmedizin, sondern auch für die Therapie von Autoimmun- und allergischen Erkrankungen von großer Bedeutung (siehe Abs. 1.7.6).

## 1.7 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD), auch als endogenes Ekzem oder Neurodermitis bezeichnet, ist eine häufig auftretende, multifaktoriell verursachte, chronisch-entzündliche und ekzematöse Erkrankung der Haut. Ein sehr starker und unerträglicher Juckreiz, sehr trockene Haut, entzündliche Hautläsionen und kutane Hyperreaktivität sind die Hauptmerkmale dieser Erkrankung (162-164). Das breite klinische Spektrum reicht von einer milden Form mit nur wenigen trockenen, ekzematösen Stellen bis hin zu einer schweren Form mit großflächigem, entzündlichem Hautausschlag. Die AD weist mitunter einen stark wechselhaften Verlauf auf (162-164) und hat einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten (163, 165, 166). Neben der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale zählt die AD zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen. Die Atopie zeichnet sich durch eine Hyperreaktivität der Haut bzw. Schleimhaut gegen harmlose und ungefährliche Umweltfaktoren aus (162, 167, 168) und ist mit einer erhöhten Immunglobulin E (IgE) Bildung assoziiert (169).

### 1.7.1 Epidemiologie

Die AD ist in Industriestaaten weit verbreitet. Die lebenslange Prävalenz der AD beträgt 10 - 20 % für Kinder und 1 - 3 % für Erwachsene (162). Üblicherweise tritt AD im frühen Kindesalter auf, kann aber auch bis ins Erwachsenenalter andauern oder erst im Erwachsenenalter beginnen (166, 170). In den letzten 30 Jahren hat sich die Prävalenz in den Industriestaaten verdoppelt bis verdreifacht. Länder, in denen ein bäuerlicher und agrarwirtschaftlicher Lebensstil vorherrscht, weisen eine wesentlich geringere Prävalenz für AD auf. Man vermutet daher, dass die sich ändernden Lebensumstände und Umwelteinflüsse in den Industriestaaten, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von AD spielen (162, 171).

### 1.7.2 Diagnostik

Die Diagnosestellung der AD erfolgt klinisch, da es keinen spezifischen, diagnostischen, einfach in einem Labor zu messenden, Marker gibt. Dabei orientiert sich die Diagnosestellung der AD an den Kriterien von Hanifin und Rajka und basiert auf folgenden verschiedenen klinischen Befunden: Juckreiz, ekzematöse Morphologie, Ekzeme im Gesicht und an Streck- und Beugeseiten sowie chronisch rezidivierender Verlauf und Familienanamnese für atopische Erkrankungen (167, 172). Diagnostische Tests in der Klinik dienen zur Identifizierung einer assoziierten Allergie oder Sensibilisierung und der Ermittlung sämtlicher Einfluss- und Provokationsfaktoren. Mit Hilfe von Blutuntersuchungen können erhöhte IgE Antikörper oder allergenspezifische IgE Antikörperspiegel im Blutserum festgestellt werden. Auch die Ermittlung einer vorliegenden Eosinophilie ist bei einer Manifestation der AD wahrscheinlich (173-176). Ein Scoring System dient zur Ermittlung und Objektivierung des Schweregrades der AD. Dieser SCORAD (Scoring of atopic dermatitis) Index ermöglicht die Beobachtung und Beurteilung des Schweregrades und wird mit Hilfe verschiedener klinischer Parameter berechnet (siehe Gleichung 1). Dabei fließen die Intensität und die Verteilung der betroffenen Hautareale sowie die subjektiven Symptome, Juckreiz und Schlaflosigkeit, mit in die Berechnung ein (175, 177).

$$\text{SCORAD Index} = \frac{A}{5} + \frac{7 \cdot B}{2} + S \quad (1)$$

A = Ausbreitung

B = Intensität

S = Subjektive Symptome

Handelt es sich um eine leichte Manifestation der AD, so liegen die SCORAD Werte zwischen 1 – 25. Bei Werten zwischen 25 – 50 liegt eine mittel schwere Form der AD vor und bei Werten > 50 handelt es sich um eine schwere Verlaufsform der AD (175).

### 1.7.3 Ätiologie

Die AD zeichnet sich durch eine sehr komplexe Ätiologie aus (164). Der klinische AD Phänotyp ist ein Produkt aus vielschichtigen Wechselwirkungen zwischen genetischen Komponenten (178), Defekten in der Funktion der Hautbarriere, Umweltfaktoren und systemischen und lokalen immunologischen Prozessen (162).

#### **Genetische Prädisposition**

Die Rolle genetischer Faktoren in der AD wird durch Zwillingsstudien (179) belegt und dadurch unterstrichen, dass der größte Risikofaktor an AD zu erkranken eine positive Familienanamnese ist (180). Die pathologische Relevanz verschiedener Genregionen, z.B. Gene für die Th2-Zytokine IL-3, IL-4, IL-5 und IL-13, konnten für die AD identifiziert werden (181). Eine Funktionsverlustmutation im Filaggrin Gen liegt bei mehr als 30 % der AD Patienten vor. Da Filaggrin ein Schlüsselprotein bei der terminalen Differenzierung der Epidermis ist, wird diese Mutation im Filaggrin Gen für Defekte in der Hautbarriere und somit für eine erhöhte Hautreaktion gegen Reizstoffe verantwortlich gemacht (182-186).

#### **Umwelteinflüsse**

Genetische Faktoren können aber nicht allein für den rapiden Anstieg der AD Prävalenz innerhalb relativ kurzer Zeit verantwortlich gemacht werden (171, 187) (siehe Abs. 1.7.1). Besonders in Ländern mit einem westlich orientierten Lebensstil und starker Urbanisierung ist eine steigende Krankheitshäufigkeit zu beobachten. Dies wird u.a. der Reduzierung frühkindlicher Infektionen, der Schadstoffbelastung der Luft und der erhöhten Allergenexposition in Innenräumen zugeschrieben (187, 188). Auch die westliche Ernährung, die geringe Familiengröße, ein hoher sozioökonomischer Status, der Gebrauch von Antibiotika, emotionale Faktoren und Stress scheinen Einfluss auf die AD Manifestation zu nehmen (171, 187).

#### **Hautbarrieredefekt**

Die Haut stellt die Grenzfläche zwischen dem Körper und der Umwelt dar. Die erhöhte Permeabilität der Haut für Antigene und Reizstoffe wird durch eine veränderte Lipidzusammensetzung der Hornschicht (*Stratum corneum*) verursacht, die u.a. auf

Mutationen im Filaggrin Gen zurückzuführen ist. Diese hautkonstitutionellen Abweichungen führen zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust, sehr trockener Haut (164, 170, 185) und zur Verschiebung des pH Wertes in den alkalischen Bereich (189). Zudem neigen AD Patienten zu bakteriellen und viralen Hautinfektionen, welche die chronische Entzündung der Haut weiter verschlimmern (170, 185). Eine Besiedlung der Haut mit *Staphylococcus aureus* ist in über 90 % der AD Patienten nachzuweisen (170). Dabei tragen die exogenen Proteasen von *Staphylococcus aureus* oder von Hausstaubmilben zusätzlich zur Beeinträchtigung der Hautbarriere bei (170, 190).

### **Immunologische Faktoren**

Neben zahlreichen lokalen immunologischen Prozessen zeichnen sich AD Patienten durch verschiedene systemische immunologische Auffälligkeiten aus (190). Das Ungleichgewicht zwischen der Th1- und Th2-Immunantwort ist charakteristisch für die AD. Dabei nehmen die T-Zellen eine zentrale Rolle bei den immunologischen Aspekten der AD ein (162, 191). Neben der T-Zell Dysbalance sind die bereits erwähnten abnorm erhöhten IgE Serumwerte und eine vorliegende Eosinophilie charakteristisch für diese Erkrankung (185, 191). Im Folgenden werden die verschiedenen und komplexen Wechselwirkungen der einzelnen immunologischen Komponenten erläutert.

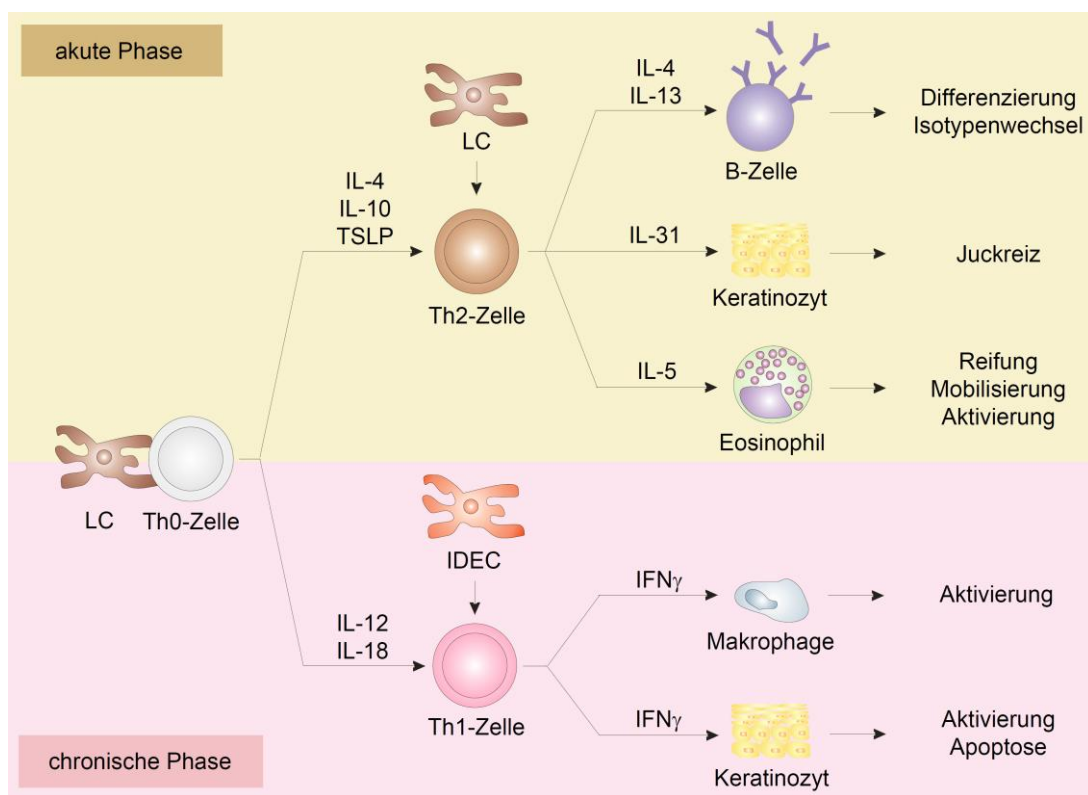
#### **1.7.4 Pathogenese**

Die AD ist eine systemische Erkrankung mit einer kutanen Manifestation (162, 168, 191) und zeichnet sich durch zwei Phasen aus. Th2-Zytokine dominieren die initiale, akute Phase der AD. Die chronische, zweite Phase ist durch eine vermehrte Aktivierung von Th1-Zellen gekennzeichnet und mit einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion gegen harmlose Umweltantigene (z.B. Pollen, Hausstaubmilben) assoziiert (164, 192).

#### **Akute Phase**

Die beeinträchtigte Hautbarriere führt bei AD Patienten zu sehr trockener, spröder Haut und resultiert in einer erhöhten Permeabilität für Allergene und Reizstoffe (193). Die in die Haut eindringenden Allergene binden an die hochaffinen IgE Rezeptoren FcεRI (Fcε Rezeptor I) der epidermalen Langerhans Zellen (LC). Die LC zählen zu den dendritischen Zellen, stellen hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen dar und exprimieren in AD Patienten sehr hohe Mengen des FcεRI (194). Nach erfolgter Migration in regionale Lymphknoten und der Antigenprozessierung innerhalb der LC, wird das Antigen über MHCII naiven T-Zellen präsentiert und induziert die Th2-Differenzierung und Expansion (164, 168, 170, 185, 195).

Die Generierung dieser allergenspezifischen Th2-Zellen kann als initialer Event der Entwicklung einer allergischen Erkrankung angesehen werden (196). Die Th2-Zellen zirkulieren im Blutstrom und können über die Expression von CLA (Cutaneous leucocyte-associated antigen) und dessen Bindung an das von Endothelzellen exprimierte L-Selektin in die Haut gelangen (83, 164, 185, 197). Im Gegensatz zu gesunder Haut weisen selbst nicht entzündete Hautregionen von AD Patienten T-Zell Infiltrate auf (83, 162). Die durch LC reaktivierten Th2-Zellen exprimieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-31, die in der initialen Phase der AD vorherrschen (162, 164, 170) und vermitteln u.a. die für die AD charakteristische Eosinophilie, die erhöhten IgE Serumwerte (193) und den typischen Juckreiz der Haut (168, 170, 185) (siehe Abb. 1.5).



**Abb. 1.5 Th-Zell vermittelte AD Pathogenese.**

Die LC induzierte Differenzierung der naiven Th0-Zellen zu Th2- (akute Phase) oder Th1- (chronische Phase) Zellen wird jeweils durch die Zytokine IL-4, IL-10, TSLP bzw. IL-12 und IL18 unterstützt. Die Th-Zellen schütten nach Aktivierung durch die LC bzw. IDEC Zytokine aus, die auf verschiedene Zelltypen wirken und ihre Effektorfunktionen vermitteln.

Die Th2-Prädominanz in der akuten Phase wird durch verschiedene Faktoren weiter verstärkt. Dazu gehören das von Keratinozyten ausgeschüttete TSLP (Thymic stromal lymphopietin), das von DZ produzierte IL-10 und das von Mastzellen, Eosinophilen und Th2-Zellen selbst exprimierte IL-4 (162, 170, 185). Das Th2-Zytokin IL-4 wirkt darüber hinaus zusammen mit IL-13 auf die B-Zell Differenzierung, indem der Isotypenwechsel zu IgE unterstützt wird (168, 170). IL-4 trägt so entscheidend zu den erhöhten IgE Werten im

Blutserum von AD Patienten bei (193). Das Th2-Zytokin IL-5 induziert die Reifung und Mobilisierung von Eosinophilen (168, 170) und fördert gemeinsam mit GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und RANTES (Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) die Entstehung der für die AD typischen Eosinophilie (185, 198). Die aktivierten Eosinophilen exprimieren potente zytotoxische Proteine und chemische Mediatoren, die die Gewebeentzündung unterstützen (185, 198). Eine weitere Amplifizierung der Entzündungsreaktion erfolgt durch verschiedene von Keratinozyten exprimierte Zytokine und Chemokine, die zur Extravasation von inflammatorischen Zellen in die Haut führen (162, 168). Durch Hautverletzungen, mechanische Reize, z.B. Kratzen oder mikrobielle Toxine werden Keratinozyten aktiviert. Es folgt die Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Mediatoren wie TSLP, GM-CSF, TNF $\alpha$  und RANTES (162, 170, 185). Diese entzündungsfördernden Zytokine binden an ihre Rezeptoren auf vaskulären Endothelzellen, wodurch diese zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt werden. Das führt zur Transmigration von weiteren infiltrierenden Zellen. Entlang eines chemotaktischen Gradienten wandern diese inflammatorischen Zellen zum Ort der Infektion/Verletzung (185).

Während der akuten Phase wird eine weitere Population der dendritischen Zellen angelockt, die IDEC (Inflammatorische dendritische epidermale Zelle). Sie werden aus zirkulierenden oder dermalen Vorläufern rekrutiert und sind nur in entzündlichen, veränderten, läsionalen Hautregionen zu finden. Durch ihre sehr hohe Expression an Fc $\epsilon$ RI stimulieren sie die Entzündungsreaktion in der Haut zusätzlich (170, 199). Zudem zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie vornehmlich die Th1-Zytokin Produktion in T-Zellen unterstützen (185).

### **Chronische Phase**

Die initiale, durch Th2-Zellen charakterisierte, akute Phase geht nach etwa 24 – 48 h in die durch Th1-Zellen dominierte, chronische Phase über (200), die mit einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion assoziiert ist (197). Eosinophile, IDEC und Makrophagen fördern durch die Sekretion von IL-12 und IL-18 die Generierung von IFN $\gamma$  und IL-2 ausschüttenden Th1-Zellen und leiten somit die chronische Phase der AD ein (162, 164, 185, 198, 201). Das Th1-Zytokin IFN $\gamma$  ist ein potenter Aktivator für Makrophagen und Keratinozyten (185, 201) (siehe Abb. 1.5). Die Keratinozyten sorgen für die weitere Rekrutierung von T-Zellen in die Haut (197). Neben der aktivierenden Wirkung des IFN $\gamma$  auf Keratinozyten, vermitteln die Th1-Zellen über die IFN $\gamma$  Produktion auch die Fas abhängige Apoptose in Keratinozyten (185). Die epidermalen, apoptotischen Keratinozyten lösen sich aus dem Zellverband und es kommt zur interzellulären Ödembildung (Spongiose) und zum Freiwerden potenzieller Autoantigene (185, 197). Die chronische Phase der AD ist auch

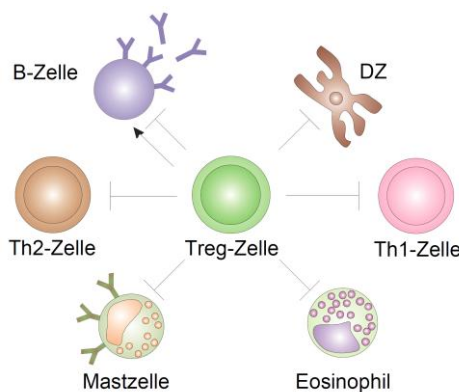


durch Gewebeveränderungen geprägt, die durch die Zytokine IL-11 und TGF $\beta$ 1 vermittelt werden (168, 185).

Die T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der AD, da sie über die Zytokin Expression eine Vielzahl von Effekten vermitteln, die zur Pathogenese der AD beitragen.

### Treg-Zellen

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass bei allergischen Erkrankungen die Th-Zellen durch die Population der Treg-Zellen supprimiert werden können (202). Mit Hilfe der in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen, verschiedenen inhibitorischen Mechanismen können die Treg-Zellen die unerwünschte Aktivität von Th1- und Th2-Zellen regulieren. Über die Reduzierung der Th1/Th2-Zytokine üben die Treg-Zellen erheblichen Einfluss auf die Differenzierung, die Aktivierung, das Überleben, die Rekrutierung verschiedener Zelltypen und die Gewebeumgestaltung in der Haut aus (196).



**Abb. 1.6 Die Treg-Zell vermittelte Suppression und Regulierung verschiedener AD relevanter Zelltypen.** Die Treg-Zellen wirken immunmodulatorisch auf die Th1/Th2-Zellen, B-Zellen, Eosinophilen, DZ und Mastzellen.

Darüber hinaus beeinflussen Treg-Zellen auch direkt die Funktion verschiedener, mit AD assoziierter Zelltypen. Die Zytokine TGF $\beta$  und IL-10 supprimieren Eosinophile, Mastzellen, inflammatorische DZ und B-Zellen. B-Zellen werden durch TGF $\beta$  und IL-10 nicht nur in ihrer IgE Produktion gehemmt, sondern gleichzeitig zur Synthese der nicht entzündlichen Ig Isotypen IgG4 und IgA angeregt (196, 203) (siehe Abb. 1.6).

### 1.7.5 Therapieformen

Bisher ist keine Behandlungsform in der Lage die AD vollständig und dauerhaft zu heilen. Die AD Therapie fokussiert sich darauf, den Juckreiz zu reduzieren, die mikrobielle Kolonialisierung einzudämmen, die Störungen in der Hautbarriere auszugleichen und Entzündungsreaktionen zu reduzieren. Neben der Basistherapie, die sich aus Hautpflege

und der Vermeidung spezifischer und unspezifischer Triggerfaktoren zusammensetzt, spielt die Aufklärung der Patienten über die Hautpflege und Risikofaktoren eine wesentliche Rolle (163, 175, 204).

Die bei der Lokalthherapie zur Anwendung kommenden hydratisierenden oder rückfettenden Salben und Lotionen dienen der Stabilisierung der Barrierefunktion der Haut und somit der verbesserten Abschirmung von Allergenen und Reizstoffen. Die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen, Glucocorticoiden und den Calcineurin Inhibitoren Pimecrolimus und Tacrolimus in der Lokalthherapie dient der Reduzierung des Juckreizes und wirkt entzündungshemmend (175, 204) (siehe Abb. 1.7).

↑ Intensität der Erkrankung	schwere AD	systemische Therapie (z.B. CsA) Lichttherapie
	moderate AD	Lokalthherapie mit Calcineurin Inhibitoren und/oder Glucocorticoiden
	leichte AD	Lokalthherapie mit Glucocorticoiden und/oder Calcineurin Inhibitoren antiseptische und juckreizstillende Wirkstoffe
	trockene Haut	Basispflege der Haut Vermeidung der Provokationsfaktoren

**Abb. 1.7 Stufentherapie bei AD Patienten.**

Die Therapieform richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung.

Neben der Anwendung von Antihistaminen, Corticosteroiden und dem Immunsuppressivum CsA (siehe Abs. 1.6) bei der systemischen Therapie von AD kann auch die Bestrahlung mit hochdosiertem UV Licht (311 nm; 340 - 400 nm) durch die entzündungshemmende Wirkung zur Linderung beitragen (175, 204) (siehe Abb. 1.7).

### 1.7.6 CsA in der AD Therapie

Die systemische Behandlung mit CsA erfolgt in AD Patienten, wenn ihre Erkrankung nicht durch eine Lokalthherapie zu kontrollieren ist (205). Wie bereits in Abschnitt 1.6 beschrieben, wirkt CsA auf die Aktivität der Phosphatase CaN, einem entscheidenden Knotenpunkt innerhalb der T-Zell Aktivierung und inhibiert u.a. die NFAT Aktivierung und IL-2 Genexpression.

Die Anwendung des CsA in der AD Therapie ist effektiv und wirksam (206) und führt zur Verbesserung der klinischen Symptome (206, 207). Allerdings zeichnet sich CsA durch eine geringe therapeutische Breite aus (208). Für die Anwendung in der Klinik bedeutet das, dass geringe CsA Konzentrationsunterschiede entscheiden, ob eine angemessene Unterdrückung des Immunsystems vorliegt oder zu starke unerwünschte Nebenwirkungen wie

Nierenschädigung, Neurotoxizität, Bluthochdruck oder ein erhöhtes Infektions- und Hautkrebsrisiko auftreten (135, 209, 210). Engmaschige Kontrollen der Blutdruckwerte und Nierenfunktionsparameter sind daher während der CsA Therapie unabdingbar (211). Das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen ist von der Dosis und der Dauer der Therapie abhängig. Im Vergleich zur Transplantationsmedizin, bei der CsA in Dosen von 15 – 17 mg/kg/d eingesetzt werden (212-214), ist die in der AD Therapie übliche CsA Dosis von 2,5 – 5 mg/kg/d wesentlich geringer (204, 211, 215). Die Dauer der CsA Anwendung in der AD Therapie richtet sich nach individuellen patientenabhängigen medizinischen Bedingungen und kann als Kurzzeit- oder Langzeittherapie erfolgen (204). Dabei sind CsA Langzeittherapien mit einer Dauer von 6 Monaten oder länger durchaus üblich (215-217).

Da CsA ein lipophiles Protein ist, weist es eine hohe Variation der biologischen Verfügbarkeit zwischen den einzelnen Patienten auf (218, 219). Daher ist die zum Erzielen eines bestimmten Effektes einzusetzende CsA Dosis individuell sehr verschieden. Eine kontinuierliche Überwachung der CsA Einstellungen in der Klinik ist demnach unabdingbar. Aus diesem Grund wurden umfassende Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des CsA durchgeführt (208, 220). Allerdings ist die Aussagekraft dieser diversen pharmakokinetischen Parameter (zeitlicher Verlauf der CsA Konzentration, CsA Abbau, über die Zeit aufintegrierte CsA Konzentration, Vergleich der maximalen mit der minimalen CsA Konzentration) gering (221, 222). Auch die CsA Dosisangabe und die im Blut messbare CsA Konzentration sind nicht geeignet, um eine präzise Aussage über die klinische Wirksamkeit oder die toxischen Effekte der eingesetzten CsA Menge zu treffen (223-226).

Das Ziel, die CsA Anwendung effektiver und sicherer zu gestalten, erfordert neue Strategien und aussagefähige Testsysteme. Diese neuen, vielversprechenden Testsysteme beziehen sich auf die Funktion von Immunzellen (227-229). Die Stimulation im Vollblut und die Messung direkter oder indirekter CsA Angriffspunkte in T-Zellen stellt eine erfolgsversprechende Strategie dar. Diese funktionellen CsA Testsysteme basieren auf der Messung der CaN Aktivität (230, 231), der Zytokinexpression (208, 232-235), der Proliferation (236, 237) oder der Adenosin Triphosphat (ATP) Produktion (238-240).

Die klinische Überwachung der CsA Einstellung bedarf eines einfachen, schnellen und zuverlässigen biologischen Testsystems, das eine individuelle CsA Dosierung ermöglicht.

## 1.8 Zielstellung der Arbeit

Die Phosphatase CaN nimmt innerhalb der TZR vermittelten Signalwege eine entscheidende Rolle ein. In aktivierten T-Zellen leistet CaN über die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT einen wesentlichen Beitrag zur IL-2 Expression. Die Inhibierung des CaN durch das Immunsuppressivum CsA führt zu suboptimalen Stimulationsbedingungen, die die TZR abhängige Entwicklung der einzelnen T-Zellen beeinflussen. Bekannt ist, dass die subimmunogene Stimulation naiver, muriner T-Zellen sich durch die Induktion FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen auszeichnet (59, 60). Es ist daher anzunehmen, dass neben der CsA abhängigen Reduzierung der T-Zell Aktivierbarkeit, eine CsA bedingte Beeinflussung der Treg-Zell Population möglich ist. Die Treg-Zellen sind insbesondere für Patienten mit allergischen Erkrankungen, wie der AD, oder Autoimmunerkrankungen von besonderer Bedeutung (27, 62), da die Treg-Zellen die Aktivierung, die Expansion und die Funktion anderer T-Zellen supprimieren können und somit die Reaktivität gegen körperfremde Antigene und Autoantigene regulieren (62). In dieser Arbeit wurden AD Patienten untersucht, die eine Therapie mit gering dosiertem CsA erhielten. Ob die Therapie mit gering dosiertem CsA Einfluss auf die Population der Treg-Zellen nahm und inwieweit die T-Zellen der AD Patienten in ihrer Fähigkeit aktiviert zu werden beeinflusst wurden, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Dazu sollte:

1. ein Testsystem zur Bestimmung der Effekte des biologisch wirksamen CsA im Vollblut etabliert werden. Die durchflusszytometrische Einzelzellanalyse der IL-2 und NFATc1 Expression in stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen sollte die konzentrationsabhängige, spezifische und praktikable Messung der Effekte des direkt im Blut vorliegenden biologisch wirksamen CsA ermöglichen.
2. die IL-2 Expression CD3<sup>+</sup> T-Zellen, aus dem peripheren Blut von CsA behandelten AD, mit Blutproben unbehalteter AD Patienten bzw. gesunder Kontrollspender verglichen werden. Parallel sollte die Ermittlung des Schweregrades der Erkrankung, des SCORAD Index, eine Aussage über die klinisch relevante Wirksamkeit des gering dosierten CsA in den Patienten ermöglichen.
3. der Einfluss der Therapie mit gering dosiertem CsA auf die Population der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den AD Patienten untersucht werden.
4. der CsA vermittelte Einfluss auf den Phänotyp, die Funktionalität, die Stabilität und die Anzahl der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in den AD Patienten sowie *in vitro* auf die TZR vermittelte Proliferation der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Tab. 2.1 Chemikalien und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Beriglobin	ZLB Behring, Marburg
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
CsA	MPI für Enzymologie, Halle/Saale
CD4 Mikropartikel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
FACS Lyselösung (10x)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Permeabilisierungslösung 2 (10x)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat	eBioscience, San Diego (USA)
Fixierungs-/Permeabilisierungsverdünnung	eBioscience, San Diego (USA)
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
MicroScint-O Szintillationscocktail	Perkin Elmer, Mailand (I)
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, San Diego (USA)
PMA	Sigma, Taufkirchen
PKH26	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid (PJ)	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	Sigma, Taufkirchen
Tritium markiertes Thymidin ([3H] TdR)	Hartmann, Braunschweig
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Carboxyfluorescein Diacetat, succinimidyl Ester (CFDA-SE)	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.2 Antikörper

Tab. 2.2 Zur T-Zell Stimulation verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Hersteller
CD3	UCHT1	Becton Dickinson, Heidelberg
	OKT3	eBioscience, San Diego (USA)
CD28	CD28.2	Becton Dickinson, Heidelberg
	15E8	Chemicon, Hofheim

Tab. 2.3 Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Konjugate	Hersteller
CD127	hIL-7R-M21	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25	2A3	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	UCHT1	FITC	DRFZ, hauseigen
	SK7	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4	TT1	PE,Cy5	DRFZ, hauseigen
CD8	GNII/134.D1	FITC, PE	DRFZ, hauseigen
CLA	HECA-452	PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
FoxP3	PCH101	FITC, PE	eBioscience, San Diego (USA)
	259D/C7	Alexa 488	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-2	MQ1-17H12	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG2a Isotyp	eBR2a	PE	eBioscience, San Diego (USA)
IgM Isotyp	eBRM	PE	eBioscience, San Diego (USA)
NFATc1	7A6	PE	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)

## 2.3 Puffer und Medien

Tab. 2.4 Verwendete Puffer mit Rezepturen

Puffer, Medien	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
PBS/BSA (pH 7,4)	PBS 0,5 % BSA (w/v)
PBS/BSA/Azid (pH 7,4)	PBS/BSA 0,2 % NaN <sub>3</sub> (v/v)
PBS/BSA/EDTA (pH 7,4)	PBS/BSA 2 mM EDTA
PBS/BSA/20 mM EDTA (pH 7,4)	PBS/BSA 20 mM EDTA
Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % Fötale Kälberserum 10 mM L-Glutamat 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 ml Streptomycin

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.5 Verbrauchsmaterialien und Hersteller**

Verbauchsmaterialien	Hersteller
Filterpapier	VWR, Wien (A)
Glasfaser Unifilter 96 GF7b	Perkin Elmer, Mailand (I)
LS Separationssäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lymphozytenseparationsmedium	PPA Laboratories, Pasching (A)
Nitrozellulosetransfermembran (0,45 µm)	Whatman, Dassel
Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellkulturplatten	Corning Incorporated, New York (USA); Nunc, Langensfeld

## 2.5 Geräte

**Tab. 2.6 Verwendete Geräte und Hersteller**

Geräte	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CASY Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
FACS Aria Zellsortiersystem	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Calibur System	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS LSRII System	Becton Dickinson, Heidelberg
FilterMate Zellerntevorrichtung 96	Perkin Elmer, Mailand (I)
Gammacell 40 Extractor	MDS Nordion, Ottawa, (CDN)
Heizblock Thermomixer Kompakt	Eppendorf, Hamburg
Heraeus BIOFUGE fresco	Thermo, Waltham (USA)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multifuge 3 S-R	Thermo, Waltham (USA)
Megafuge 1.0 R	Thermo, Waltham (USA)
TopCount NXT Szintillationszähler	Perkin Elmer, Mailand (I)

## 2.6 Analyse Software

**Tab. 2.7 Zur Analyse der experimentellen Daten verwendete Software**

Bezeichnung	Hersteller
CellQuest Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo FACS Analysesoftware	Tree Star, Inc., Ashland (USA)
GraphPad InStat	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
SigmaPlot	Systat Software, Erkrath

## 2.7 Biologisches Material

### 2.7.1 Buffy Coats

Für die Isolation von primären humanen T-Zellen wurden Buffy Coats von gesunden, anonymen Spendern verwendet. Buffy Coats fallen bei der Erythrozyten- und Blutplasmagewinnung aus Vollblutspenden an. Neben Thrombozyten und Leukozyten sind geringe Mengen an Erythrozyten und Blutplasma enthalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Buffy Coats wurden über den DRK Blutspendedienst Ost GmbH, Berlin bezogen.

### 2.7.2 Vollblutproben der Studienteilnehmer

In dieser Arbeit wurden heparinisierte Vollblutproben von 31 unbehandelten, 28 CsA behandelten (AD + CsA) und 3 AD Patienten nach Absetzen der CsA Therapie (AD nach CsA) verwendet. Die Vollblutproben von 27 gesunden Normalspendern wurden als Kontrollgruppe (K) analysiert (siehe Tab. 2.8).

Tab. 2.8 Eigenschaften und klinische Merkmale der Studienteilnehmer

Parameter	Testperson			
	K <sup>a</sup>	AD <sup>b</sup>	AD + CsA <sup>c</sup>	AD nach CsA <sup>d</sup>
Anzahl	27	31	28	3
Alter [Jahre]	38 ± 11	45 ± 12	45 ± 14	54 ± 8
Geschlecht, männlich/weiblich	11/16	16/15	13/15	0/3
SCORAD Index	-	54 ± 11	29 ± 11	n.d.
Asthma	0	6	5	0
CsA Dosis [mg/kg/d]	-	-	2,1 ± 0,4	-
CsA Serumkonzentration [µg/l]	-	-	72 ± 29	-

<sup>a</sup> gesunde Kontrollspender (K)

<sup>b</sup> unbehandelte AD Patienten (AD)

<sup>c</sup> AD Patienten, die mit gering dosiertem CsA behandelt werden (AD + CsA)

<sup>d</sup> AD Patienten, die die CsA Therapie bereits beendet haben (AD nach CsA)

Die unbehandelten AD Patienten im Alter von 22 - 68 Jahren zeigten eine moderate bis schwere AD und erfüllten die Kriterien nach Hanifin und Rajka (172). Die Ausprägung der klinischen Symptome wurde während der Therapie mit dem SCORAD Index (177) überwacht. Keiner der Patienten zeigte neben der AD andere Hauterkrankungen, doch waren sechs der AD Patienten an Asthma erkrankt.

Um die CsA Serum Konzentration möglichst konstant zu halten, erfolgte die Einnahme von 2,1 ± 0,4 mg/kg/d CsA in zwei Dosen, jeweils morgens und abends.

Alle teilnehmenden AD Patienten zeigten bereits zwei Wochen nach Beginn der Therapie eine Verbesserung der Symptome.

Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der Charité Berlin anerkannt und genehmigt.



## **3 Methoden**

### **3.1 Isolation CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut**

Um CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer angemessenen Reinheit und Ausbeute isolieren zu können, erfolgte zunächst die Präparation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus den Buffy Coats oder den heparinisierten Vollblutproben. Mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS) konnten anschließend die CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert werden.

#### **3.1.1 Isolation humaner mononukleärer Zellen**

Die Isolation humaner PBMC erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Heparinisiertes Vollblut oder der Inhalt eines Buffy Coats wurde 1:1 mit PBS/BSA verdünnt und vorsichtig über 12 ml Lymphozytenseparationsmedium (1,077 g/ml) geschichtet. Entsprechend der unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile passierten während der Zentrifugation bei 836x g, RT, 20 min und ohne Bremse Erythrozytenaggregate und tote Zellen das Lymphozytenseparationsmedium, während sich die mononukleären Zellen in einer Interphase zwischen Separationsmedium und Plasma anreicherten. Die Interphase mit den enthaltenen Lymphozyten wurde vorsichtig abgenommen und anschließend zweimal mit PBS/BSA gewaschen. Die Zentrifugationschritte erfolgten bei 304x g bei 4 °C für 10 min. Die PBMC wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### **3.1.2 Magnetische Zellsortierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die MACS vermittelte Zellsortierung erfolgte mit Hilfe spezifischer, an magnetische Mikropartikel gebundener Antikörper. Die aufzureinigende Zellsuspension wurde mit den magnetischen Mikropartikeln inkubiert. Beim Durchfluss durch eine in einem Dauermagneten eingespannte Säule wurden die durch die Antikörper magnetisch markierten Zellen zurückgehalten. Nicht magnetisch markierte Zellen passierten die Säule. Diese CD4<sup>+</sup> Zellsuspension enthielt u.a. zahlreiche APZ, die für T-Zell Stimulationen eingesetzt werden konnten (siehe Abs. 3.4.3). Die Eluation der auf der Säule zurückgehaltenen Zellen erfolgte durch das Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld. Die im Folgenden angegebenen Puffer- und Reagenzvolumen beziehen sich auf  $1 \times 10^8$  Zellen. Bei Verwendung anderer Zellzahlen wurden die verwendeten Volumen entsprechend angepasst. Die MACS vermittelte Zellsortierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte über positive Selektion mit Hilfe der an magnetische Mikropartikel gebundenen anti CD4 Antikörper. Zunächst wurde die Zellzahl der

frisch isolierten PBMC bestimmt (siehe Abs. 3.2). Nach erfolgter Zentrifugation bei 304x g, 4 °C für 10 min wurden die Zellen in 800 µl PBS/BSA resuspendiert. Die Zugabe von 1 mg/ml Beriglobin führte zur Absättigung der Fcγ Rezeptoren. Anschließend wurden 150 µl CD4 Mikropartikel zu den Zellen pipettiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation bei 304x g, 10 min, 4 °C) und in 3 ml PBS/BSA/EDTA resuspendiert wurden, erfolgte die magnetische Separation. Die eingesetzten LS Separationssäulen wurden im MACS Separator justiert und mit 5 ml PBS/BSA/EDTA äquilibriert. Die Zellsuspension wurde durch einen befeuchteten Preseparationsfilter gegeben, um Zellklumpen zu entfernen, die die Säule verstopfen könnten. Nicht markierte Zellen befanden sich im Durchlauf. Nachdem die Säule dreimal mit jeweils 3 ml PBS/BSA gewaschen wurde, erfolgte die Elution der durch CD4 Mikropartikel magnetisch markierten Zellen durch 5 ml PBS/BSA und Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld. Zur Bestimmung der Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde eine CD4<sup>+</sup> Oberflächenfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Messung durchgeführt (siehe Abs. 3.3.1).

### **3.2 Zellzahlbestimmung**

#### **3.2.1 Neubauerzählkammer**

Zur genaueren Bestimmung kleiner Zellzahlen wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. 10 µl Zellsuspension wurden 1:1 mit einer Trypanblau Lösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Das lichtmikroskopische Bild ermöglichte die Unterscheidung in vitale und tote Zellen. Trypanblau färbte die toten, deformierten Zellen auf Grund ihrer permeablen Membran an. Die Zellkonzentration A berechnet sich nach Gleichung 2.

$$A = B \times 10^4 \times VF \times V \quad (2)$$

A = Zellzahl [1/ml]

B = Mittelwert der 4 Großquadrate

V = Gesamtvolumen der Zellsuspension [ml]

VF = Verdünnungsfaktor, 2

#### **3.2.2 Zellzahlbestimmung mittels CASY**

Das CASY Zellzählgerät (Schärfe System GmbH, Reutlingen) diente zur elektronischen Erfassung der Zellzahl mittels Widerstandsmessung. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension in 10 ml PBS/Azid verdünnt. Das Gerät ermittelt aus 3 durchgeführten Messungen die Zellzahl

pro ml für ein angegebenes Größenspektrum und erlaubt die Unterscheidung von vitalen und toten Zellen. Es wurden nur Zellen mit einer Größe zwischen 5 – 12 µm berücksichtigt.

### 3.2.3 TruCOUNT Technologie

Die TruCOUNT Technologie (Becton Dickinson) diente zur Bestimmung der Zellzahl von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> Th-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen in Vollblutproben. TruCOUNT Röhrrchen beinhalteten ein Pellet aus 50.000 lyophilisierter Mikropartikel, die mit fluorochrommarkierten Antikörpern angefärbt werden konnten. 20 µl Färbelösung und 50 µl Vollblut wurden für 15 min bei RT in den TruCOUNT Röhrrchen inkubiert. Für die Färbelösung wurden anti human CD3-FITC (UCHT1), CD4-Cy5 (TT1) und CD8-PE (GNII/134.D1) markierte Antikörper und Beriglobin in PBS/BSA verdünnt. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse mit 450 µl 1x FACS Lyselösung für 15 min bei RT. Die durchflusszytometrische Analyse von 5.000 Mikropartikeln erlaubte die Bestimmung der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen A im Vollblut nach Gleichung 3.

$$A = \frac{C \times 50.000}{D \times V} \quad (3)$$

A = Zellzahl [1/µl]

C = CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell Anzahl

D = Anzahl an Mikropartikeln

V = eingesetztes Vollblutvolumen [µl], 50 µl

### 3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Separation von Zellen anhand ihrer Form, Struktur und ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms werden die Zellen einer Suspension vereinzelt und an verschiedenen Lasern (Argon: 488 nm; HeNe: 633nm; UV: 355 nm; Violet: 405 nm) vorbeigeführt. Photomultiplier ermöglichen die Messung des durch die Zellen gestreuten Lichtes. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) ein Maß für das Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird durch die Granularität der Zelle beeinflusst. Monoklonale Antikörper, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und an spezifische Zellstrukturen binden oder fluoreszierende Farbstoffe, die bestimmte Bestandteile der Zelle anfärben, erlauben eine weitere

Charakterisierung der Zellen. Die Laser regen die Fluorophore zur Emissionen an, die mit Hilfe von Detektoren gemessen wird und die Analyse der Zelleigenschaften ermöglicht.

Eine weitere bedeutende Anwendung der Durchflusszytometrie ist die fluoreszenz-vermittelte Zellsortierung (FACS) (siehe Abs. 3.3.2). Die FACS Technologie ermöglicht die Separation von Zellen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden können. Die Zellen passieren hintereinander aufgereiht in einem Flüssigkeitsstrom die Laser mit 488 nm, 633 nm und 405 nm des FACS Aria Systems. Mit Hilfe von Kondensatorplatten und elektrostatischer Aufladung ist es möglich die Zellen nach ihrer Oberflächenfärbung anzuziehen oder abzustoßen und entsprechend ihrer Fluoreszenzeigenschaften so zu sortieren (241).

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem FACS Calibur System und der CellQuest Software sowie dem FACS LSRII System unter Verwendung der FACS Diva Software durchgeführt. Die Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung erfolgte mit dem FACS Aria System und der FACS Diva Software. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde mit der FlowJo FACS Analyse Software durchgeführt.

### **3.3.1 Färbung auf Oberflächenmarker**

Lymphozyten lassen sich anhand der Expression verschiedener, spezifischer Oberflächenstrukturen eindeutig in individuelle Subpopulationen einteilen.

Die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz, wurden mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und mit 100 µl Färbelösung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung bestand aus PBS/BSA, 1 mg/ml Beriglobin zur Absättigung der Fcγ Rezeptoren und der konjugierten Antikörper gegen diverse Oberflächenmoleküle, z.B. CD4, CD25, CD127 oder CLA. Die Reaktion wurde mit PBS/BSA abgestoppt (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung von mindestens 1x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen am FACS Calibur System mit der CellQuest Software bzw. die Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung (siehe Abs. 3.3.2) oder die Weiterverarbeitung der Zellen (siehe Abs. 3.3.3).

### **3.3.2 Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung von Treg- und Teff-Zellen**

Die Isolation der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen und der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen erfolgt auf Grund der Expression ihrer Oberflächenmoleküle CD4, CD25 und CD127 (siehe Abs. 1.2.1).

Die frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abs. 3.1.2) wurden zentrifugiert (304x g, 10 min, 4 °C) und mit 100 µl / 5x10<sup>7</sup> Zellen einer anti human CD25-APC (2A3), CD127-PE (hIL-7R-M21) und 1 mg/ml Beriglobin haltigen Färbelösung für 30 min bei 4 °C gefärbt. Die Reaktion wurde mit 5 ml PBS/BSA abgestoppt. Nachdem die Zellen mit Hilfe eines Preseparationsfilters filtriert wurden, um größere Zellaggregate zu entfernen, erfolgte simultan die Sortierung der gewünschten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen und der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen (siehe Abb. 4.12) am FACS Aria unter Verwendung der FACS Diva Software. Anschließend wurden die sortierten Treg- und Teff-Zellen weiterverarbeitet (siehe Abs. 3.3.5 und Abs. 3.5).

### **3.3.3 Intrazelluläre Färbung**

#### **3.3.3.1 Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 in isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die bereits wahlweise auf die Oberflächenmarker CD4, CD25, CD127 und CLA gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abs. 3.3.1) wurden pelletiert (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Dabei wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen und 500 µl des 1:4 mit der Fixierungs-/Permeabilisierungsverdünnung gemischten Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrats eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit PBS/BSA und zwei weiteren Waschschriften mit 500 µl des in destilliertem Wasser verdünnten 1x Permeabilisierungspuffer (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C im Dunkeln mit 100 µl Färbelösung inkubiert. Für die Färbelösung wurden anti FoxP3-FITC/-PE (PCH101) bzw. anti FoxP3-Alexa488 (259D/C7) Antikörper in 1x Permeabilisierungspuffer verdünnt. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1x Permeabilisierungspuffer. 1x10<sup>5</sup> – 2x10<sup>5</sup> der in PBS/BSA resuspendierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden durchflusszytometrisch am FACS Calibur System analysiert.

#### **3.3.3.2 Färbung von NFATc1, IL-2 und CD3 in Vollblutproben**

Nach erfolgter Vollblutstimulation mit PMA und Ionomycin für 5 h wurden, um Zell-Zell-Kontakte zu lösen 100 µl 20 mM PBS/EDTA zu den Proben pipettiert, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Erythrozytenlyse erfolgte mit 5 ml einer in destilliertem Wasser verdünnten 1x FACS Lyselösung bei RT für 10 min. Nach einem Zentrifugationsschritt (500x g, 10 min, RT) wurde das Leukozytenpellet mit 400 µl in destilliertem Wasser verdünnter 1x FACS Permeabilisierungslösung 2 resuspendiert und 10 min bei RT permeabilisiert. Durch die Zugabe von 5 ml PBS/BSA/Azid wurde die Reaktion abgestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (500x g, 10 min, RT) wurde das Pellet mit 50 µl

Färbelösung für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Für die Färbelösung wurden anti CD3-FITC (UCHT1), anti IL-2-APC (MQ1-17H12) und anti NFATc1-PE (7A6) markierte Antikörper und Beriglobin in PBS/BSA verdünnt. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 1 ml PBS/BSA (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und Resuspension der Zellen in 300 µl PBS/BSA wurden die Proben am FACS Calibur System durchflusszytometrisch analysiert. Bei jeder Messung wurden  $2 \times 10^4$  CD3<sup>+</sup> Zellen aufgenommen.

### 3.3.4 Intrazelluläre Färbung mit PJ und DAPI

PJ ist ein fluoreszierendes Molekül mit einem Emissionsmaximum von 590 nm, das in tote Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, eindringen kann und über die Interkalation mit den Basen die DNA anfärbt. PJ kann die unversehrte, intakte Membran lebender Zellen nicht passieren und ermöglicht somit eine durchflusszytometrisch detektierbare Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen.

DAPI ist ebenfalls ein fluoreszierendes Molekül mit einem Emissionmaximum von 461 nm, das sich in AT reiche Regionen der DNA einlagert und die durchflusszytometrische Diskriminierung der lebenden von den toten Zellen ermöglicht.

Zur Überprüfung der Viabilität der zu messenden Zellen wurde direkt vor der durchflusszytometrischen Messung 1 µl einer 0,1 mg/ml PJ Lösung zu den Vollblutproben (siehe Abs. 3.3.3.2) bzw. 1 µl einer 0,1 mM DAPI Lösung zu der Treg/Teff-Zell Kokultur (siehe Abs. 3.3.5) pipettiert.  $2 \times 10^4$  CD3<sup>+</sup> Zellen der PJ gefärbten Vollblutproben wurden am FACS Calibur System und  $2 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen der DAPI gefärbten Kokulturen am FACS LSRII System analysiert.

### 3.3.5 Proliferationsfärbung isolierter Zellen mit CFSE und PKH26

CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl Ester) ist ein hochfluoreszierendes Molekül. Um die Zellen zufärben, erfolgt jedoch die Zugabe des lipophilen, nicht fluoreszierenden CFDA-SE. Erst die intrazelluläre, durch Esterasen vermittelte Spaltung des CFDA-SE in das hochfluoreszierende CFSE ermöglicht die kovalente und irreversible Bindung an langlebige zytoplasmatische Proteinstrukturen (242, 243). Ein weiteres, zur Detektion der Zellteilungen eingesetztes Molekül ist PKH26. PKH26 ist ein fluoreszierendes Molekül, das sich in die Zellmembran einlagert (244). Die Teilung der mit CFSE und PKH26 fluoreszenzmarkierten Zellen führt zu einer fortlaufenden Halbierung der Fluoreszenzintensität, die durchflusszytometrisch bei einem Emissionsmaximum von 518 nm für CFSE und 567 nm für PKH26 detektiert werden kann (244). Die Verwendung von CFSE und PKH26 ermöglicht die Anfärbung zweier verschiedener T-Zell Populationen, der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen

und der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen sowie die simultane Kultivierung und Messung der Proliferation dieser beiden Populationen. Die zu färbenden Treg- und Teff-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde anschließend in RT warmen PBS resuspendiert. CFSE wurde mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml und PKH mit einer Konzentration von 4x10<sup>-6</sup> mol/l eingesetzt. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei RT für exakt 3 min und 30 sec mit einer Zellkonzentration von 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml. Die Färbung wurde mit RPMI Medium abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI Medium (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) erfolgte die Behandlung mit CsA (siehe Abs. 3.4). Anschließend wurden die Treg/Teff-Zellen in einer Endkonzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml in mit anti CD3/CD28 Antikörpern beschichteten 96 Lochzellkulturplatten ausgesät (siehe Abs. 3.4.2). Nach einer Kultivierung von 96 h und einer DAPI Färbung (siehe Abs. 3.3.4) erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Treg/Teff-Zell Kokulturen. Es wurden 2x10<sup>4</sup> der in PBS/BSA resuspendierten CD4<sup>+</sup> T Zelle am FACS LSRII System analysiert.

### Proliferationsanalyse

Um die Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Proliferationsdaten einzelner Kokultur Experimente zu gewährleisten, wurde die Anzahl an Zellteilungen pro Ausgangszelle  $Z_p$  der CFSE und PKH26 markierten Zellgenerationen nach Gleichung 6 berechnet.

$$P = \sum_{i=1}^n \frac{X^i}{2^i} \quad (4)$$

$$Z = \sum_{i=1}^n \frac{X^i}{2^i} \times (2^i - 1) \quad (5)$$

$$Z_p = \frac{Z}{P} \quad (6)$$

P = Anzahl an Ausgangszellen

i = Generation, i = 0 bis i = n

$X^i$  = absolute Zellzahl der Generation i

Z = insgesamt durchlaufene Zellteilungen

$Z_p$  = Zellteilungen pro Ausgangszelle

### 3.4 Zellkultivierung und Stimulation

Die Kultivierung der heparinisierten Vollblutproben oder der in RPMI Medium mit 10 % fötalem Kälberserum ausgesäten, isolierten, humanen T-Lymphozyten erfolgte bei 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C.

War die Zugabe des Inhibitors CsA für das Experiment erforderlich, so wurde das in DMSO gelöste CsA 30 min vor Beginn der Stimulation zu den heparinisierten Vollblutproben oder den isolierten T-Zellen pipettiert. Um mögliche Effekte des DMSO auf die Zellaktivierung auszuschließen, wurde in alle nicht mit CsA behandelten Proben das entsprechende Volumen des Lösungsmittels DMSO pipettiert.

### **3.4.1 PMA/Ionomycin Stimulation in Vollblutproben**

1 ml heparinisiertes Vollblut wurde mit 50 ng/ml PMA und 2,5 µg/ml Ionomycin für 5 h bei 37 °C stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml des Proteintransporthemmers Brefeldin A, das eine Hemmung des Proteintransports vom endoplasmatischen Retikulum zum cis Golgi Apparat hervorruft und in einer intrazellulären Akkumulation der exprimierten Proteine, z.B. des Zytokins IL-2, resultiert und deren intrazelluläre Färbung erlaubt (siehe Abs. 3.3.3).

### **3.4.2 Anti CD3/CD28 Antikörper Stimulation isolierter Zellen**

Die Simulation einer physiologischen Stimulation einer T-Zellen über ihren TZR und den CD28 Korezeptor wurde mit anti CD3 und anti CD28 Antikörpern realisiert. Die CD3/CD28 Stimulation erfolgte einerseits durch die Zugabe von löslichen mit anti CD3/CD28 Antikörpern, andererseits durch an die Zellkulturplatten gebundene Antikörper.

#### **Stimulation mit löslichen Antikörpern**

Die Stimulation mit löslichen Antikörpern erfolgte über die direkte Zugabe der in RPMI Medium verdünnten Antikörper zu den bereits in 96 Lochzellkulturplatten ausgesäten Zellen. Es wurden 100 µL einer Antikörpersuspension mit 0,2 µg/ml anti CD3 (OKT3) und 0,5 µg/ml anti CD28 (15E8) pipettiert (siehe Abs. 3.5).

#### **Stimulation mit Antikörper beschichteten Zellkulturplatten**

Jede Vertiefung der verwendeten 96 Lochzellkulturplatten wurde mit 50 µl einer 0,1 µg/ml anti CD3 (UCHT1) bzw. 0,1 µg/ml anti CD28 (CD28.2) Antikörperlösung für 3 h bei 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C beschichtet. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellkulturplatten mit jeweils 200 µl RPMI Medium gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 304x g bei 4 °C für 10 min. Nachdem 100 µl RPMI Medium in die Vertiefungen vorgelegt wurden, konnten die Zellen des Kokulturversuches (siehe Abs. 3.3.5) ausgesät werden.



### 3.4.3 SEB Stimulation isolierter T-Zellen

Das durch *Staphylococcus aureus* produzierte Superantigen SEB kann in Kombination mit APZ zur T-Zell Stimulierung eingesetzt werden. Die CD4<sup>-</sup> APZ fallen bei der magnetischen Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an (siehe Abs. 3.1.2). Um ein Überwachsen der T-Zell Kultur zu vermeiden, wurden die APZ mit einem Gammacell 40 Exactor und einer  $\gamma$  Strahlung von 21,54 Gy behandelt. Die verwendete Strahlendosis ist für die APZ lethal, doch ihre antigenpräsentierende Eigenschaft bleibt für einige Tage bestehen. Die bestrahlten APZ wurden nach einem Waschschrift in RPMI Medium resuspendiert. 50  $\mu$ l der APZ Suspension sowie 50  $\mu$ l einer SEB RPMI Medium Lösung wurden in die 96 Lochzellkulturplatten ausgesät und konnten für die Stimulation der T-Zellen des Suppressionassays (siehe Abs. 3.5) eingesetzt werden. Dabei wurde eine SEB Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml eingestellt und die APZ in einem Verhältnis von 1:1 zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt.

### 3.5 Suppressionsassay

Das Suppressionsassay diente der Untersuchung der suppressiven Wirkung frisch isolierter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen auf die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen (siehe Abs. 3.3.2).  $1 \times 10^5$  in RPMI vorliegende Teff-Zellen wurden in wechselnden Verhältnissen mit den Treg-Zellen pro Vertiefung einer 96 Lochzellkulturplatte ausgesät. Die Stimulation erfolgte für 96 h mit löslichen Antikörpern (siehe Abs. 3.4.2) bei 37 °C in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l. 16 h vor der Zellernte wurde 1  $\mu$ Ci Tritium markiertes Thymidin ([<sup>3</sup>H] TdR) pro Vertiefung zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit der FilterMate Zellerntevorrichtung 96 auf Glasfaser Unifilter 96 GF7b transferiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 56 °C für 20 min getrocknet. Anschließend wurden 40  $\mu$ l MicroScint-O Szintillationscocktail in die einzelnen Vertiefungen des Glasfaser Unifilter 96 GF7b pipettiert. Die Messung der Strahlung erfolgte mit einem TopCount NXT Szintillationszähler.

### 3.6 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit der „GraphPad InStat“ bzw. der „GraphPad Prism“ Software. Neben der Durchführung von Varianzanalysen wurde der *t* Test angewendet sowie lineare Regressionsanalysen und die Bestimmung von Variationskoeffizienten durchgeführt. Bei der Ermittlung von Signifikanzen wurden *P*-Werte  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden AD Patienten untersucht, die eine Therapie mit gering dosiertem CsA erhielten. Es wurde ein Testsystem entwickelt, das die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA in Vollblutproben der AD Patienten ermöglicht und Aufschluss über den Einfluss der CsA Therapie auf die T-Zell Aktivierbarkeit gibt.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen geringer CsA Konzentrationen auf den Phänotyp, die Funktionalität, die Proliferation und die Anzahl der Treg-Zellen untersucht, da die Population der Treg-Zellen insbesondere bei allergischen Erkrankungen wie der AD involviert ist (27, 62).

### 4.1 Etablierung eines Testsystems für die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA in Vollblutproben

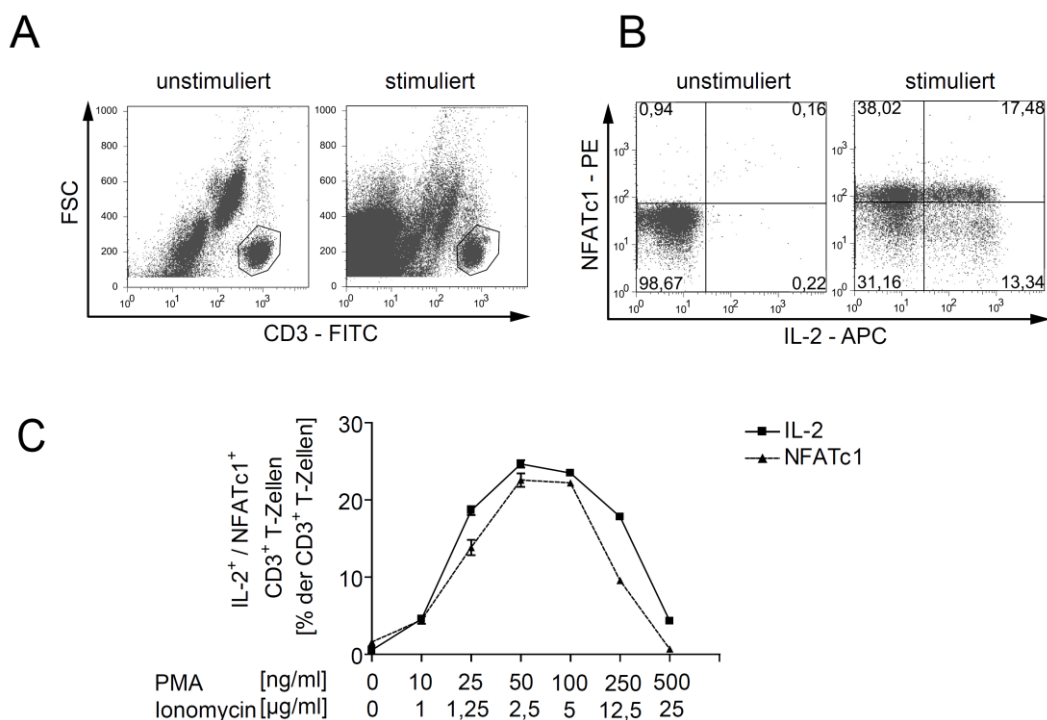
Es sollte ein schneller und zuverlässiger Test zur Bestimmung der biologischen Effekte des CsA in Blutproben von CsA behandelten AD Patienten etabliert werden. Dazu wurde die CaN abhängige und CsA sensitive Expression von IL-2 bzw. NFATc1 der stimulierten T-Zellen in den Vollblutproben durchflusszytometrisch analysiert. Das Testsystem ermöglichte somit die direkte und schnelle Bestimmung des im Vollblut vorliegenden biologisch aktiven CsA und der T-Zell Aktivierbarkeit, die nicht durch die bisher in der klinischen Routinediagnostik eingesetzten Untersuchungsmethoden, z.B. der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Bestimmung der CsA Serumkonzentration, ermittelt werden konnten.

#### 4.1.1 Optimierung der Stimulationsbedingungen für Vollblutproben

Die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA im peripheren Blut der Patienten erforderte die direkte Verwendung von Vollblutproben, da Isolationsprotokolle die im Blut vorliegende CsA Konzentration beeinflussen könnten. Die in den Vollblutproben enthaltenen T-Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert, um ihre potenziell mögliche Expression von IL-2 und NFATc1 durchflusszytometrisch zu analysieren. Durch die Optimierung der Stimulationsbedingungen sollte die maximal mögliche IL-2 und NFATc1 Expression in den stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen ermöglicht werden.

PMA und Ionomycin wurden eingesetzt, um 1 ml Vollblut von gesunden Kontrollspendern zu stimulieren und durch die Aktivierung der T-Zellen die Expression von IL-2 und NFATc1 zu

induzieren. Anschließend wurden die Frequenzen der IL-2 und NFATc1 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Für die Optimierung der Stimulationsbedingungen wurde die Konzentration an PMA und Ionomycin variiert (siehe Abb. 4.1). Die Frequenzen der IL-2 und NFATc1 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen veränderten sich simultan. Abbildung 4.1 C zeigt, dass 50 ng/ml PMA und 2,5 µg/ml Ionomycin die höchsten Frequenzen an IL-2 bzw. NFATc1 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut induzierten. Höhere Konzentrationen von PMA und Ionomycin führten sogar zu einer reduzierten IL-2 und NFATc1 Expression. Ohne Stimulus wurde keine Expression von IL-2 und NFATc1 in den CD3<sup>+</sup> T-Zellen detektiert.



**Abb. 4.1 Durchflußzytometrische Messung der NFATc1 und IL-2 Expression in CD3<sup>+</sup> T-Zellen stimulierter Vollblutproben.**

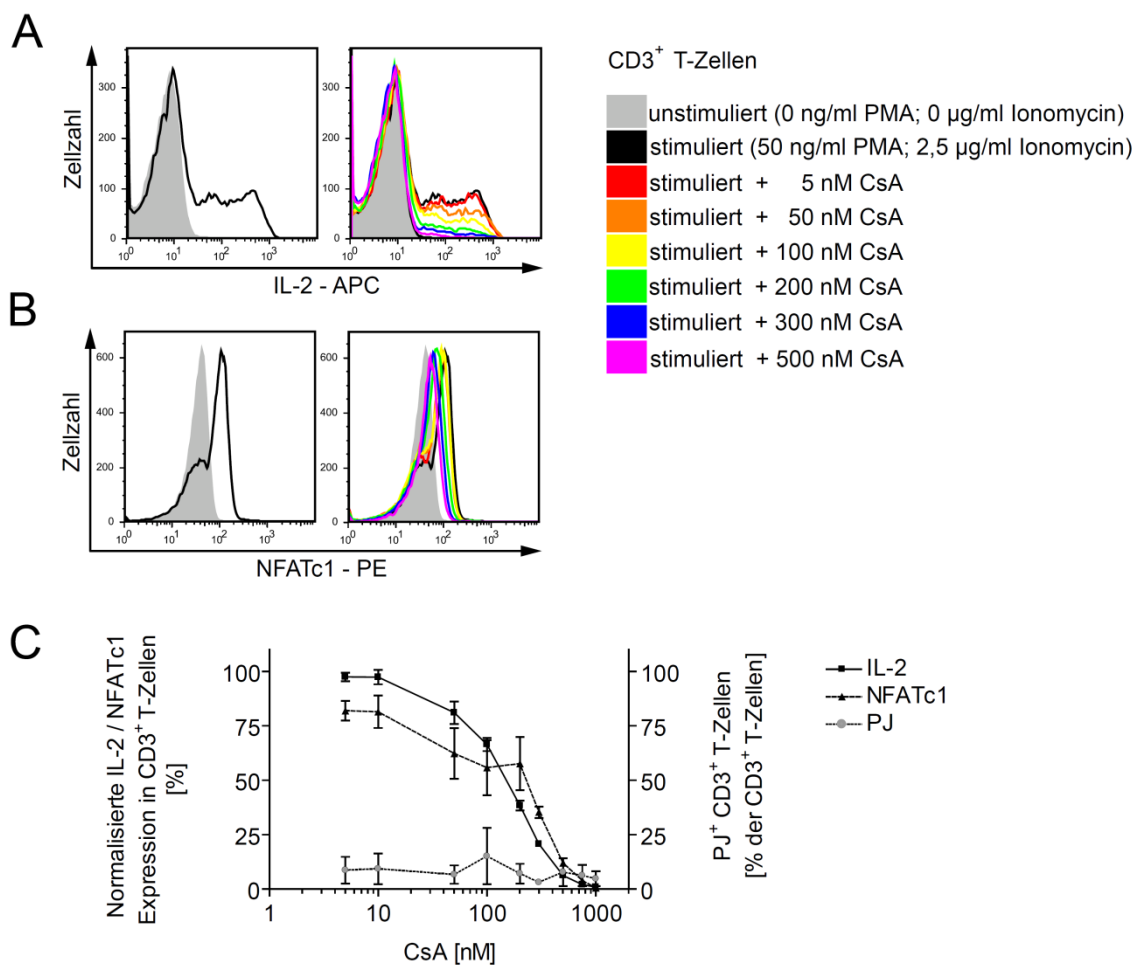
(A, B) Vollblutproben wurden für 5 h mit und ohne PMA/Ionomycin (50 ng/ml / 2,5 µg/ml) inkubiert. Nach erfolgter Erythrozytenlyse wurden die verbliebenen Zellen permeabilisiert und auf CD3-FITC, intrazelluläres IL-2-APC und NFATc1-PE gefärbt. In (A) ist eine repräsentative Punktwolkendarstellung für die Auswahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen. (B) Zeigt die Frequenzen der IL-2 (n = 19) und NFATc1 (n = 10) exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen in einer repräsentativen Punktwolkendarstellung eines Spenders. (C) Zeigt die Auftragung des MW ± SD der IL-2 und NFATc1 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen einer PMA/Ionomycin Titration eines repräsentativen gesunden Spenders (von n = 3) gegen die getesteten PMA/Ionomycin Konzentrationen.

Unter Verwendung von 50 ng/ml PMA und 2,5 µg/ml Ionomycin wurden in den Vollblutproben gesunder Spender  $14,7 \pm 5,3$  % IL-2 (n = 19) und  $27,8 \pm 13,0$  % NFATc1 (n = 10) produzierende CD3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen.

In den folgenden Experimenten wurde zur Stimulation der Vollblutproben standardmäßig 50 ng/ml PMA und 2,5 µg/ml Ionomycin eingesetzt.

#### 4.1.2 Bestimmung der CsA Empfindlichkeit des Vollbluttestsystems

Die Variation der CsA Konzentrationen diente zur Ermittlung der CsA abhängigen Empfindlichkeit des etablierten Vollbluttestsystems. Insbesondere in Hinblick auf die Messung der Blutproben von Patienten, die mit geringen CsA Dosen behandelt wurden, ist die Bestimmung der CsA Empfindlichkeit unerlässlich. Darüber hinaus konnte durch die *ex vivo* Zugabe geringer CsA Mengen die Spezifität der IL-2 und NFATc1 Färbung überprüft werden.



**Abb. 4.2** Die *ex vivo* Behandlung von Vollblutproben mit CsA führt zur Reduzierung der IL-2 und NFATc1 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

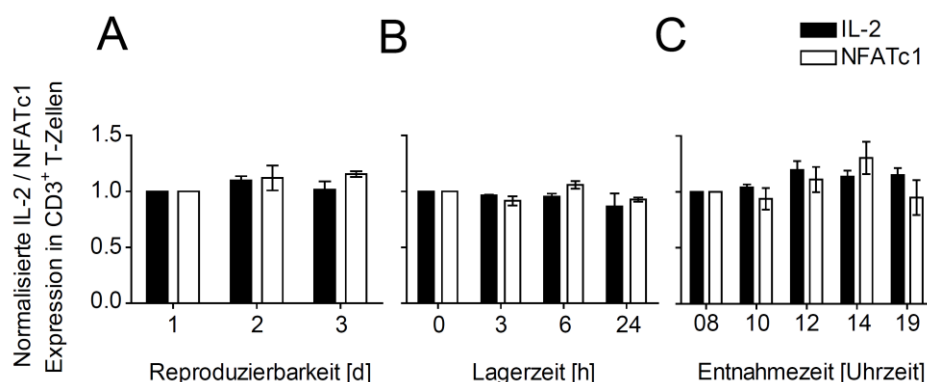
Die Blutproben wurden in der Gegenwart von verschiedenen CsA Konzentrationen für 5 h mit PMA/Ionomycin (50 ng/ml / 2,5 µg/ml) stimuliert. Die Histogramme der **(A)** IL-2 und **(B)** NFATc1 Expression in CD3<sup>+</sup> T-Zellen sind dargestellt. **(C)** Zeigt die Auftragung der MW ± SD der normalisierten IL-2 (n = 5) und NFATc1 (n = 3) Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie der PJ Färbung (n = 3) der CD3<sup>+</sup> T-Zellen gegen die verwendeten CsA Konzentrationen.

Für die Bestimmung der inhibitorischen Effekte von CsA im Vollblut wurden 20 min vor der PMA/Ionomycin Stimulation verschiedene CsA Konzentrationen von 5 – 1000 nM zu den Blutproben pipettiert. Nach erfolgter Vollblutstimulation wurde die IL-2 und NFATc1 Expression in den CD3<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. In Abbildung 4.2 ist die IL-2 und NFATc1

Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von der CsA Konzentration dargestellt. Die Bestimmung der IL-2 Expression ergab ein CsA Detektionslimit von 42 nM. Auf Grund größerer SD Werte konnte bei der Analyse der NFATc1 Expression für CsA ein Detektionslimit von 75 nM bestimmt werden (siehe Tab. 4.1). Die CsA induzierte Inhibierung auf die Hälfte des zu erreichenden Maximums (IC<sub>50</sub>) lag in stimulierten Vollblutproben für IL-2 bei 150 nM und NFATc1 bei 220 nM CsA. Ab einer Konzentration von 500 nM CsA waren die IL-2 und NFATc1 Expression nahezu vollständig aufgehoben. Um mögliche toxische Effekte und Apoptose oder Nekrose der T-Zellen während der Stimulationszeit auszuschließen, wurde die Lebensfähigkeit der stimulierten und CsA behandelten Zellen mit Hilfe von PJ analysiert (siehe Abb. 4.2 C). Mit 5,2 ± 3,8 % PJ positiven bzw. apoptotischen oder nekrotischen Zellen sind die CsA vermittelten toxischen Effekte unter den angewendeten Bedingungen vernachlässigbar.

#### 4.1.3 Charakterisierung des Vollbluttestsystems

Ein aussagekräftiges Testsystem erfordert standardisierte Testsystembedingungen, die u.a. den maximalen Zeitrahmen festlegen, der zwischen Blutentnahme und Durchführung des Vollbluttestsystems liegen darf. Um ein möglichst anwenderfreundliches Protokoll zu etablieren, wurde neben der Reproduzierbarkeit des Vollbluttestsystems auch der Einfluss der Blutprobenlagerzeit sowie die Tageszeit der Blutentnahme auf die IL-2 und NFATc1 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen untersucht (siehe Abb. 4.3).



**Abb. 4.3 Reproduzierbarkeit und Einfluss der Lager- bzw. Blutentnahmezeit auf die IL-2 und NFATc1 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen.**

Vollblutproben wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin (50 ng/ml / 2,5 µg/ml) stimuliert. Die gemessenen Expressionen von IL-2 und NFATc1 wurden normalisiert auf (A) Tag 1, (B) 0 h Lagerzeit und (C) 08:00 Uhr Blutentnahmezeit. Die normalisierten Expressionswerte von IL-2 und NFATc1 der CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden als MW ± SD dargestellt (A, n = 2; B, n = 3; C, n = 5).

Der Variationskoeffizient stellt die Normierung der Varianz der einzelnen Testsystem Parameter dar und erlaubt eine Aussage über die Streuung der ermittelten Expressionen von

IL-2 und NFATc1. Die Reproduzierbarkeit wurde ermittelt, indem das Vollbluttestsystem an drei aufeinander folgenden Tagen mit den Blutproben desselben Spenders durchgeführt wurde (siehe Abb. 4.3 A). Die Variationskoeffizienten von 0,050 für die IL-2 bzw. 0,074 für die NFATc1 Expression zeigten, dass die Varianz für die Messung der NFATc1 Expression im Vergleich zur IL-2 Expression erhöht war. Der Einfluss der Vollblutprobenlagerzeit auf die IL-2 und NFATc1 Expression ist ein Parameter, der wesentlich für die Anwenderfreundlichkeit und die potenzielle Durchführbarkeit im Klinikalltag verantwortlich ist. Die Vollblutproben von drei verschiedenen Spendern wurden im Dunkeln jeweils für 3, 6 und 24 h gelagert. Es erfolgte die anschließende Messung der IL-2 und NFATc1 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Ermittlung der Variationskoeffizienten von 0,060 für IL-2 und 0,068 für NFATc1. Innerhalb der getesteten Lagerzeiten konnten keine relevanten Unterschiede in der IL-2 und NFATc1 Expression ermittelt werden (siehe Abb. 4.3 B). Des Weiteren kann im Klinikalltag der Zeitpunkt für die erforderliche Blutentnahme beim Patienten sehr individuell sein. Die Blutentnahme zu verschiedenen Tageszeiten erfolgte, um einen dominanten zirkadianen Einfluss auf die IL-2 und NFATc1 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen auszuschließen. fünf verschiedenen gesunden Spendern wurde jeweils an fünf verschiedenen Tageszeiten Blut entnommen. Die Variationskoeffizienten von 0,073 für IL-2 und 0,143 für NFATc1 weisen auf einen mäßigen Einfluss der Tageszeit auf die IL-2 und NFATc1 Expression hin (siehe Abb. 4.3 C).

**Tab. 4.1 Charakterisierung des Vollbluttestsystems.**

	Parameter	IL-2	NFATc1
<b>Variation innerhalb des Testsystems<sup>a</sup></b>	Variationskoeffizient	0,062	0,101
<b>Variation bei mehrfacher Wiederholung des Testsystems<sup>b</sup></b>	Variationskoeffizient	0,050	0,074
<b>Variation bei der Durchführung des Testsystems durch verschiedene Experimentatoren<sup>c</sup></b>	Variationskoeffizient	1,198	0,329
<b>Detektionslimit<sup>d</sup></b>	CsA [nM]	42	75
<b>Güte der linearen Regression<sup>e</sup></b>	r <sup>2</sup>	0,87	0,61

<sup>a</sup> Verwendung vier verschiedener CsA Konzentrationen und acht Parallelproben.

<sup>b</sup> Durchführung drei verschiedener Experimente an drei hintereinander folgenden Tagen.

<sup>c</sup> Vier Experimentatoren analysieren Doppelbestimmungen von fünf verschiedenen CsA Konzentrationen.

<sup>d</sup> Verwendung der Daten aus Abb. 4.2 C.

<sup>e</sup> Lineare Regression der CsA Konzentrationen 50 – 500 nM unter Verwendung der Daten aus Abb. 4.2 C.

In Tabelle 4.1 sind die verschiedenen Parameter zur Charakterisierung des Vollbluttestsystems aufgeführt. Die Variationskoeffizienten bei der Durchführung mehrerer Parallelansätze innerhalb des Testsystems sowie der Durchführung des Testsystems an verschiedenen Tagen waren gering. Im Gegensatz dazu war eine erhöhte Variation bei der Durchführung des Vollbluttestsystems mit mehreren Experimentatoren zu beobachten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zuverlässiges Testsystem zur Untersuchung der Effekte des biologisch aktiven CsA im Vollblut entwickelt. Das Testsystem beruht auf der Stimulation

von Vollblutproben und der durchflusszytometrischen Analyse der IL-2 und NFATc1 Expression der stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden Blutproben von AD Patienten analysiert. Aus Praktikabilitätsgründen erfolgte nur die Bestimmung der IL-2 Expression in den CD3<sup>+</sup> T-Zellen der stimulierten Vollblutproben. Die IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen stellten eine distinkte Population dar, die sich auch bei sehr geringen CsA Konzentrationen, wie sie bei den zu untersuchenden AD Patienten vorliegen, eindeutig von den nicht IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen abgrenzten.

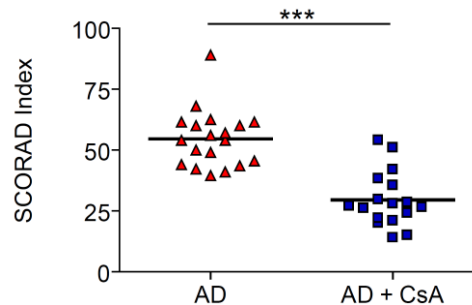
#### **4.2 Auswirkungen der CsA Therapie auf die Population der Treg-Zellen und die T-Zell Aktivität in AD Patienten**

Das Immunsuppressivum CsA inhibiert die Phosphatase CaN, die Aktivierung der T-Zellen und somit die T-Zell vermittelte IL-2 Expression. Das Zytokin IL-2 ist in zahlreichen immunologischen Prozessen involviert und unterstützt neben der Amplifizierung der Immunantwort die Aufrechterhaltung und Funktionalität der peripheren Treg-Zellen (31). In der vorliegenden Arbeit wurden AD Patienten untersucht, die eine Therapie mit gering dosiertem CsA erhielten. Die dabei verabreichten CsA Dosen ( $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d) sind im Vergleich zu anderen Anwendungsbereichen, z.B. in der Transplantationsmedizin mit 15 – 17 mg/kg/d (212-214), gering und sollten einen modulierenden Effekt auf die Zytokinexpression und T-Zell Differenzierung in den AD Patienten ausüben. Wie sich die Therapie mit gering dosiertem CsA auf die Population der Treg-Zellen und die Aktivierbarkeit der T-Zellen in den AD Patienten auswirkt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurden der Phänotyp, die Anzahl und die Funktionalität der, von dem exogenen IL-2 abhängigen, peripheren Treg-Zellen untersucht. Darüber hinaus sollte die Zulänglichkeit der Immunsuppression in den mit gering dosiertem CsA behandelten AD Patienten bestimmt werden. Dies erfolgte, indem die klinischen Symptome beobachtet und die IL-2 Expression mittels des etablierten Vollbluttestsystems in den stimulierten Blutproben der CsA behandelten AD Patienten ermittelt wurden.

##### **4.2.1 Gering dosiertes CsA verbessert die klinischen Symptome**

Die Therapie mit gering dosiertem CsA wurde bei Patienten durchgeführt, die unter schwerer AD leiden und einen SCORAD Index > 37 aufwiesen. Der SCORAD Index (siehe Abs. 1.7.2) diente der objektiven Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung und wurde vor dem

Start und während der CsA Therapie in Zusammenarbeit mit dem behandelnden Arzt ermittelt (siehe Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 Unbehandelte AD Patienten wiesen einen höheren SCORAD Index auf als AD Patienten unter der Therapie mit gering dosiertem CsA.**

Darstellung der SCORAD Index MW und der einzelnen Daten unbehandelter ( $n = 19$ ) und CsA behandelter ( $n = 17$ ) AD Patienten.  $P < 0,001$ .

Die Therapie mit gering dosiertem CsA führte in den untersuchten AD Patienten zu einer signifikanten Reduzierung des SCORAD Index von  $54 \pm 11$  auf  $29 \pm 11$ . Die AD Patienten wiesen eine erhebliche Verbesserung des Gesundheitszustandes und der Lebensqualität während der CsA Therapie auf.

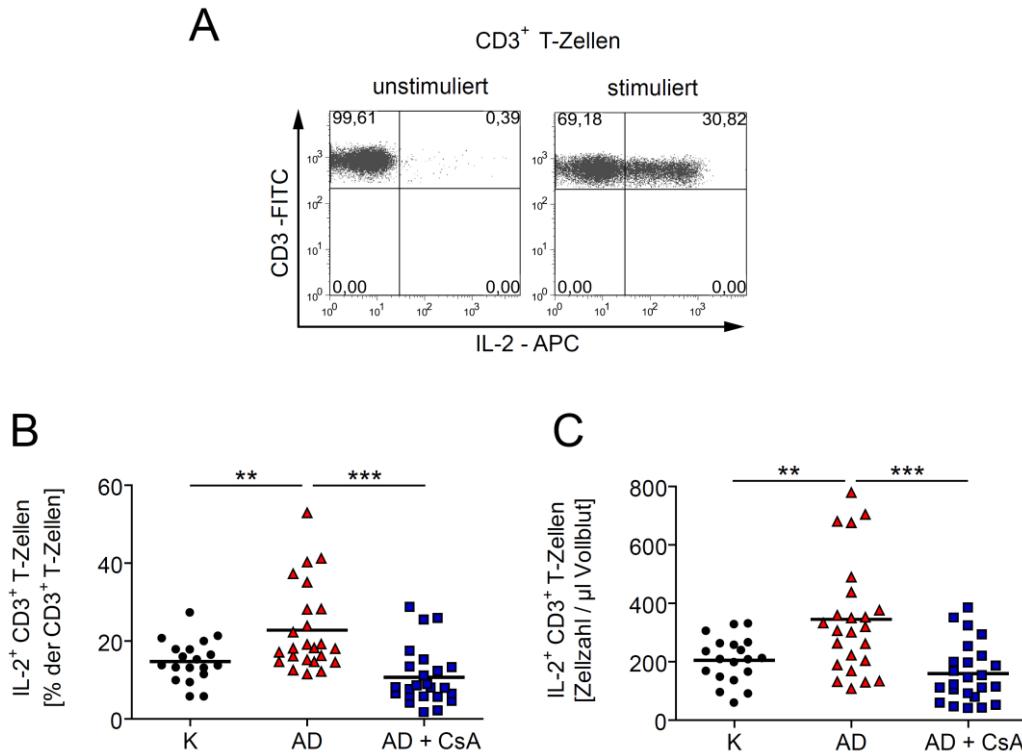
#### 4.2.2 Die T-Zell Aktivität wird durch gering dosiertes CsA partiell inhibiert

Mit Hilfe des etablierten Vollbluttestsystems (siehe Abs. 4.1) wurde die potenziell mögliche Expression des Zytokines IL-2 nach der Stimulation mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (2,5  $\mu$ g/ml) der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Vollblutproben gemessen. Damit war es möglich, die Fähigkeit zur Aktivierung peripherer T-Zellen in den Vollblutproben von gesunden Kontrollspendern und den AD Patienten mit oder ohne CsA Therapie zu untersuchen und zu vergleichen. Die IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen ermittelt.

Unbehandelte AD Patienten zeigten mit  $22,7 \pm 11,0$  % eine signifikant höhere Frequenz an IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen als die gesunden Kontrollspender mit  $14,7 \pm 5,3$  % und die CsA behandelten AD Patienten mit  $10,6 \pm 7,3$  % (siehe Abb. 4.5). Die IL-2 Antworten waren in den CsA behandelten AD Patienten etwas geringer als in den gesunden Kontrollspendern. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den gesunden Kontrollspendern und den CsA behandelten AD Patienten in den Frequenzen der IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. In T-Zellen aus dem peripheren Blut der CsA behandelten AD Patienten war der TZR abhängige Signalweg im Vergleich zu den unbehandelten AD Patienten um  $53,1 \pm 32,1$  % reduziert. Die angewendete, gering dosierte CsA Therapie



fürte somit nicht zu einer kompletten Hemmung, sondern nur zu einer Reduzierung der potenziellen T-Zell Antwort.



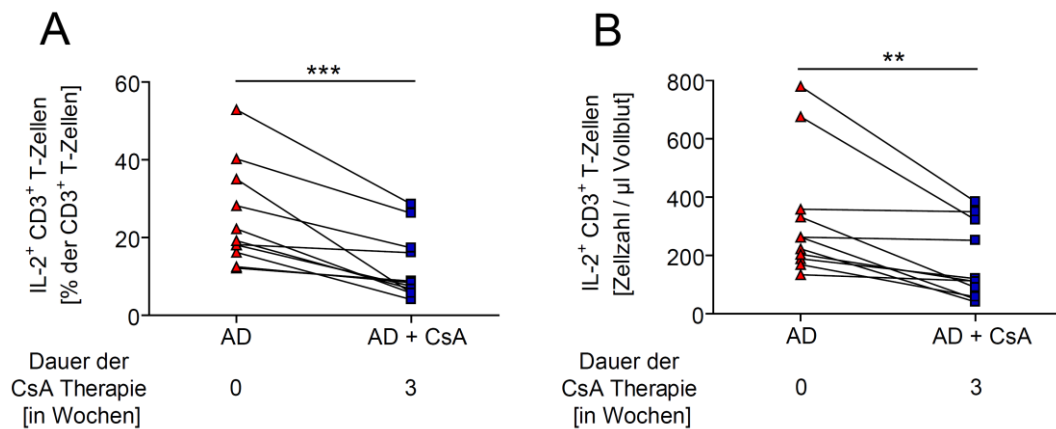
**Abb. 4.5 Gering dosiertes CsA reduziert die IL-2 Zytokinantwort in stimulierten Vollblutproben von AD Patienten.**

(A) Zeigt die IL-2 Expression in CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit und ohne PMA/Ionomycin (50 ng/ml / 2,5  $\mu$ g/ml) Stimulation für 5 h. Die Auftragung der MW und der einzelnen Spenderdatenpunkte für die (B) Frequenzen und die (C) absoluten Zellzahlen der IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen ist dargestellt ( $n_K = 19$ ;  $n_{AD} = 24$ ;  $n_{AD+CsA} = 24$ ).  $^{**}P < 0,01$ ;  $^{***}P < 0,001$ .

Neben den ermittelten Frequenzen wurden auch die absoluten Zellzahlen der IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen der drei untersuchten Spendergruppen bestimmt. Die unbehandelten AD Patienten wiesen mit  $345 \pm 194$  Zellen/ $\mu$ l eine signifikant höhere absolute Zellzahl an IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen als die gesunden Kontrollspender mit  $205 \pm 78$  Zellen/ $\mu$ l und die CsA behandelten AD Patienten mit  $159 \pm 100$  Zellen/ $\mu$ l auf (siehe Abb. 4.5 C). Die Reduzierung der IL-2 Expression war konsistent in allen CsA behandelten AD Patienten.

Um einen direkten Nachweis zu erhalten, dass die Therapie mit gering dosiertem CsA die Aktivität der T-Zellen nach Stimulation in den einzelnen AD Patienten herabsetzt, wurden die Frequenzen und absoluten Zellzahlen der IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen von einzelnen Patienten vor und drei Wochen nach CsA Einleitung bestimmt ( $n = 11$ ). Der Beginn der Therapie mit gering dosiertem CsA führte zu einer verminderten IL-2 Expression in den AD Patienten. Während der Therapie mit gering dosiertem CsA zeigten die Patienten mit  $12,3 \pm 8,5$  % bzw.  $172 \pm 129$  IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l eine signifikant geringere IL-2 Expression,

als vor dem Start der CsA Therapie ( $25,0 \pm 12,8\%$  und  $326 \pm 211$  IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l) (siehe Abb. 4.6).



**Abb. 4.6 Die Einleitung der Therapie mit gering dosiertem CsA führt in AD Patienten zu einer verminderten IL-2 Expression.**

Dargestellt sind die (A) Frequenzen und die (B) absoluten Zellzahlen der Einzelspenderdaten von IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Stimulation mit 50 ng/ml PMA und 2,5  $\mu$ g/ml Ionomycin für 5 h) vor und drei Wochen nach Einleitung der Therapie mit gering dosiertem CsA (n = 11).  $^{**}P < 0,01$ ;  $^{***}P < 0,001$ .

Die Blutentnahme erfolgte standardmäßig am Morgen direkt vor der nächsten CsA Einnahme. Dieser Zeitpunkt entsprach der geringsten CsA Konzentration im peripheren Blut der Patienten. Darüber hinaus wurde auch die T-Zell vermittelte IL-2 Expression 2 h nach der oraler CsA Einnahme zur Ermittlung der maximalen CsA Konzentration im Blut bestimmt (148, 219, 245) (siehe Tab. 4.2).

**Tab. 4.2 Die IL-2 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen war sowohl bei der minimal als auch bei der maximal möglichen CsA Konzentration nachweisbar.**

Zellpopulation		Testperson		Testperson	
		AD kein CsA	AD 2 h nach erster CsA Einnahme <sup>a</sup>	AD + CsA vor der CsA Einnahme <sup>b</sup>	AD + CsA 2 h nach CsA Einnahme <sup>a</sup>
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW $\pm$ SD [%]	22,7 $\pm$ 11,0	4,1 $\pm$ 1,7	10,6 $\pm$ 7,3	3,4 $\pm$ 2,1
	n	24	5	24	14
	P	$^{**}P < 0,01$		$^{***}P < 0,001$	
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW $\pm$ SD [Zellen/ $\mu$ l]	345 $\pm$ 194	81 $\pm$ 37	159 $\pm$ 100	53 $\pm$ 31
	n	20	5	24	14
	P	$^{**}P < 0,01$		$^{****}P < 0,0001$	

<sup>a</sup> Zeitpunkt der maximalen CsA Konzentration im Blut, bei oraler Einnahme

<sup>b</sup> Zeitpunkt der minimalen CsA Konzentration im Blut, bei oraler Einnahme

Selbst zum Zeitpunkt der maximalen CsA Konzentration, erfolgte keine komplette Hemmung der IL-2 Expression in den stimulierten Vollblutproben. 2 h nach der ersten CsA Einnahme zeigten die AD Patienten, die bis zu diesem Zeitpunkt noch keine CsA Therapie erhalten

hatten, mit  $4,1 \pm 1,7$  % eine Reduzierung der IL-2 Antwort um  $82,1 \pm 7,9$  % im Vergleich zu den unbehandelten AD Patienten. In bereits mit CsA eingeleiteten AD Patienten wurde 2 h nach der CsA Gabe eine IL-2 Expression von  $3,4 \pm 2,1$  % und somit eine Reduzierung von  $67,4 \pm 19,9$  % im Vergleich zur minimalen CsA Konzentration bestimmt. Die T-Zellen der CsA behandelten AD Patienten zeigten die Fähigkeit aktiviert zu werden unabhängig davon, ob die maximal mögliche oder minimale CsA Konzentration im Blut vorlag. Die durch das gering dosierte CsA hervorgerufene, partielle Inhibierung bezieht sich auf die Frequenz bzw. die Anzahl der IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen und nicht auf die Menge des in den T-Zellen exprimierten IL-2. Erhöhte sich die CsA Konzentrationen im Blut, reduzierte sich die Frequenz und die Anzahl der IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen, ohne dabei die Menge des exprimierten IL-2 in der einzelnen Zelle zu beeinflussen.

Um die Konstanz der IL-2 Expression innerhalb der einzelnen Spender zu erfassen, wurden die Frequenzen und die absoluten Zellzahlen der IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen wiederholt im Abstand von mehreren Wochen gemessen (siehe Tab. 4.3).

**Tab. 4.3 Die IL-2 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) ist über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen stabil.**

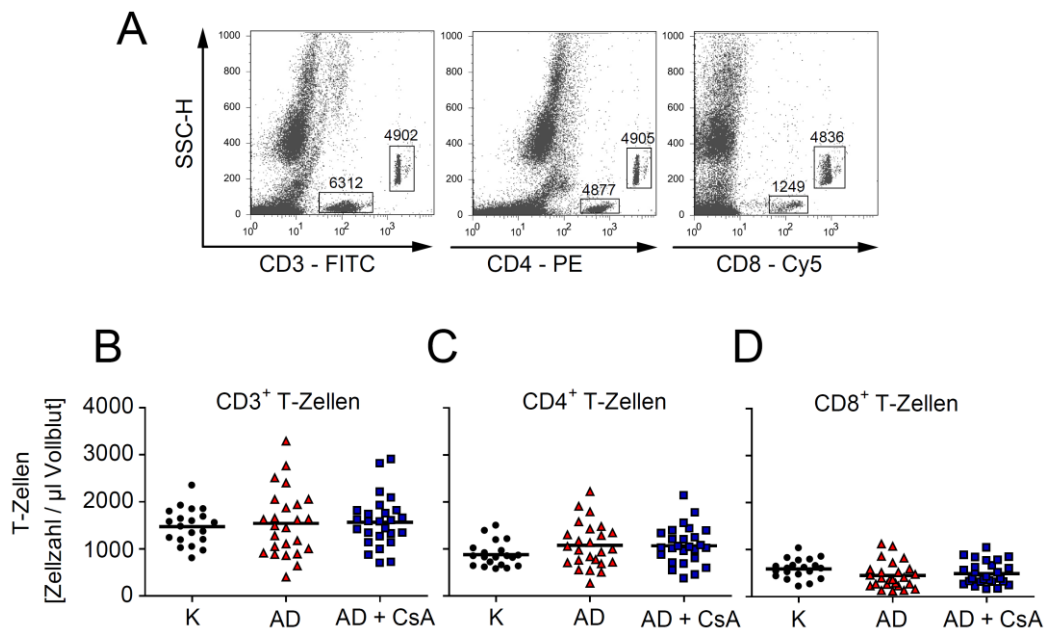
Zellpopulation		Untersuchungszeitraum für K [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [%]	13,1 ± 2,5	16,7 ± 6,1	13,7 ± 3,8	12,0 ± 1,3
	n / P	3 / 0,5196			
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	191 ± 34	245 ± 63	213 ± 33	210 ± 37
	n / P	3 / 0,5331			
Zellpopulation		Dauer der CsA Therapie für AD + CsA [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [%]	-	12,6 ± 7,5	13,1 ± 12,8	11,8 ± 6,7
	n / P	9 / 0,9572			
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	-	182 ± 82	180 ± 139	162 ± 76
	n / P	9 / 0,9037			

Die gesunden Kontrollspender und die CsA behandelten AD Patienten zeigten keine signifikanten Änderungen der IL-2 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von bis zu 20 Wochen.

#### **4.2.3 AD Patienten und Kontrollspender weisen äquivalente Zellzahlen peripherer CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf**

Neben der Untersuchung des Einflusses von gering dosiertem CsA auf die Aktivierbarkeit der CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden auch die Zellzahlen der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell

Subpopulationen während der CsA Therapie bestimmt. Als Kontrollgruppen dienten gesunde Kontrollspender und unbehandelte AD Patienten (siehe Abb. 4.7).



**Abb. 4.7 Normalspender und AD Patienten mit und ohne CsA Therapie unterscheiden sich nicht in der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl.**

(A) Zeigt eine repräsentative Punktwolkendarstellung für die Auswahl der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie der TruCount Mikropartikel direkt in den gefärbten Vollblutproben mit Angabe der aufgenommenen Partikelzahl. Dargestellt sind die MW und die einzelnen Spenderdatenpunkte für die absoluten Zahlen der (B) CD3<sup>+</sup> ( $P = 0,8491$ ), (C) CD4<sup>+</sup> ( $P = 0,1944$ ) und (D) CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P = 0,1902$ ); ( $n_K = 20$ ;  $n_{AD} = 25$ ;  $n_{AD+CsA} = 26$ ).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen im peripheren Blut der Normalspender, unbehandelter und mit gering dosiertem CsA behandelter AD Patienten festgestellt werden. Bei den gesunden Kontrollspendern wurden im Vollblut die folgenden Zellzahlen gemessen:  $1471 \pm 384$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l,  $880 \pm 265$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l und  $588 \pm 205$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l. Die unbehandelten AD Patienten wiesen Zellzahlen von  $1542 \pm 702$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l,  $1078 \pm 477$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l und  $453 \pm 281$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l und die CsA behandelten AD Patienten  $1566 \pm 541$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l,  $1069 \pm 407$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l und  $491 \pm 247$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l im Vollblut auf.

Um den Einfluss einer andauernden CsA Therapie auf die Populationen der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu ermitteln, erfolgte innerhalb mehrerer Wochen die wiederholte Messung der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen. Innerhalb des untersuchten Zeitraumes von bis zu 20 Wochen konnten keine signifikanten Veränderungen der Zellzahlen für die CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut der gesunden Kontrollspender und der CsA behandelten AD Patienten festgestellt werden (siehe Tab. 4.4).

Tab. 4.4 Die Zellzahlen für CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) stabil.

Zellpopulation		Untersuchungszeitraum für K [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	1505 ± 430	1760 ± 457	1612 ± 332	1742 ± 133
	n / P	3 / 0,8034			
CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	789 ± 184	945 ± 258	812 ± 172	949 ± 236
	n / P	3 / 0,7129			
CD8 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	716 ± 34	815 ± 208	801 ± 167	794 ± 168
	n / P	3 / 0,9275			
Zellpopulation		Dauer der CsA Therapie für AD + CsA [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
CD3 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	-	1582 ± 363	1560 ± 380	1433 ± 332
	n / P	9 / 0,6398			
CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	-	1126 ± 326	1005 ± 236	923 ± 176
	n / P	9 / 0,2532			
CD8 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/μl]	-	452 ± 278	551 ± 290	496 ± 234
	n / P	9 / 0,7388			

#### 4.2.4 Die Population der potenziell in die Haut einwandernden CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist im peripheren Blut der AD Patienten erhöht

Eine AD ist durch eine T-Zell vermittelte kutane Entzündungsreaktion charakterisiert. Etwa 90 % der selektiv in die Haut migrierten T-Zellen exprimieren das Oberflächenmolekül CLA (246). Die Messung der CLA Expression der im peripheren Blut befindlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchgeführt, um die Fähigkeit peripherer T-Zellen in die Haut einzuwandern zu untersuchen (siehe Abb. 4.8).

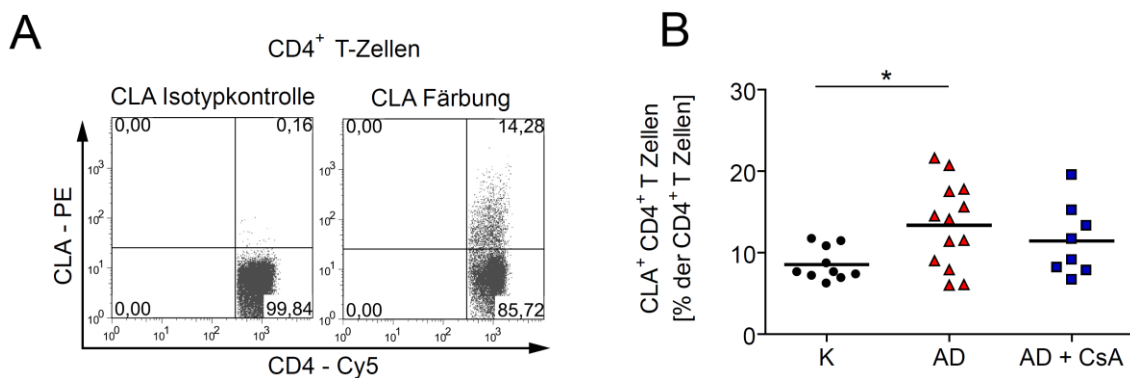


Abb. 4.8 AD Patienten weisen höhere Frequenzen als gesunde Kontrollspender an CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripherem Blut auf.

(A) Zeigt eine repräsentative Punktwolkendarstellung der CLA Färbung auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut mit entsprechender Isotypkontrollfärbung. In (B) ist die Auftragung der MW und der einzelnen Spenderdatenpunkte für die Frequenzen der CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen ( $n_K = 10$ ;  $n_{AD} = 13$ ;  $n_{AD+CsA} = 8$ ;  $P < 0,05$ ).

Es wurden im peripherem Blut mit  $13,3 \pm 5,2$  % signifikant höhere Frequenzen an  $CLA^+ CD4^+$  T-Zellen bei unbehandelten AD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern mit  $8,5 \pm 2,0$  % gemessen. Die CsA behandelten AD Patienten zeigten mit  $11,4 \pm 4,3$  % die gleiche Tendenz wie die unbehandelten AD Patienten. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Kontrollspendern festgestellt werden.

**Tab. 4.5 Übersichtstabelle zur IL-2 Expression und der T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut der Studienteilnehmer.**

Zellpopulation		Testperson		
		K	AD	AD + CsA
<b>SCORAD Index</b>		-	$54 \pm 11$	$29 \pm 11$
<b>CD3<sup>+</sup></b>	<b>MW ± SD [Zellen/μl]</b>	$1471 \pm 384$	$1542 \pm 702$	$1566 \pm 541$
<b>CD4<sup>+</sup></b>	<b>MW ± SD [Zellen/μl]</b>	$880 \pm 265$	$1078 \pm 477$	$1069 \pm 407$
<b>CD8<sup>+</sup></b>	<b>MW ± SD [Zellen/μl]</b>	$588 \pm 205$	$453 \pm 281$	$491 \pm 247$
<b>IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	<b>MW ± SD [%]</b>	$14,75 \pm 5,37$	$22,77 \pm 11,01$	$10,69 \pm 7,32$
	<b>MW ± SD [Zellen/μl]</b>	$205 \pm 78$	$345 \pm 194$	$159 \pm 100$
<b>CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	<b>MW ± SD [%]</b>	$8,54 \pm 2,01$	$13,36 \pm 5,22$	$11,44 \pm 4,38$

In Tabelle 4.5 ist zu sehen, dass die Therapie mit gering dosiertem CsA ( $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d) in den untersuchten AD Patienten zu einer signifikanten und stabilen Reduzierung der IL-2 Zytokin Antwort der im Vollblut stimulierten  $CD3^+$  T-Zellen führte. Es konnte eine drastische Verbesserung der klinischen Symptome beobachtet werden. Die absoluten Zellzahlen der  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell Subpopulationen wurde nicht durch das CsA beeinflusst und waren über einen untersuchten Zeitraum von bis zu 20 Wochen stabil. Die Frequenz der potenziell in die Haut einwandernden  $CLA^+ CD4^+$  peripheren Blut T-Zellen war bei den AD Patienten und den gesunden Kontrollspendern verschieden.

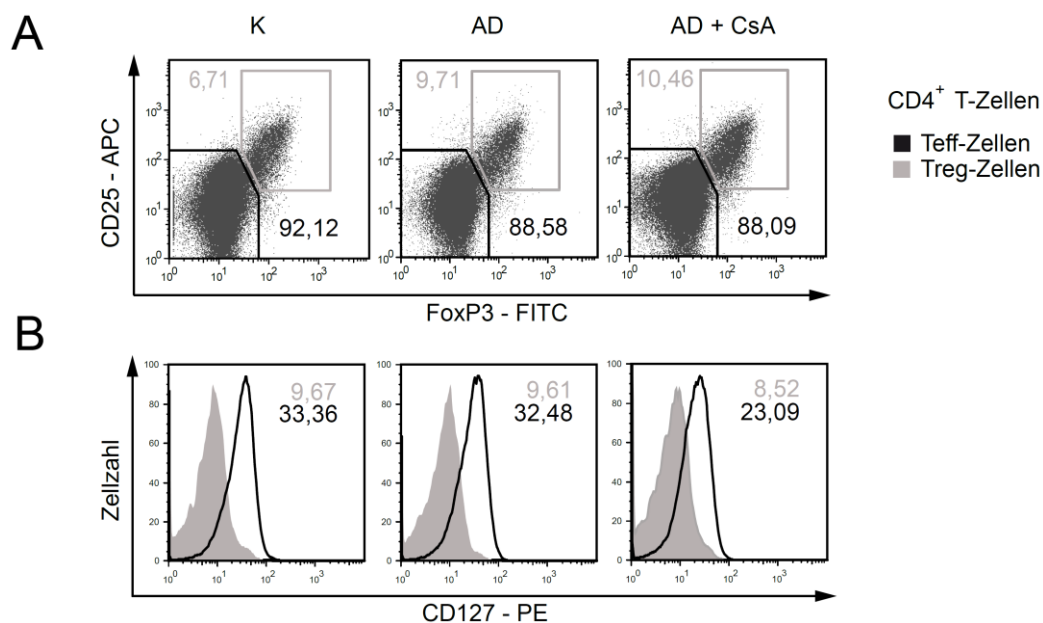
#### 4.2.5 Der Einfluss von CsA auf die Population der Treg-Zellen

Den Treg-Zellen wird eine bedeutende Rolle bei der Modulation allergischer Erkrankungen, wie der AD, zugesprochen (247). Die Population der Treg-Zellen zeichnet sich durch ihre suppressiven Eigenschaften auf die Teff-Zellen und andere Immunzellen aus. Über die Inhibierung der T-Zell Aktivierung und Funktion sorgen die Treg-Zellen für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems (62). Interessanterweise sind die peripheren Treg-Zellen auf die IL-2 Synthese der Th-Zellen angewiesen. Sie benötigen das exogene IL-2 für die Aufrechterhaltung ihres Treg-Zell Phänotyps bzw. für ihre Funktionalität (31, 47). Das Immunsuppressivum CsA inhibiert die für die peripheren Treg-Zellen essentielle IL-2 Synthese der Th-Zellen. Die in dieser Arbeit untersuchten AD Patienten

wurden mit gering dosiertem CsA behandelt und das gering dosierte CsA führte zu einer partiellen Hemmung der IL-2 Synthese der CD3<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 4.5). Im Folgenden wurde der Einfluss des gering dosierten CsA auf den Treg-Zell Phänotyps, d.h. der CD25 und CD127 Expression bzw. der Fähigkeit der Treg-Zellen in die Haut einzuwandern, untersucht. Des Weiteren wurde die Funktionalität geprüft und die Anzahl der Treg-Zellen in den AD Patienten ermittelt.

#### 4.2.5.1 Die CD25 und CD127 Expression der Treg-Zellen wird nicht durch CsA beeinflusst

Die am besten charakterisierte Treg-Zell Population zeichnet sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 aus. Die FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen weisen eine konstitutiv hohe Expression des IL-2 Rezeptors CD25 (4, 32) und eine sehr geringe Expression des Oberflächenmoleküls CD127 auf (4, 34). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für FoxP3, CD25 und CD127 angefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse erlaubt die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), die den Gehalt des gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörpers widerspiegelt und eine Aussage über die FoxP3, CD25 und CD127 Expression ermöglicht (siehe Abb. 4.9).

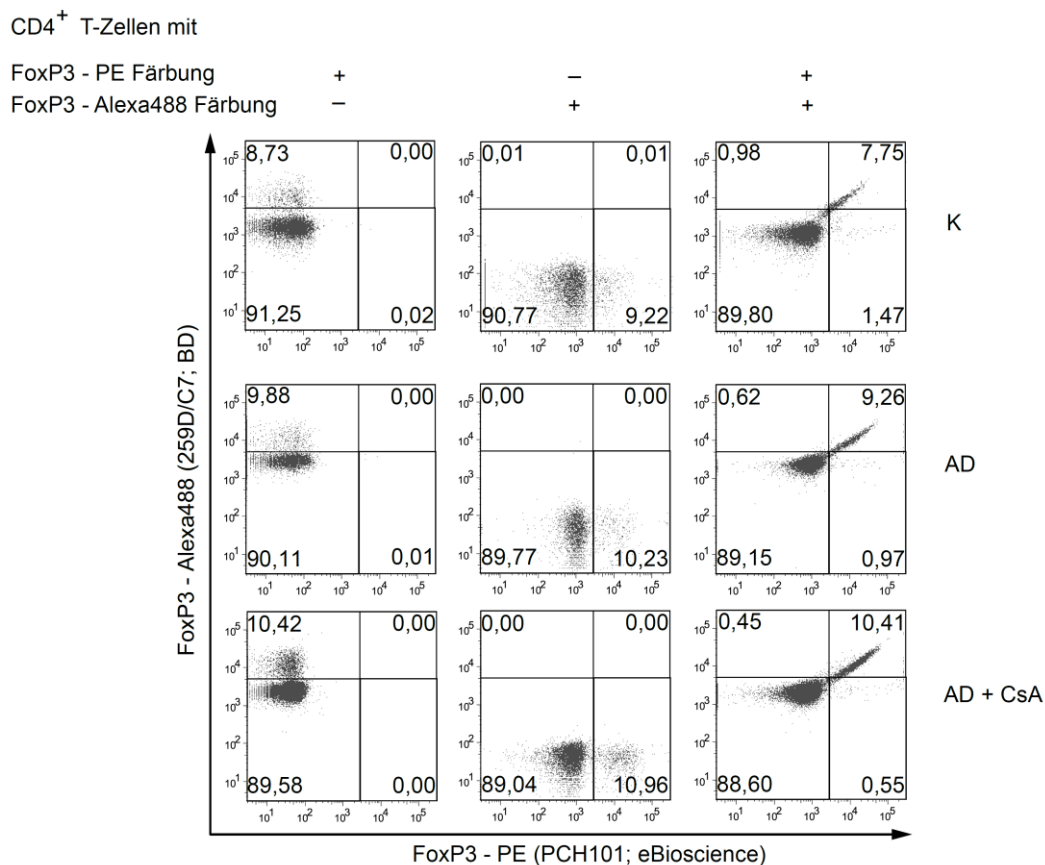


**Abb. 4.9 Treg-Zellen der AD Patienten und der gesunden Kontrollspender unterscheiden sich nicht in der Expression von CD25, CD127 und FoxP3.**

Isolierte humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden auf CD25, CD127 und intrazelluläres FoxP3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Die Treg- und Teff-Zellen, unter Angabe der Frequenzen, wurden entsprechend ihrer Expression an CD25 und FoxP3 ausgewählt und in **(B)** als Histogramm für CD127 mit Angabe der MFI für CD127 dargestellt. Die angegebenen Daten von einem Experiment sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

In Übereinstimmung mit Sakaguchi *et al.*, Zhu *et al.* und Liu *et al.* (4, 32, 34) zeichnen sich die FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen durch eine sehr hohe CD25 Expression (MFI = 206,6 ± 4,6) und eine geringe Expression des Oberflächenmoleküls CD127 (MFI 9,2 ± 0,6) aus. Eine konstant hohe FoxP3 Expression der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen (MFI 113,3 ± 10,1) war in den gesunden Kontrollspendern und den unbehandelten und CsA behandelten AD Patienten zu beobachten. Die Teff-Zellen hingegen zeichneten sich durch eine geringe CD25 und FoxP3 Expression (MFI<sub>FoxP3</sub> 13,5 ± 1,2; MFI<sub>CD25</sub> 19,2 ± 1,0) und eine im Vergleich zu den Treg-Zellen hohe CD127 Expression (MFI 29,6 ± 5,7) aus (siehe Abb. 4.9).

Neben der Analyse der CD25 und CD127 Expression der Treg-Zellen wurde die Spezifität des verwendeten FoxP3 Antikörpers überprüft. Unter der Verwendung eines alternativen FoxP3 Antikörpers wurde eine Parallelfärbung für FoxP3 durchgeführt (siehe Abb. 4.10).



**Abb. 4.10 Die Parallelfärbung von intrazellulärem FoxP3 mit zwei verschiedenen FoxP3 Antikörpern.**

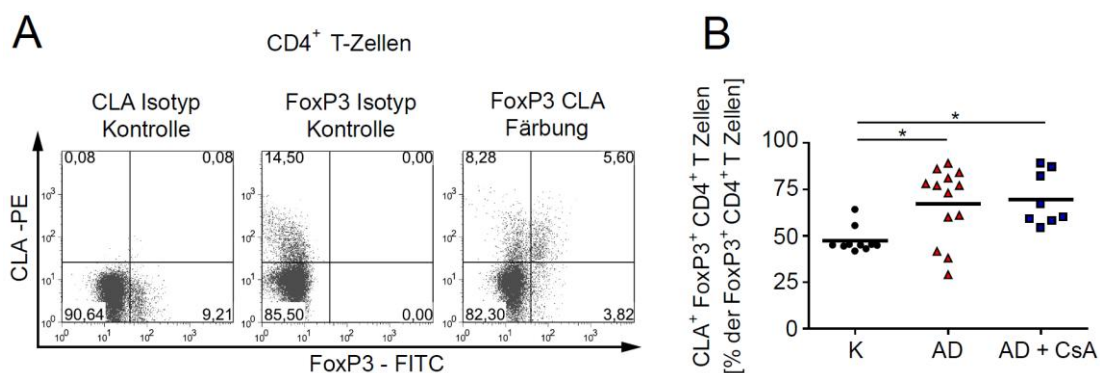
Aus peripherem Blut isolierte humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen FoxP3 Antikörpern intrazellulär auf FoxP3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

In Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass die zwei unterschiedlichen angewendeten FoxP3 Antikörper nahezu exakt die gleichen Zellen als FoxP3 exprimierende Zellen anfärbten und identifizierten.



#### 4.2.5.2 AD Patienten weisen im peripheren Blut eine erhöhte Anzahl an potenziell in die Haut einwandernden Treg-Zellen auf

Die selektive Migration von T-Zellen in die Haut wird u.a. durch das Oberflächenmolekül CLA ermöglicht (246). Da sich die AD kutan manifestiert, ist insbesondere der Anteil an potenziell in die Haut einwandernden peripheren Treg-Zellen interessant. Die in die Haut einwandernden Treg-Zellen können direkt am Ort der Entzündung ihre Wirkung entfalten und die unerwünschte Entzündungsreaktion unterdrücken. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die CLA Expression auf den peripheren FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen untersucht (siehe Abb. 4.11).



**Abb. 4.11 Treg-Zellen aus dem peripheren Blut von AD Patienten haben die Fähigkeit in die Haut einzuwandern.**

In (A) ist die CLA und FoxP3 Färbung auf peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit entsprechender Isotypkontrollfärbung dargestellt. In (B) ist die Auftragung der MW und der einzelnen Spenderdatenpunkte für die Frequenzen der CLA<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen ( $n_K = 10$ ;  $n_{AD} = 13$ ;  $n_{AD+CsA} = 8$ ;  $P < 0,05$ ).

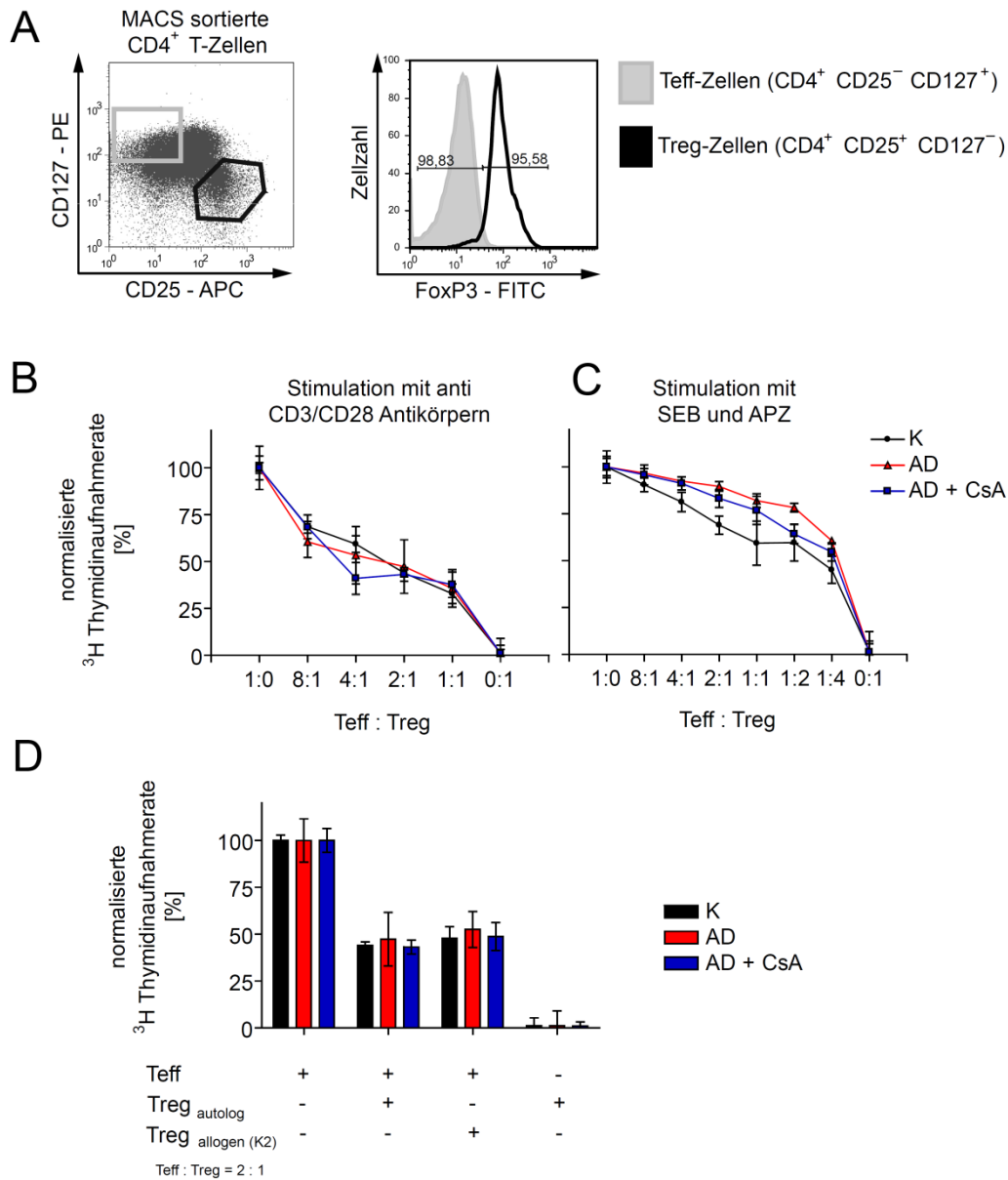
Die AD Patienten zeigten höhere Frequenzen an peripheren CLA<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollspendern ( $K = 47,3 \pm 6,9 \%$ ;  $AD = 67,2 \pm 19,7 \%$ ;  $AD + CsA = 69,4 \pm 14,2 \%$ ).

#### 4.2.5.3 Die Treg-Zellen der AD Patienten sind funktionell

Immunsuppressive Substanzen können die für die peripheren Treg-Zellen essentielle IL-2 Synthese der Teff-Zellen inhibieren. Es war zu prüfen, ob die immunsuppressive Therapie mit gering dosiertem CsA, die zu einer verminderten IL-2 Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen führt (siehe Abb. 4.5), die Funktionalität der Treg-Zellen in den AD Patienten beeinträchtigt. Es wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem Thymidin ein Proliferationstest zur Bestimmung des immunsuppressiven Potentials von Treg-Zellen auf Teff-Zellen durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Sortierung über die Färbung der Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127 mit Fluorochrom markierten Antikörpern ermöglichte die Isolation von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen aus CD4<sup>+</sup> MACS

sortierten T-Zellen. Die Reinheit der Teff- und Treg-Zell Populationen war mit  $\geq 96\%$  in allen Experimenten hoch (siehe Abb. 4.12 A).



**Abb. 4.12 Die Treg-Zellen der AD Patienten sind funktionell.**

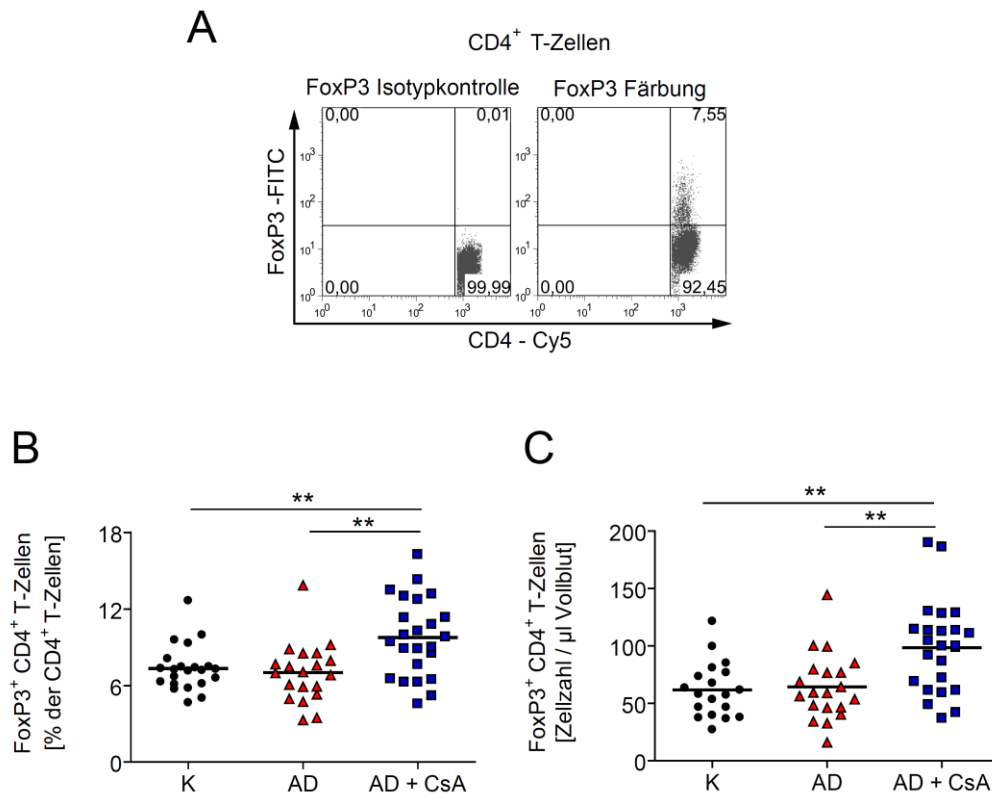
(A)  $CD25$ -APC und  $CD127$ -PE gefärbte  $CD4^+$  MACS sortierte T-Zellen werden durchflusszytometrisch in  $CD4^+ CD25^+ CD127^-$  Treg-Zellen und  $CD4^+ CD25^- CD127^+$  Teff-Zellen sortiert. Die Bestimmung der Reinheit der Teff- und Treg-Zell Population erfolgte mit einer FoxP3-FITC Färbung. (B; C; D) Die autolog isolierten Treg- und Teff-Zellen von Kontrollspendern und AD Patienten mit und ohne CsA Therapie wurden (B; C) in verschiedenen Verhältnissen oder (D) in einem Teff/Treg-Zell Verhältnis von 2:1 kokultiviert. (D) Des Weiteren wurden allogene isolierte Treg-Zellen eines gesunden Kontrollspenders (K2) mit Teff-Zellen anderer Kontrollspender, sowie der Teff-Zellen von AD Patienten mit und ohne CsA Therapie kokultiviert. (B; D) Die Stimulation erfolgte für 96 h mit löslichen anti CD3/CD28 0,2  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Antikörpern oder (C) in Gegenwart von 1  $\mu\text{g/ml}$  SEB und bestrahlten APZ. (B; C; D) Die Proliferation wurde über die Menge des aufgenommenen  $^3H$  markierten Thymidins bestimmt. Die  $^3H$  Thymidinaufnahmerate wurde auf die Teff-Zellen ohne Treg-Zell Zugabe normalisiert. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD der Dreifachbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten.

Es erfolgte die Kokultivierung der Teff- und Treg-Zellen in Gegenwart einer anti CD3/CD28 Antikörperstimulation oder mit dem Antigen SEB und bestrahlten APZ. In Abb. 4.12 *B und C* ist der konzentrationsabhängige suppressive Effekt der Treg-Zellen auf autolog sortierte Teff-Zellen dargestellt. Der Einbau des  $^3\text{H}$  markierten Thymidin in die stimulierten Teff-Zellen wurde in den gesunden Kontrollspendern, den unbehandelten und CsA behandelten AD Patienten durch die Treg-Zellen supprimiert. Bei einem Teff/Treg-Zell Mischungsverhältnis von 1:1 wurde in allen drei Spendergruppen die  $^3\text{H}$  Thymidinaufnahmerate nahezu um 70 % reduziert. Eine Inhibierung von 50 % konnte bei einem Mischungsverhältnis von 4:1 gemessen werden (siehe Abb. 4.12 *B*). Unter Verwendung eines stärkeren Stimulus waren höhere Mengen an Treg-Zellen notwendig, um eine Reduzierung der  $^3\text{H}$  Thymidinaufnahmerate um 50 % zu erreichen (siehe Abb. 4.12 *C*). Des Weiteren wurden Suppressionstests mit allogenen isolierten Treg-Zellen eines gesunden Kontrollspenders (K2) durchgeführt. Die Teff-Zellen der mit und ohne CsA behandelten AD Patienten waren genauso empfindlich für die Suppression mit allogenen isolierten Treg-Zellen wie bei ihren eigenen, autolog isolierten Treg-Zellen (siehe Abb. 4.12 *D*).

#### **4.2.5.4 Die Therapie mit gering dosiertem CsA führt zu einer vergrößerten Treg-Zell Population**

Insbesondere für die AD Patienten ist eine mögliche Beeinflussung der Anzahl der Treg-Zellen durch die CsA Therapie von großer Bedeutung, da die Treg-Zellen bei der Modulation allergischer Erkrankungen, wie der AD, eine bedeutende Rolle spielen (247). Nachdem bereits der Phänotyp und die Funktionalität der Treg-Zellen geprüft wurden, erfolgte die Untersuchung des Einflusses der immunsuppressiven Substanz CsA auf die Anzahl der Treg-Zellen.

Die aus peripherem Blut isolierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen wurden intrazellulär auf FoxP3 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. AD Patienten, die mindestens drei Wochen mit gering dosiertem CsA behandelt wurden, wiesen mit  $9,7 \pm 3,0$  % signifikant höhere Frequenzen an FoxP3<sup>+</sup>  $\text{CD4}^+$  T-Zellen auf als gesunde Kontrollspender ( $7,3 \pm 1,7$  %) oder unbehandelte AD Patienten ( $7,0 \pm 2,3$  %). Darüber hinaus zeigten die mit gering dosiertem CsA behandelten AD Patienten signifikant höhere absolute Zellzahlen der FoxP3<sup>+</sup>  $\text{CD4}^+$  T-Zellen im peripheren Blut ( $98 \pm 35$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ), verglichen mit den unbehandelten AD Patienten ( $64 \pm 28$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) und den gesunden Kontrollspendern ( $61 \pm 23$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) (siehe Abb. 4.13).



**Abb. 4.13 AD Patienten unter CsA Therapie haben mehr periphere FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen als unbehandelte AD Patienten und gesunde Kontrollspender.**

(A) Zeigt die FoxP3 Färbung in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit entsprechender Isotypkontrollfärbung. Die Auftragung der MW und der einzelnen Spenderdatenpunkte ist für die (B) Frequenzen und die (C) absoluten Zellzahlen der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt ( $n_K = 22_{(B)}/19_{(C)}$ ;  $n_{AD} = 20$ ;  $n_{AD+CsA} = 24$ ). \*\*  $P < 0,01$ .

Neben der standardmäßigen Blutentnahme zum Zeitpunkt der geringsten CsA Konzentration im peripheren Blut wurden auch die FoxP3 Analyse zur maximalen CsA Konzentration durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte 2 h nach oraler CsA Einnahme. Innerhalb dieser 2 h konnte keine Veränderung der FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden, unabhängig davon, ob die CsA Einnahme zum ersten Mal erfolgte oder die CsA Therapie bereits eingeleitet war. Verglichen wurde jeweils die FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der unbehandelten AD Patienten mit der FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der AD Patienten, die zum ersten Mal CsA einnahmen. Darüber hinaus erfolgte die Gegenüberstellung der FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt der geringsten CsA Konzentration gegen die FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur maximalen CsA Konzentration, die 2 h nach der oralen Einnahme im Blut der AD Patienten vorlag (siehe Tab. 4.6).

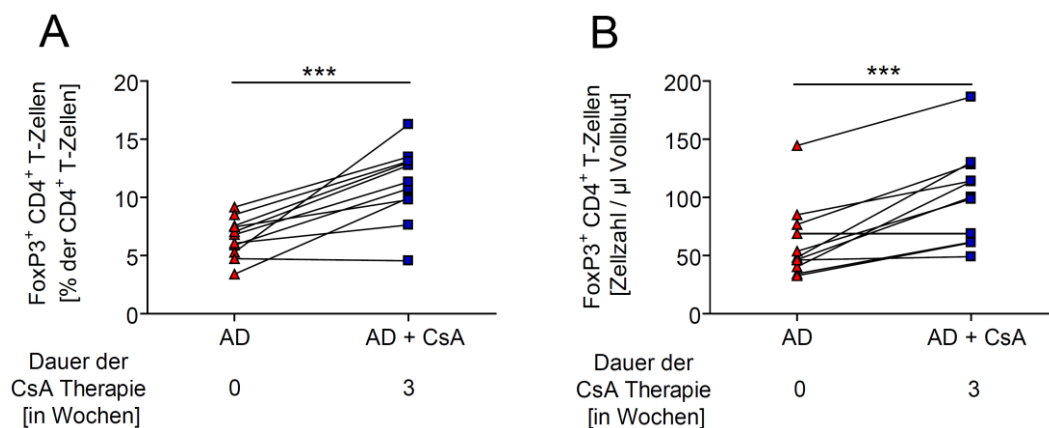
**Tab. 4.6 Keine Veränderung der FoxP3 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb von 2 h nach oraler CsA Einnahme.**

Zellpopulation		Testperson		Testperson	
		AD kein CsA	AD 2 h nach erster CsA Einnahme <sup>a</sup>	AD + CsA vor der CsA Einnahme <sup>b</sup>	AD + CsA 2 h nach CsA Einnahme <sup>a</sup>
FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [%]	7,0 ± 2,3	9,1 ± 6,7	9,7 ± 3,0	8,9 ± 2,8
	n	20	3	24	9
	P	0,3021		0,4337	
	MW ± SD [Zellen/µl]	64 ± 28	64 ± 18	98 ± 39	79 ± 34
	n	20	3	24	9
	P	0,4642		0,3625	

<sup>a</sup> Zeitpunkt der maximalen CsA Konzentration im Blut, bei oraler Einnahme

<sup>b</sup> Zeitpunkt der minimalen CsA Konzentration im Blut, bei oraler Einnahme

Um einen direkten Nachweis für eine Vergrößerung der Treg-Zell Population in den einzelnen AD Patienten zu erhalten, wurde die Messung der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen in 11 einzelnen AD Patienten vor und mindestens drei Wochen nach dem Einleiten der CsA Therapie durchgeführt. Die AD Patienten zeigten für die Population der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen einen statistisch signifikanten Anstieg der Frequenzen von  $6,5 \pm 1,6 \%$  auf  $11,1 \pm 3,7 \%$  und der absoluten Zellzahlen von  $61 \pm 32$  Zellen/µl auf  $101 \pm 40$  Zellen/µl (siehe Abb. 4.14).



**Abb. 4.14 Die Einleitung der Therapie mit gering dosiertem CsA führt im peripheren Blut der AD Patienten zu einer vergrößerten FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zell Population.**

Dargestellt sind die (A) Frequenzen und die (B) absoluten Zellzahlen von Einzelspendern für FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor und drei Wochen nach dem Beginn der CsA Therapie (n = 11). \*\*\* P < 0,001.

Die Einleitung der CsA Therapie führte in den AD Patienten nahezu zu einer Verdopplung der durchschnittlichen Frequenz und der absoluten Zellzahl an FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen. Die wiederholte Messung der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in fünf der CsA behandelten AD Patienten

sowie in drei gesunden Normalspendern zeigte, dass die Anzahl an Treg-Zellen über den untersuchten Zeitraum von 20 Wochen stabil war (Tab. 4.7).

**Tab. 4.7 Die FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zell Population ist über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 20 Wochen in den gesunden Kontrollspendern (K) und den CsA behandelten AD Patienten (AD + CsA) stabil.**

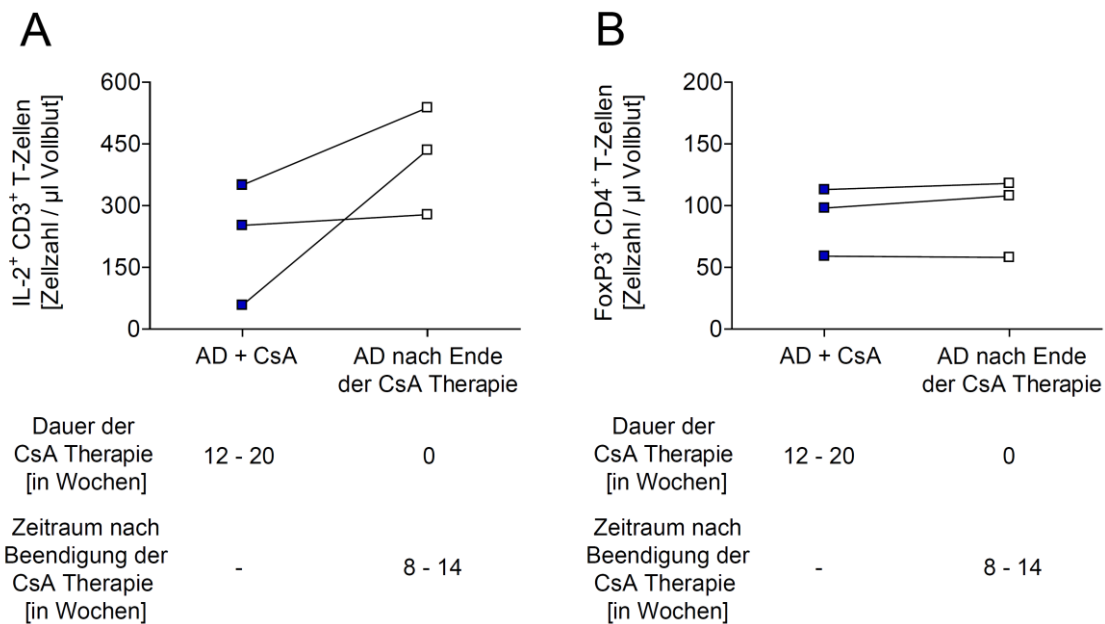
Zellpopulation		Untersuchungszeitraum für K [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [%]	7,5 ± 3,2	7,2 ± 2,0	7,0 ± 1,7	7,0 ± 1,7
	n / P	3 / 0,9901			
FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/µl]	61 ± 22	67 ± 28	70 ± 28	68 ± 26
	n / P	3 / 0,9763			
Zellpopulation		Dauer der CsA Therapie für AD + CsA [in Wochen]			
		0	3	8	12 – 20
FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [%]	-	9,6 ± 2,8	10,7 ± 3,0	11,3 ± 2,3
	n / P	5 / 0,6250			
FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	MW ± SD [Zellen/µl]	-	107 ± 38	102 ± 23	112 ± 20
	n / P	5 / 0,8566			

Die Therapie mit gering dosiertem CsA ( $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d) führte in den untersuchten AD Patienten zu einer eindeutigen Verbesserung der klinischen Symptome. Es konnte eine signifikante und stabile Vergrößerung der Treg-Zell Population im peripheren Blut der untersuchten AD Patienten festgestellt werden. Die Expression der charakteristischen Treg-Zell Oberflächenmoleküle CD25 und CD127 sowie der Fähigkeit der Treg-Zellen in die Haut einzuwandern wurde nicht durch die Therapie mit gering dosiertem CsA beeinflusst. Darüber hinaus waren die Treg-Zellen der unbehandelten und der mit CsA behandelten AD Patienten in den durchgeführten Suppressionstests funktionell aktiv.

#### **4.2.6 Nach Absetzen der CsA Therapie bleibt die Anzahl der Treg-Zellen über den untersuchten Zeitraum von acht Wochen stabil**

Um eine möglichst nachhaltige Verbesserung der klinischen Symptome auch nach dem Absetzen der CsA Therapie in den AD Patienten zu ermöglichen, ist eine stabile Population funktionell aktiver Treg-Zellen von Vorteil. Erste Voruntersuchungen, acht Wochen nach dem Beenden der CsA Therapie, zeigten eine konstant bleibende Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in den AD Patienten, die die CsA Therapie seit acht Wochen beendet hatten, eine Erhöhung der Anzahl an IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt. Auf Grund der geringen Spenderzahl konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die *P*-Werte lagen für die Anzahl der IL-2 exprimierenden

CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei 0,1916 und für die Anzahl der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen bei 0,2799 (siehe Abb. 4.15).



**Abb. 4.15 Keine Veränderungen in der Anzahl der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen nach Beenden der CsA Therapie.** Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der **(A)** IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der **(B)** FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen von drei AD Patienten mit und nach Abschluss der CsA Therapie (n = 3).  $P > 0,05$ .

Die drei exemplarisch, nach dem Absetzen der CsA Therapie gemessenen AD Patienten, zeigten während und zum Zeitpunkt der Blutentnahme nach Ende der CsA Therapie ein stabiles klinisches Bild. Obwohl die Anzahl der IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut der AD Patienten nach der Beendigung der CsA Therapie zunahm, waren die AD Patienten beschwerdefrei und die Population der Treg-Zellen weiterhin auf einem konstant hohen Niveau.

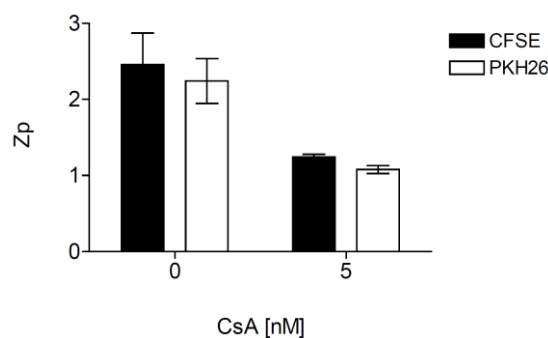
#### 4.3 Differenzielle Wirkungen von CsA auf Treg- und Teff-Zellen *in vitro*

Das Immunsuppressivum CsA hat vielfältige Effekte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CsA die IL-2 Expression peripherer CD3<sup>+</sup> T-Zellen gehemmt wurde (siehe Abb. 4.2 und Abb. 4.5) und in AD Patienten zu einer Vergrößerung der Treg-Zell Population führte (siehe Abb. 4.13). Im folgenden Abschnitt sollte die CsA abhängige Beeinflussung der Treg-Zellen genauer untersucht werden. *In vitro* erfolgte die Analyse des CsA Einflusses auf eine mögliche Expansion der Treg-Zellen, die zu einem Anstieg der Treg-Zellzahl in den mit gering dosierten CsA behandelten AD Patienten beitragen könnte. In den durchgeführten Proliferationstests wurden die aus einem Spender isolierten Teff- und Treg-

Zellen getrennt voneinander mit verschiedenen Proliferationsfarbstoffen angefärbt und für die Simulation möglichst physiologischer Bedingungen erneut in einer Kokultur vereint. Die individuelle Färbung der Teff- und Treg-Zellen ermöglichte mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung die Analyse der CsA abhängigen Änderung der TZR induzierten Teff- und Treg-Zell Proliferation. Für die Kokultur Experimente wurden mittels Durchflusszytometrie isolierte  $CD4^+ CD25^- CD127^-$  Treg- bzw.  $CD4^+ CD25^- CD127^+$  Teff-Zell Populationen mit einer Reinheit von  $\geq 96\%$  verwendet (siehe Abb. 4.12 A) und mit den Proliferationsfarbstoffen CFSE bzw. PKH26 gefärbt.

#### 4.3.1 CFSE und PKH26 haben keinen voneinander abweichenden Einfluss auf die Proliferation

Isolierte Teff-Zellen eines Spenders wurden getrennt voneinander mit den Proliferationsfarbstoffen CFSE und PKH26 gefärbt und für die Kultivierung mit 0 bzw. 5 nM CsA erneut vereint, um eventuell vorhandene proliferationshemmende Einflüsse der verwendeten Farbstoffe CFSE und PKH26 zu prüfen.



**Abb. 4.16 CFSE und PKH26 haben keinen differentiellen Einfluss auf die Proliferation.**

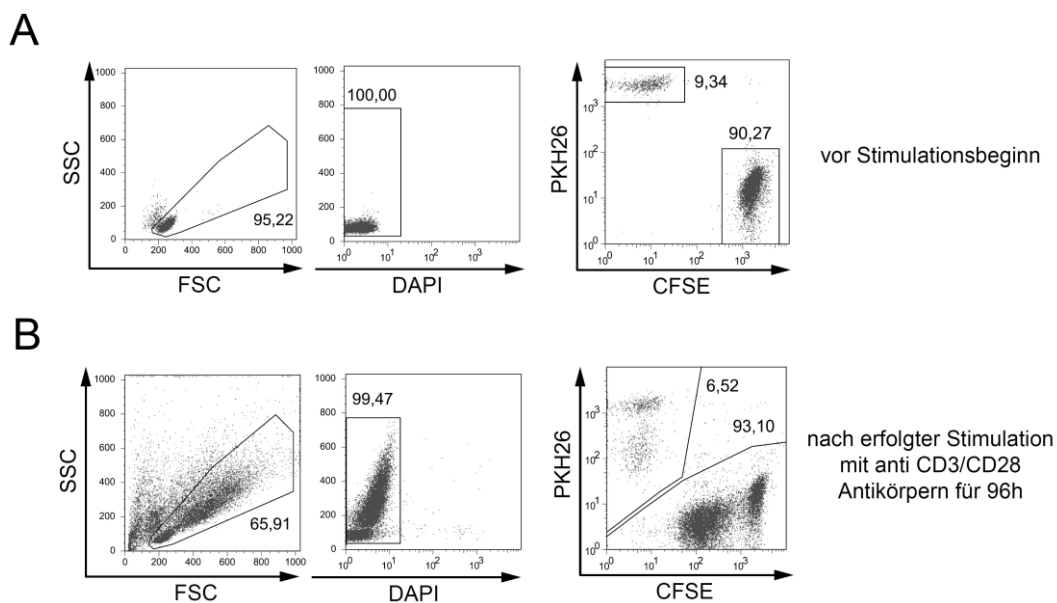
Die durchflusszytometrisch isolierten  $CD4^+ CD25^- CD127^+$  Teff-Zellen eines Spenders wurden mit PKH26 bzw. CFSE angefärbt und in Gegenwart von 0 nM und 5 nM CsA für 96 h in mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  anti CD3/CD28 Antikörper beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse der Fluoreszenzintensitäten der Proliferationsfarbstoffe konnte die Bestimmung der  $Z_p$  erfolgen. Dargestellt ist der MW und die ermittelte SD der Dreifachbestimmung der  $Z_p$  der  $CD4^+ CD25^- CD127^+$  Teff-Zellen eines Spenders.

Die Fluoreszenzintensitäten von PKH26 und CFSE wurde nach 96 h einer anti CD3/CD28 Antikörper Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellteilung pro Ausgangszelle ( $Z_p$ ) wurde ermittelt und es konnte kein differentieller Einfluss der Farbstoffe CFSE und PKH26 auf die TZR abhängige Proliferation der T-Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 4.16).



### 4.3.2 Treg-Zellen proliferieren bei geringen CsA Konzentrationen stärker als Teff-Zellen

Um möglichst physiologische und vergleichbare Kultivierungsbedingungen zu schaffen, wurden die Treg- und Teff-Zellen jeweils aus dem gleichen Spender durchflusszytometrisch isoliert, getrennt voneinander mit CFSE und PKH26 gefärbt und für die Kultivierung erneut vereint. Die Treg-Zellen stellen etwa 5 - 10 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripherem Blut dar (20, 25). Um diese natürliche Situation zu simulieren, erfolgte die Kokultivierung der Treg/Teff-Zellen zu Beginn der Stimulation in einem Verhältnis von 1:9. In Abbildung 4.17 sind jeweils die Verhältnisse der Treg/Teff-Zell Populationen zu Beginn bzw. nach erfolgter Kokultivierung von 96 h mit anti CD3/CD28 Antikörpern exemplarisch dargestellt. Nach erfolgter Stimulation kam es auf Grund der für die Teff-Zellen typischen, immensen Proliferation zu einer leichten Verschiebung des Treg/Teff-Zell Verhältnisses mit einem Teff-Zell Anteil von  $92,8 \pm 1,2 \%$  und einem Treg-Zell Anteil von  $6,6 \pm 1,2 \%$ .

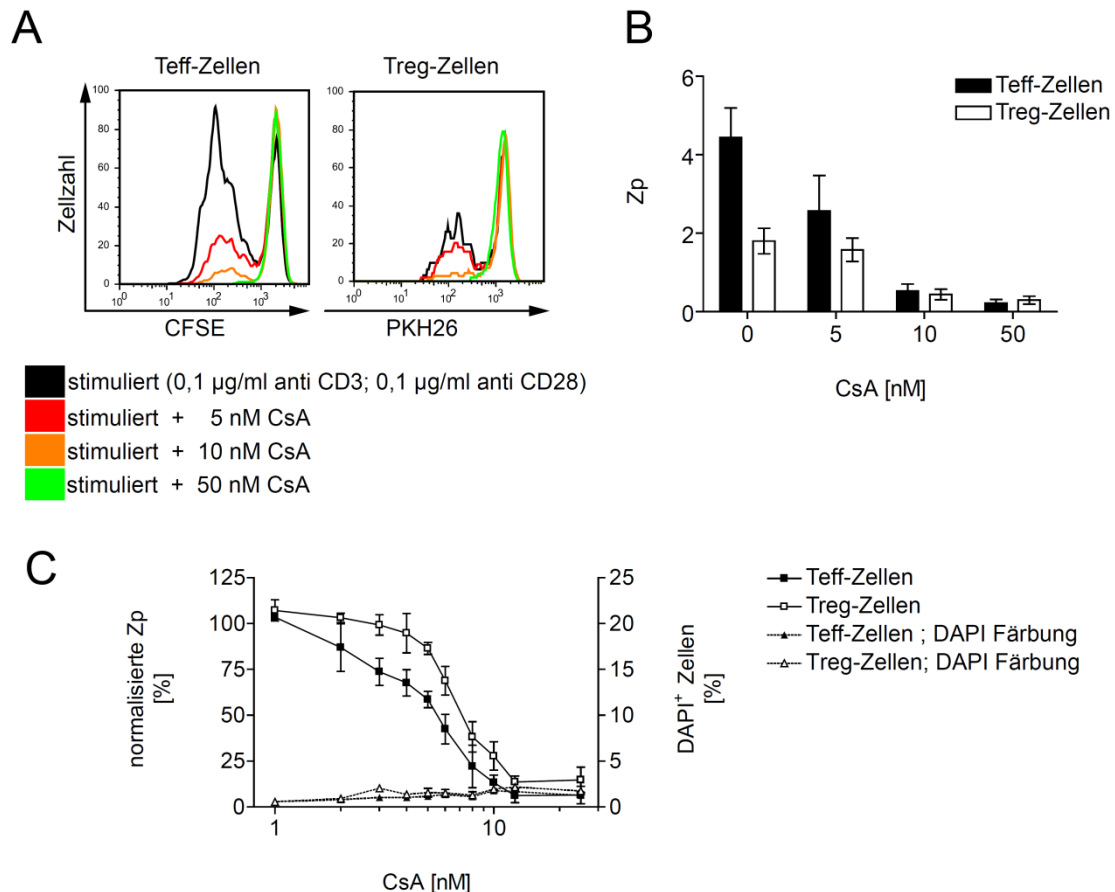


**Abb. 4.17 Punktwerkendarstellung der Treg/Teff-Zell Kokultur zu Beginn und nach erfolgter Kokultivierung.**

(A) Die durchflusszytometrisch isolierten Treg-Zellen wurden mit PKH26 und die Teff-Zellen mit CFSE angefärbt. In einem Verhältnis von 1:9 wurden die Treg- mit den Teff-Zellen kokultiviert und für 96 h mit anti CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. (B) Nach erfolgter Stimulation wurden die Fluoreszenzintensitäten der PKH26 gefärbten Treg-Zellen und der CFSE positiven Teff-Zellen analysiert. (A,B) Neben der SSC/FSC Darstellung wurde eine DAPI Färbung zur Kontrolle der Lebensfähigkeit der Zellen durchgeführt.

Die Zugabe von CsA führte allerdings zu einer Modulierung der TZR abhängigen Proliferation der stimulierten Treg/Teff-Zell Kokultur (siehe Abb. 4.18). Ohne die Zugabe von CsA zeigten die Teff-Zellen eine starke Proliferation mit  $4,4 \pm 1,6$  Zellteilungen pro Ausgangszelle. Mit einer  $Z_P$  von  $1,8 \pm 0,7$  war die durchschnittliche Zellteilung der Treg-Zellen wesentlich geringer. Die Zugabe von CsA führte bei den Treg- und Teff-Zellen zu

einer CsA konzentrationsabhängigen Reduzierung der  $Z_p$ . Bei einer CsA Konzentration von 5 nM wurde die  $Z_p$  der Teff-Zellen bereits um 42,1 % auf einen Wert von  $2,5 \pm 1,5$  reduziert. Für die Treg-Zellen konnte mit einer Reduzierung von 12,5 % bei 5 nM CsA eine  $Z_p$  von  $1,5 \pm 0,6$  ermittelt werden (siehe Abb. 4.18 B).



**Abb. 4.18 Treg-Zellen reagieren unempfindlicher als Teff-Zellen auf geringe CsA Konzentrationen.**

Treg- und Teff-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:9 in Gegenwart von verschiedenen CsA Konzentrationen (**A**; **B**) 5 – 50 nM bzw. (**C**) 1 – 25 nM kokultiviert und für 96 h mit anti CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CFSE bzw. PKH26 Fluoreszenzintensitäten, sowie der (**C**) DAPI Färbung und die Ermittlung der  $Z_p$ . In (**A**) sind die Histogramme der durchflusszytometrisch gemessenen CFSE bzw. PKH26 Fluoreszenzintensitäten der Teff- und Treg-Zellen mit und ohne CsA Zugabe dargestellt. Die MW  $\pm$  SD der (**B**)  $Z_p$  Werte sowie der (**C**) normalisierten  $Z_p$  Werte der Treg-bzw. Teff-Zell Population von fünf unabhängigen Experimenten sind zu sehen. Die (**C**)  $Z_p$  Werte der einzelnen CsA Konzentrationen wurden auf die  $Z_p$  ohne CsA normalisiert.

Die normalisierten  $Z_p$  Werte von fünf unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 4.18 C dargestellt. In dem Konzentrationsbereich von 2 – 5 nM CsA wurde die Teff-Zell Proliferation bereits wesentlich durch CsA inhibiert. Die Treg-Zellen zeigten, im Gegensatz zu den Teff-Zellen, bei einer CsA Konzentration von 2 nM eine Erhöhung der  $Z_p$  Werte und reagierten darüber hinaus wesentlich unempfindlicher auf CsA Konzentrationen von 3 – 5 nM. Mit steigenden CsA Konzentrationen > 5 nM nivellieren sich die Treg/Teff-Zell spezifischen Proliferationsunterschiede. Bereits ab einer CsA Konzentration von 10 nM wurde eine

Inhibierung der Teff-Zell  $Z_P$  von 88,1 % mit einem  $Z_P$  Wert von  $0,5 \pm 0,4$ , bzw. eine Treg Zell  $Z_P$  von  $0,4 \pm 0,3$ , was einer Inhibierung von 75,6 % entspricht, ermittelt. Eine weitere Erhöhung der CsA Konzentration führte zu einer stark eingeschränkten Proliferation der Treg- und Teff-Zellen (siehe Abb. 4.18).

Um mögliche toxische Effekte und Apoptose oder Nekrose der T-Zellen während der Stimulationszeit auszuschließen, wurde die Lebensfähigkeit der stimulierten und CsA behandelten Zellen mit Hilfe einer DAPI Färbung analysiert (siehe Abb. 4.18 C). Mit  $1,1 \pm 0,4$  % DAPI<sup>+</sup> bzw. apoptotischen oder nekrotischen Teff-Zellen und  $1,4 \pm 0,6$  % DAPI<sup>+</sup> Treg-Zellen sind die CsA vermittelten toxischen Effekte unter den angewendeten Bedingungen vernachlässigbar.

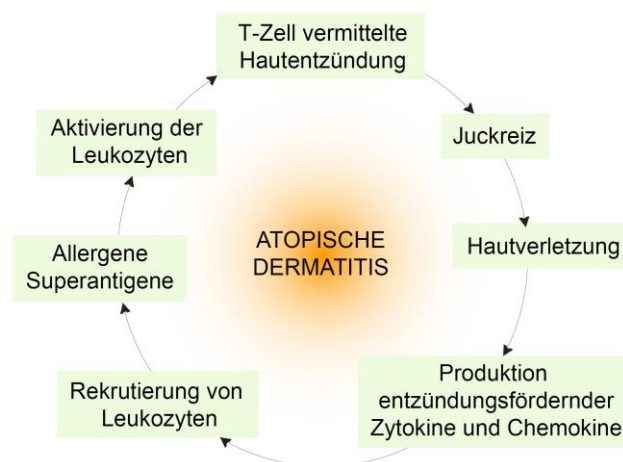
Geringe CsA Dosen führten selektiv zu einer verstärkten Proliferation der Treg-Zellen. Dieser proliferationsfördernde Effekt konnte nur bei geringen CsA Dosen beobachtet werden. Darüber hinaus wurden die Teff-Zellen bereits bei geringen CsA Konzentrationen selektiv in ihrer TZR abhängigen Proliferation supprimiert. Die Treg- und Teff-Zell Populationen wiesen somit differentielle Effekte bei geringen CsA Konzentrationen auf.

## 5 Diskussion

Für schwer erkrankte AD Patienten stellt die Therapie mit gering dosiertem CsA eine wirksame und gut verträgliche Behandlungsstrategie dar (206, 207). Das gering dosierte CsA führte in den AD Patienten zu einer partiellen Inhibierung der TZR vermittelten Effekte. Dabei erfolgte die Messung der IL-2 Zytokin Produktion mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Vollbluttestsystems. Darüber hinaus wurde unter dem Einfluss von gering dosiertem CsA eine Vergrößerung der Treg-Zell Population in den AD Patienten nachgewiesen. Die zu beobachtende Verbesserung der klinischen Symptome während der CsA Therapie konnte daher zum einen durch die direkte Inhibierung der überschießenden Immunantwort auf Allergene oder Superantigene und zum anderen indirekt durch die Erhöhung der Anzahl funktioneller FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen erfolgen.

### 5.1 Die T-Zell Aktivierung wird durch gering dosiertes CsA herabgesetzt

AD Patienten leiden unter einer andauernden und wiederkehrenden Entzündungsreaktion der Haut. Ein wesentliches Merkmal der AD ist der sehr starke Juckreiz. Das Kratzen und die damit verbundenen Hautverletzungen führen zu einer Verstärkung der kutanen Entzündungsreaktion (siehe Abb. 5.1).



**Abb. 5.1 T-Zellen spielen bei der Entzündungsreaktion in der Haut von AD Patienten eine entscheidende Rolle.**

Die kutane Entzündungsreaktion wird durch den starken Juckreiz, den daraus resultierenden Hautverletzungen und verschiedenen immunologischen Prozessen verstärkt.

Proinflammatorische Zytokine und Chemokine werden ausgeschüttet. Leukozyten werden rekrutiert und aktiviert. Die Produktion anti-mikrobieller Peptide wird unterdrückt und resultiert

in einer verstärkten Besiedlung der Haut durch Viren, Pilze oder Bakterien (190, 248). Innerhalb dieser immunologischen Krankheitsprozesse spielen die T-Zellen eine entscheidende Rolle. Die Stimulation mit Allergenen und Superantigenen führt zur Produktion entzündungsfördernder Chemokine und der für die AD typischen Th1- und Th2-Zytokine (248, 249).

In dieser Arbeit wurden schwer an AD erkrankte Patienten untersucht, die mit gering dosiertem CsA behandelt wurden. Die CsA Therapie inhibiert die Phosphatase CaN und damit die Aktivierung der T-Zellen und greift somit in den Verstärkungszyklus der kutanen Entzündungsreaktion ein. Das in dieser Arbeit etablierte Testsystem (siehe Abs. 4.1) diente der Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA im peripheren Blut der AD Patienten. Dabei wurden die T<sub>H</sub>1-Zellen auf ihre Fähigkeit, IL-2 zu synthetisieren, untersucht. Die T-Zell vermittelte IL-2 Expression ist ein bedeutender Parameter, der Aussagen über die potenziell im Patienten stattfindenden Immunantworten ermöglicht. Darüber hinaus ist das Zytokin IL-2 entscheidend für die Aufrechterhaltung einer funktionell aktiven und stabilen Treg-Zell Population, die insbesondere für Patienten mit allergischen Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

### **5.1.1 Die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA ist essentiell für die Überwachung der CsA Therapie**

Die klinische Anwendung von CsA wird durch das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen, die im Wesentlichen von der CsA Dosis abhängig sind, limitiert. Um die immunsuppressive CsA Therapie mit möglichst geringen CsA Dosen durchführen zu können und um eine optimale Balance zwischen der therapeutischen Wirksamkeit und dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen zu finden, ist die Bestimmung der individuellen, biologischen CsA Effekte erforderlich. Die Voraussetzung zur Bestimmung der CsA vermittelten Effekte im Blut von Patienten ist ein zuverlässiges Testsystem, das sehr sensitiv auf geringe CsA Konzentrationsunterschiede reagiert.

#### **5.1.1.1 Die Verwendung von Vollblutproben ist für die Überwachung der CsA Therapie von Vorteil**

Um die im peripheren Blut von Patienten vorliegende CsA Dosis nicht zu verändern, erfolgte die Verwendung von Vollblutproben. Im Allgemeinen ist für die Überwachung einer Medikamentendosis Vollblut besser geeignet als isoliertes Zellmaterial (234, 236). Zum einen ist das erforderliche, abzunehmende Blutvolumen bei einem Vollbluttestsystem bis zu 10-fach geringer als es für die Gewinnung isolierter Lymphozyten erforderlich ist. Zum anderen verkürzt sich durch den Wegfall verschiedener Zellisolationschritte die Präparationszeit.

Darüber hinaus nimmt man bei der Durchführung von Isolationsprotokollen unweigerlich Einfluss auf die im peripheren Blut vorliegende Medikamentenkonzentration. Bei der Verwendung von Vollblutproben bleibt die im Patienten vorliegende und zu untersuchende Medikamentendosis im Blut erhalten. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Blutentnahmen eines AD Patienten an verschiedenen Tagen zu gewährleisten, erfolgte die Entnahme des peripheren Blutes bei den CsA behandelten AD Patienten standardmäßig am Morgen vor der erneuten CsA Einnahme. Zwischen 2 – 4 h nach der oralen Einnahme, die jeweils morgens und abends erfolgte, liegt die maximale CsA Konzentration im peripherem Blut vor (148, 219, 245). In diesem Zeitfenster kommt die hohe Variabilität der individuellen CsA Pharmakokinetik zum Tragen, die sich jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf nivelliert. Es stellt sich nach ca. 9 h ein relativ konstantes CsA Konzentrationsplateau im peripheren Blut ein (250).

#### **5.1.1.2 Die Überwachung der CsA Pharmakodynamik kann durch spezifische und unspezifische Testsysteme erfolgen**

Die individuellen CsA abhängigen Effekte werden durch die Überwachung der CsA Pharmakodynamik in den einzelnen Spendern ermittelt. Sie kann über unspezifische Biomarker oder über CsA spezifische Testsysteme erfolgen. Zu den unspezifischen Biomarkern zählt die Analyse der Lymphozytenproliferation und die Bestimmung verschiedener T-Zell Oberflächenantigene oder des ATP Gehaltes in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz zu den CsA spezifischen Testsystemen ermöglicht die Anwendung unspezifischer Biomarker auch die Untersuchung verschiedener Medikamentenkombinationen (227). Insbesondere in der Transplantationsmedizin ist dieser Aspekt von Vorteil, da CsA hier unter Zugabe von anderen Medikamenten, wie Azathioprin oder Mycophenolsäure, eingesetzt wird.

Bei den spezifischen Testsystemen wird die CsA Pharmakodynamik über die Bestimmung der CaN Phosphatase Aktivität (230, 231) oder der IL-2 Zytokin Produktion ermittelt. Dabei kann die IL-2 Expression über die Messung der IL-2 mRNA mit quantitativer RT-PCR (251) und des IL-2 Proteins mittels ELISA (235) oder der Durchflusszytometrie (252) erfolgen. Eine direkte durchflusszytometrische Messung des Transkriptionsfaktors NFAT im Zusammenhang mit der CsA Pharmakodynamik, wie sie in der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, ist außerhalb dieser Arbeit nicht publiziert.

Trotz des dringenden Bedarfs an Untersuchungsmethoden zur Überwachung der CsA Pharmakodynamik ist bisher keines der erwähnten Testsysteme in der klinischen Routinediagnostik zur Anwendung gekommen. Dass jedoch die Überwachung der CsA Pharmakodynamik klinisch sinnvoll ist, wird durch Studien belegt, die diesen Parameter mit klinischen Wirkungen verknüpft haben (227). In diesen Studien erfolgte die Messung der

CaN Phosphatase Aktivität bei allogenen Stammzell- und Lebertransplantationen (230, 253, 254) oder der Produktion NFAT abhängiger Zytokine, wie IL-2, IFN $\gamma$  und GM-CSF bei Nieren- und Herztransplantationen (208, 255-257).

### **5.1.1.3 Das etablierte Testsystem ermöglicht die dosisabhängige Bestimmung des biologisch aktiven CsA im Vollblut**

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Ermittlung CsA spezifischer Effekte mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung und quantitativen Bestimmung der IL-2 und NFATc1 Proteinexpression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in stimulierten Vollblutproben. In dem etablierten Vollbluttestsystem ist die CsA empfindliche Expression von IL-2 und NFATc1 dosisabhängig messbar (siehe Abb. 4.2). Wird in den *ex vivo* stimulierten Vollblutproben eine geringe IL-2 und NFATc1 Expression gemessen, so ist diese einer geringen T-Zell Aktivierung gleichzusetzen. Dabei zeichnet sich das etablierte Testsystem durch seine Praktikabilität und Zuverlässigkeit aus (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.3). Besonders die Bestimmung der IL-2 Expression erlaubt die Beobachtung der wirksamen, biologisch aktiven CsA Dosen, die sich wesentlich zwischen den einzelnen Individuen unterscheiden. Die Etablierung dieses Vollbluttestsystems ist ein erster Schritt in der Entwicklung eines für die Klinikroutine geeigneten Diagnoseverfahrens zur Optimierung und Individualisierung der CsA Therapie. Das etablierte Testsystem stellt ein standardisiertes Messverfahren mit einer hohen Flexibilität bezüglich der Lagerzeiten für die Vollblutproben und der Blutentnahmezeiten dar (siehe Abb. 4.3). Jedoch sind weitere Prüfungen und Anpassungen für die klinische Anwendung nötig. Insbesondere für eine potenzielle Anwendung in der Transplantationsmedizin ist zu prüfen, ob die IL-2 und NFATc1 Expression durch die in der Transplantationsmedizin üblichen Kombination von CsA mit anderen Medikamenten differentiell beeinflusst werden und die Aussagefähigkeit des Testsystems erhalten bleibt. Zurzeit wird das etablierte Vollblut Testsystem von Kooperationspartnern in der Transplantationsmedizin versuchsweise parallel zur Routinediagnostik eingesetzt, um eine weitere Optimierung und Anpassung des Testsystems an die in der Klinik erforderlichen Rahmenbedingungen zu ermöglichen. Insbesondere Transplantationspatienten würden von einer individualisierten CsA Therapie profitieren, da sehr hohe und optimierbare CsA Dosen eingesetzt werden.

CsA zeichnet sich durch eine geringe therapeutische Breite, eine hohe Variabilität der biologischen Verfügbarkeit zwischen einzelnen Individuen und unerwünschte Nebenwirkungen aus (208, 236). Für die Optimierung der CsA Therapie ist ein zuverlässiges, praktikables und spezifisches Testsystem für die Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA essentiell. Das in dieser Arbeit etablierte Vollblut Testsystem ermöglicht über die Analyse der IL-2 und NFATc1 Expression die individuelle Bestimmung

der tatsächlich im Patienten stattfindenden Immunsuppression und könnte zur Individualisierung der CsA Therapie beitragen. Die individualisierte CsA Einnahme hätte den entscheidenden Vorteil, dass die einzusetzenden Medikamentendosen geringer wären und somit das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen sinken würde.

In der vorliegenden Arbeit wurde das etablierte Testsystem erstmals eingesetzt, um die Vollblutproben von CsA behandelten AD Patienten zu untersuchen. Die in den AD Patienten eingesetzten CsA Dosen sind, im Vergleich zu den in der Transplantationsmedizin eingesetzten CsA Dosen, sehr gering. Die intrazellulären IL-2 Färbungen zeichneten sich durch distinkte, gut voneinander zu unterscheidende Populationen der IL-2 produzierenden und nicht IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen, auch bei sehr geringen CsA Konzentrationen aus. Daher erfolgte aus Praktikabilitätsgründen bei der Untersuchung der Vollblutproben der AD Patienten nur die Bestimmung der IL-2 Expression.

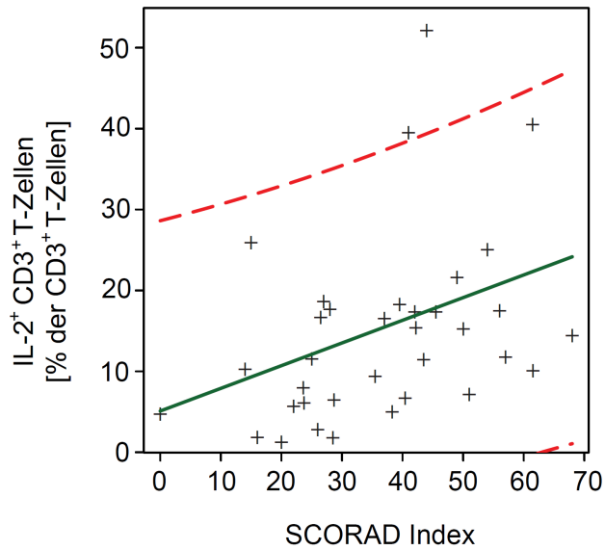
### **5.1.2 Gering dosiertes CsA führt zu einer partiellen Inhibierung der IL-2 Zytokin Expression**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutproben von schwer an AD erkrankten Patienten untersucht, die eine Therapie mit gering dosiertem CsA erhielten. Das etablierte Testsystem diente zur Bestimmung der potenziell möglichen IL-2 Zytokinantwort, die unter Einfluss der CsA Therapie in den im peripheren Blut befindlichen T-Zellen möglich ist. Es konnte eine Reduzierung der IL-2 Zytokin Antwort in den *ex vivo* stimulierten Vollblutproben festgestellt werden (siehe Abb. 4.5 und 4.6), unabhängig davon, ob die Blutentnahme zum Zeitpunkt der geringsten oder maximalen CsA Konzentration erfolgte (siehe Tab. 4.2).

Die in den AD Patienten angewendete CsA Dosis von  $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d war so gering, dass die Fähigkeit der T-Zellen aktiviert zu werden nur reduziert wurde und keine komplette Blockade der T-Zell Aktivierung nachgewiesen wurde. Die AD Patienten zeigten während der Therapie mit gering dosiertem CsA eine deutliche Reduzierung des SCORAD Index (siehe Abb. 4.4). Demzufolge scheint eine partielle Inhibierung der T-Zell Aktivität ausreichend zu sein, um das klinische Bild zu verbessern und den Leidensdruck der AD Patienten zu reduzieren. Ein linearer Zusammenhang der IL-2 Expression und der SCORAD Index Werte der AD Patienten ist in Abbildung 5.2 dargestellt und veranschaulicht, dass bei einem hohen SCORAD Index, wie er bei unbehandelten AD Patienten vorliegt, eine hohe Anzahl an IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten ist. Eine Minderung der klinischen Symptome, z.B. durch die Therapie mit CsA, ist mit einer Reduzierung der Anzahl an IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen verknüpft (siehe Abb. 4.5). Dass AD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern eine erhöhte IL-2 Expression zeigen, ist bekannt (258) und trägt wesentlich zum T-Zell vermittelten Krankheitsprozess der AD bei. Ursprünglich wurde das Zytokin IL-2 als Wachstumsfaktor definiert. Doch IL-2 hat vielfältige Effekte. Es ist ein



proinflammatorisches Zytokin und fördert auch durch Expansion der Th-Zellen den Entzündungsprozess. Im Gegensatz dazu entfaltet IL-2 seine entzündungshemmende Wirkung, indem es die Differenzierung der proinflammatorischen Th17-Zellen blockiert und die Entwicklung und Erhaltung von peripheren Treg-Zellen unterstützt (85, 86, 89).



**Abb. 5.2 Lineare Regression der IL-2 Expression und der SCORAD Index Werte von AD Patienten.**

Die mit Hilfe des Vollbluttestsystems ermittelten Frequenzen der IL-2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden gegen die entsprechenden Werte des SCORAD Index der einzelnen Spender aufgetragen. Durch eine Regressionsanalyse konnte ein linearer Zusammenhang (grüne Linie) festgestellt werden. Die roten Linien begrenzen den Wertebereich, in dem mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zukünftig ermittelte Werte liegen.

Mit Hilfe des etablierten Testsystems können die verschiedenen CsA Konzentrationen anhand der im stimulierten Vollblut gemessenen IL-2 Expression verglichen werden (siehe Tab. 5.1).

**Tab. 5.1 Vergleich der Therapie mit gering und höher dosiertem CsA**

CsA behandelte Patienten	gering dosiertes CsA	hoch dosiertes CsA
CsA Dosis [mg/kg/d]	1,68 - 2,52	3 - 5 <sup>a,b</sup>
CsA Serumkonzentration [µg/l] <sup>c</sup>	43 - 101	150 - 300 <sup>a</sup>
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt der minimalen CsA Konzentration vs. vor CsA Therapie [%]	46,93 ± 32,17	-
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen CsA Konzentration vs. vor CsA Therapie [%]	17,95 ± 7,80	-
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen CsA Konzentration vs. IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt der minimalen CsA Konzentration [%]	38,24	8 <sup>c</sup>
<i>Ex vivo</i> CsA behandeltes Vollblut	gering dosiertes CsA	hoch dosiertes CsA
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen bei 100 nM CsA [%]	66,41 ± 6,71	-
IL-2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T-Zellen bei 300 nM CsA [%]	-	20,71 ± 2,91

<sup>a</sup> Referenz (259)

<sup>b</sup> Referenz (260)

<sup>c</sup> Daten von AD Patienten die mit exemplarisch mit 5 mg/kg/d CsA behandelt wurden (n = 2)

Die Gegenüberstellung der Effekte von gering dosiertem CsA gegen hoch dosiertes CsA macht deutlich, dass die Erhöhung der CsA Dosis von 2 mg/kg/d auf 5 mg/kg/d in den zwei exemplarisch gemessenen AD Patienten zu einer drastischen Reduzierung der potenziellen IL-2 Zytokin Antwort führte (siehe Tab. 5.1). *In vitro* wurde zudem mit isolierten Treg- und Teff-Zellen gesunder Spender in Kokulturversuchen gezeigt, dass geringe CsA Dosierungsunterschiede zu differenziellen Effekten auf die Proliferation führten (siehe Tab. 5.2). Die vorliegende CsA Konzentration ist somit für die von CsA vermittelten Effekte entscheidend und bereits geringe Dosierungsunterschiede führen zu unterschiedlichen Effekten. Während eine geringe CsA Konzentration die Proliferation der Treg-Zellen fördert, kann eine Erhöhung der CsA Dosis bereits zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der T-Zell Aktivierung, der IL-2 Synthese, der Proliferation und der Differenzierung führen.

### **5.1.3 Gering dosiertes CsA beeinflusst nicht die Frequenz der potenziell in die Haut einwandernden T-Zellen im peripheren Blut**

Die unverhältnismäßige Reaktion der T-Zellen, z.B. auf Allergene und Superantigene, ist ein entscheidender Bestandteil des AD Pathomechanismus. Die CsA abhängige Verbesserung der klinischen Symptome belegt einmal mehr die Schlüsselrolle der T-Zellen in der Pathogenese der AD. Dabei ist insbesondere die Population der in die Haut einwandernden CLA<sup>+</sup> T-Zellen in den atopischen Hautläsionen involviert (246, 261). CLA ist ein Rezeptor, der bei der selektiven Migration der T-Zellen in die Haut beteiligt ist (262, 263). Etwa 90 % der in die Haut infiltrierte T-Zellen exprimieren den CLA Rezeptor (246). In der vorliegenden Arbeit konnte eine höhere Frequenz an CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den AD Patienten festgestellt werden (siehe Abb. 4.8). Dies bestätigt die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse einer erhöhten CLA Expression innerhalb der Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den unbehandelten AD Patienten (261, 264).

Das gering dosierte CsA führte zu keiner Veränderung der Frequenz an CLA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der AD Patienten, allerdings wiesen die CsA behandelten AD Patienten eine wesentliche Verbesserung des Gesundheitszustandes auf. Dies lässt vermuten, dass die signifikante Reduzierung der kutanen Entzündungsreaktion durch die Einschränkung der Teff-Zell abhängigen Zytokinproduktion vermittelt wird. Die Frequenz der potenziell in die Haut einwandernden T-Zellen scheint demnach zu einem gewissen Grad weniger relevant für die Stärke der kutanen Entzündungsreaktion zu sein, als die Fähigkeit dieser T-Zellen aktiviert zu werden und proinflammatorische Zytokine zu exprimieren.

Dass diese Verbesserung des Gesundheitszustandes der AD Patienten zum Teil auch durch die CsA induzierte Vergrößerung der Treg-Zell Population möglich sein kann, wird im Folgenden diskutiert.

## 5.2 Die Population der Treg-Zellen wird durch gering dosiertes CsA moduliert

Die Therapie mit gering dosiertem CsA führte neben der partiellen Inhibierung der IL-2 Zytokin Expression auch zu einer Modulation der Treg-Zell Population. Die Treg-Zellen sind eine spezialisierte Population an T-Zellen, die die Homöostase des Immunsystems aufrecht erhalten, indem sie die Aktivierung, Proliferation und Funktion anderer mit AD assoziierter Zelltypen, wie Eosinophile, Mastzellen, inflammatorische DZ, B- und T-Zellen inhibieren (196, 203). Die CsA abhängige Modulation der Treg-Zell Population ist ein wichtiger Aspekt der immunsuppressiven CsA Therapie. Die CsA behandelten Transplantationspatienten oder Patienten mit chronischen Entzündungsreaktionen, wie der AD, würden von einem positiven Effekt der CsA Therapie auf die Population der Treg-Zellen profitieren.

### 5.2.1 Gering dosiertes CsA führt *in vivo* zu einer Erhöhung der Treg-Zell Zahlen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frequenz und die absolute Zellzahl der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in AD Patienten unter der Therapie mit gering dosiertem CsA erhöht ist (siehe Abb. 4.13). Die Verbesserung der klinischen Symptome kann somit neben der Reduzierung der T-Zell Aktivität auch eine Folge der vergrößerten Treg-Zell Population sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Treg-Zellen der unbehandelten und CsA behandelten AD Patienten funktionell und im gleichen Maße suppressiv sind wie die Treg-Zellen gesunder Kontrollspender (siehe Abb. 4.12). Diese Modulation der Treg-Zell Population stellt eine attraktive Strategie für die Immuntherapie dar und unterstützt bereits publizierte Daten aus Tierversuchen. In ihnen wurde gezeigt, dass durch den adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen experimentelle Autoimmunerkrankungen oder allergische Erkrankungen verhindert oder sogar geheilt werden konnten (265-267).

Der Pathomechanismus der AD wird neben Allergen- und Superantigen-spezifischen hyperaktivierten Tef-Zellen auch durch die *S. aureus* Superantigen abhängige Reduzierung der immunsuppressiven Fähigkeit der Treg-Zellen bestimmt (168, 202, 268). Das bedeutet, dass Treg-Zellen im Allgemeinen eine schützende Rolle bei allergen-spezifischen Immunantworten einnehmen. Bellinghausen *et al.* und Verhagen *et al.* postulieren neben einem Defekt der allergen-spezifischen Treg-Zellen auch eine reduzierte Anzahl an Treg-Zellen in AD Patienten und führen diese Beobachtungen als ursächliche Gründe für eine allergische Entzündung an (269, 270). Im Gegensatz zu Bellinghausen *et al.* (269) und Verhagen *et al.* (270) wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen in AD Patienten weder abwesend noch funktionell defekt sind (siehe Abb. 4.12 und Abb. 4.13). Damit stimmen die Erkenntnisse dieser Arbeit mit anderen Publikationen überein. Ou *et al.*, Vukmanovic-Stejic *et al.* und Maggi *et al.* zeigten ebenfalls, dass die

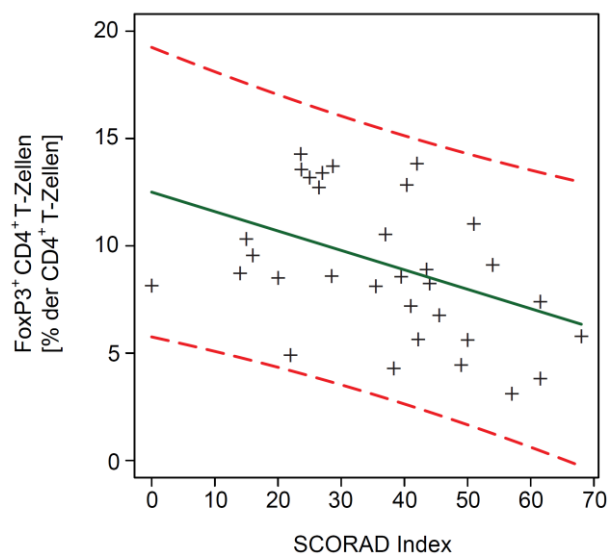
Treg-Zellen von AD Patienten funktionell und immunsuppressiv sind (268, 271, 272). Darüber hinaus sind die Teff-Zellen der AD Patienten nicht resistent gegen die Treg-Zell vermittelte Inhibierung, unabhängig davon, ob die Suppression durch autologe oder allogene Treg-Zellen erfolgte (siehe Abb. 4.12).

Die Funktionalität der Treg-Zellen allein ist nicht ausreichend, um die Entzündungsreaktion in der Haut herabzusetzen. Von potenzieller therapeutischer Relevanz ist die Fähigkeit der Treg-Zellen in die Haut einzuwandern, um so der kutanen Entzündungsreaktion entgegen zu wirken. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Anzahl an CLA exprimierenden FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen in den CsA behandelten AD Patienten gemessen (siehe Abb. 4.11) und dies ist im Einklang mit der in diesen Patienten vorliegenden Verbesserung der klinischen Symptome (siehe Abb. 4.4). Verschiedene Publikationen weisen auf ein verstärktes Auftreten von Treg-Zellen in der läsionalen Haut von AD Patienten hin (247, 263). In der vorliegenden Arbeit wurde im peripheren Blut eine signifikante Erhöhung der CLA<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen in den unbehandelten und mit CsA behandelten AD Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollspendern festgestellt. Die CsA Therapie sollte somit, wie bereits bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen war (siehe Abb.4.8), keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Treg-Zellen haben in die Haut einzuwandern. Die Anzahl der am Entzündungsherd suppressiv wirkenden Treg-Zellen kann letztendlich aber nur durch die Färbung der Treg-Zellen in Hautbiopsien der AD Patienten geklärt werden.

Die Therapie mit gering dosiertem CsA, d.h. einer Dosis von  $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d, führt zu einer Erhöhung der Frequenz und der Anzahl an peripheren FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen (siehe Abb. 4.13), ohne dabei signifikanten Einfluss auf die Populationen der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu nehmen (siehe Abb. 4.7 und Tab. 4.4). Diese Vergrößerung der Treg-Zell Population wurde durch den Vergleich von Einzelspenderdaten bestätigt (siehe Abb. 4.14) und war über den gesamten untersuchten Zeitraum von 12 – 20 Wochen in den einzelnen Spender stabil (siehe Tab. 4.7). Die untersuchte Population der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen zeichnet sich in allen drei untersuchten Spendergruppen durch eine für Treg-Zellen typisch konsistent geringe CD127 Expression und eine sehr hohe CD25 Expression aus (siehe Abb. 4.10). Die Richtigkeit der Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurde durch die Parallelfärbung mit einem alternativen FoxP3 Antikörper bestätigt (siehe Abb. 4.9). Durch eine Regressionsanalyse konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der FoxP3 Expression und dem Schweregrad der klinischen Symptome ermittelt werden. Abbildung 5.3 zeigt, dass AD Patienten mit einem hohen SCORAD Index weniger FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen aufweisen. Patienten die durch die Therapie mit gering dosiertem CsA eine Reduzierung der klinischen Symptome zeigen, weisen zudem eine größere Population an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen auf.

In den CsA behandelten AD Patienten wurde eine Vergrößerung der Treg-Zell Population festgestellt. Um die Stabilität der Treg-Zellen in den AD Patienten zu untersuchen, wurde von

drei Spendern die Analyse des Methylierungsstatus der hoch konservierten TSDR (Treg-Zell spezifische demethylierte Region) im FoxP3 Lokus durchgeführt. Epigenetische Modifizierungen bestimmter DNA Regionen kontrollieren die T-Zell Differenzierung (273). Die Demethylierung der TSDR ist für die Stabilität der FoxP3 Expression und der Ausprägung eines stabilen Treg-Zell Phänotypen entscheidend (273-276). Trotz einer eindeutigen Erhöhung der Frequenzen und absoluten Zellzahlen der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen innerhalb der einzelnen Spender während der Therapie mit gering dosiertem CsA wurde kein eindeutiges Ergebnis bzgl. des Demethylierungsstatus der TSDR ermittelt. Die Verwendung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der damit verbundenen geringen Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen, die nur 5 – 10 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen (20, 25), könnte zu größeren Fehlerbereichen und den vorliegenden Abweichungen in der Methylierungsanalyse führen.



**Abb. 5.3 Lineare Regression der Frequenz an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen und der SCORAD Index Werte von AD Patienten.**

Die ermittelten Frequenzen der FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen wurden gegen die entsprechenden SCORAD Index Werte der einzelnen Spender aufgetragen. Durch eine Regressionsanalyse konnte ein linearer Zusammenhang (grüne Linie) festgestellt werden. Die roten Linien begrenzen den Wertebereich, in dem mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zukünftig ermittelte Werte liegen.

Weitere Hinweise auf die Stabilität der Treg-Zell Population und welchen Einfluss eine erhöhte Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in den AD Patienten haben kann, wurde durch die exemplarische Messung von drei Spendern deutlich, die seit über acht Wochen kein CsA mehr eingenommen hatten. Da CsA eine Halbwertszeit von < 9 h hat (277), ist anzunehmen, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine therapeutisch wirksame CsA Konzentration vorlag. Die AD Patienten zeigten nach dem Absetzen der CsA Therapie ein Ansteigen der IL-2 Expression (siehe Abb. 4.15 A). Die Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen blieb jedoch innerhalb dieser 8 – 14 Wochen auf ihrem erhöhten Niveau stabil (siehe Abb. 4.15 B). Da alle drei AD Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme beschwerdefrei waren, ist ein potenzieller

inhibierender Einfluss der Treg-Zellen auf die AD vermittelnden Teff-Zellen, insbesondere die T-Zellen, wahrscheinlich. Die AD Patienten profitieren demnach nicht nur während der Therapie von der Anwendung geringer CsA Dosen und der damit verbundenen geringeren Wahrscheinlichkeit an unerwünschten Nebenwirkungen zu leiden, sondern sie scheinen auch von der stabilen, über die CsA Therapie hinaus bestehen bleibenden, vergrößerten Treg-Zell Population zu profitieren. Wie lange die Erhöhung der Treg-Zell Population in den einzelnen AD Patienten anhält, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete Vergrößerung der Treg-Zell Population in den CsA behandelten AD Patienten kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Zum einen ist eine CsA abhängige Induktion von Treg-Zellen aus naiven T-Zellen in der Peripherie der AD Patienten möglich. Darüber hinaus kann durch gering dosiertes CsA eine Expansion der Treg-Zellen zu einem Anwachsen der Treg-Zell Population führen.

### **5.2.2 Eine CsA abhängige Vergrößerung der Treg-Zell Population kann durch Induktion und/oder Expansion der Treg-Zellen erfolgen**

Die immense Bedeutung der Treg-Zellen für die Immuntherapie von Transplantationspatienten oder Patienten mit Autoimmunerkrankungen wird durch zahlreiche Publikationen über den Einfluss von Immunsuppressiva auf die Population der Treg-Zellen belegt. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen wurde jedoch in den folgenden Publikationen (25, 278, 279) eine CsA abhängige Reduzierung der Toleranz bzw. eine Inhibierung der Toleranzinduktion beobachtet. Die unterschiedlichen, durch CsA hervorgerufenen, Effekte könnten auf den verschiedenen CsA Konzentrationen beruhen. Mantel *et al.* setzten in ihren *in vitro* Versuchen zur FoxP3 Induktion mit humanen T-Zellen 1  $\mu\text{M}$  CsA ein (25). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bereits ab einer CsA Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  die IL-2 und NFATc1 Expression in den stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen nahezu vollständig gehemmt (siehe Abb. 4.2). Bei hohen CsA Konzentrationen werden die TZR abhängigen Signalwege inhibiert. Dies blockiert die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen, die IL-2 Zytokin Expression und die FoxP3 Expression (25, 278, 279). Neueste, noch unveröffentlichte Daten zeigen, dass geringe CsA Konzentrationen in einem murinen Transferkolitis Model Treg-Zellen induzieren. In immundefizienten Mäusen kann durch adoptiven Transfer von naiven T-Zellen, in denen zuvor die Treg-Zellen depletiert wurden, die entstehende Entzündungsreaktion im Darm durch die Gabe von gering dosiertem CsA therapiert werden. Es wurden CsA Konzentrationen von 0,1 – 20 mg/kg/d eingesetzt. Nur bei geringen CsA Konzentrationen von 0,1 – 0,5 mg/kg/d konnte eine deutliche Induktion von FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen und eine Reduzierung der Entzündungsreaktion im Darm beobachtet werden (Menning A. unveröffentlichte Daten). Gering dosiertes CsA führt über die partielle Inhibierung der TZR abhängigen Signalwege zur Simulation einer

suboptimalen Aktivierung naiver T-Zellen. Hohe CsA Konzentrationen führen hingegen zu einer kompletten Blockade der TZR abhängigen Signaltransduktionswege und unterbinden die darauf aufbauende T-Zell Aktivierung und Differenzierung. Kretschmer *et al.* und Kim *et al.* beschreiben im Tiermodell eine Treg-Zell Induktion durch suboptimale Stimulationsbedingungen (59, 60). *In vitro* wurde durch geringe Konzentrationen an anti CD3 Antikörpern eine erhöhte Frequenz an induzierten FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen gemessen (60). *In vivo* induzierte die Anwendung geringer Allergen Konzentrationen die höchste Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen (59). Die verabreichte Dosis des Immunsuppressivums CsA ist der ausschlaggebende Faktor, der über eine Blockierung oder eine partielle Reduzierung der TZR abhängigen Signalwege entscheidet und somit eine Toleranzinduktion im Patienten entweder ermöglicht oder unterdrückt.

*In vivo* Untersuchungen im humanen System zur Expansion oder Induktion von Treg-Zellen sind durch experimentelle und ethische Limitierungen schwer durchführbar. Aus diesem Grund wurden zur Untersuchung der CsA abhängigen molekularen Mechanismen auf die Population der Treg-Zellen *in vitro* Proliferationsversuche mit CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> Teff-Zellen durchgeführt. Die Kokultivierung der aus gesunden Normalspendern isolierten Treg-Zellen mit autolog isolierten Teff-Zellen erfolgte in Gegenwart verschiedener CsA Konzentrationen und einer Stimulation mit anti CD3/CD28 Antikörpern. Bei geringen CsA Konzentrationen (2 – 5 nM) wiesen die Treg-Zellen, im Vergleich zu den Teff-Zellen, eine höhere Zellteilungsrate pro Ausgangszelle ( $Z_p$ ) auf. Diese Ergebnisse weisen auf eine durch geringe CsA Konzentrationen verursachte Expansion der Treg-Zellen hin (siehe Abb. 4.18 und Tab 5.2).

**Tab. 5.2 Normalisierte  $Z_p$  der Teff- und Treg-Zellen bei geringen CsA Konzentrationen**

Normalisierte $Z_p$		CsA [nM]					
		0	1	2	3	4	5
Teff-Zellen	MW ± SD [%]	103 ± 6	103 ± 2	86 ± 18	73 ± 10	67 ± 12	58 ± 6
	n	5					
Treg-Zellen	MW ± SD [%]	101 ± 6	107 ± 10	103 ± 4	99 ± 7	94 ± 18	86 ± 5
	n	5					

Der proliferationsfördernde Effekt des CsA ist nur in einem sehr geringen CsA Konzentrationsbereich zu beobachten. Höhere CsA Konzentrationen wirken der Expansion der Treg-Zellen entgegen. Darüber hinaus kann durch die CsA abhängige Beeinflussung der Treg-Zell Proliferation postuliert werden, dass die Proliferation und Expansion der Treg-Zellen TZR abhängig induziert wird. Die Proliferation der Treg-Zellen wurde in Kokultur mit Teff-Zellen untersucht, um die Vergleichbarkeit des CsA Einflusses auf die Treg- und Teff-Zellen zu gewährleisten. Zudem sind die Treg-Zellen auf verschiedene, von den Teff-Zellen produzierte, Wachstumsfaktoren, z.B. IL-2, angewiesen (62). Die in dieser Arbeit

beschriebene Erhöhung der Treg-Zell Population durch gering dosiertes CsA *in vitro* (Proliferationsversuche) als auch *in vivo* (AD Patienten mit CsA Therapie) könnte erklären, warum in verschiedenen Transplantationsmodellen und bei humanen Nierentransplantationspatienten bei der Verwendung geringer CsA Konzentrationen ein positiver und verstärkender Effekt auf die Toleranz beobachtet wurde (259, 280, 281).

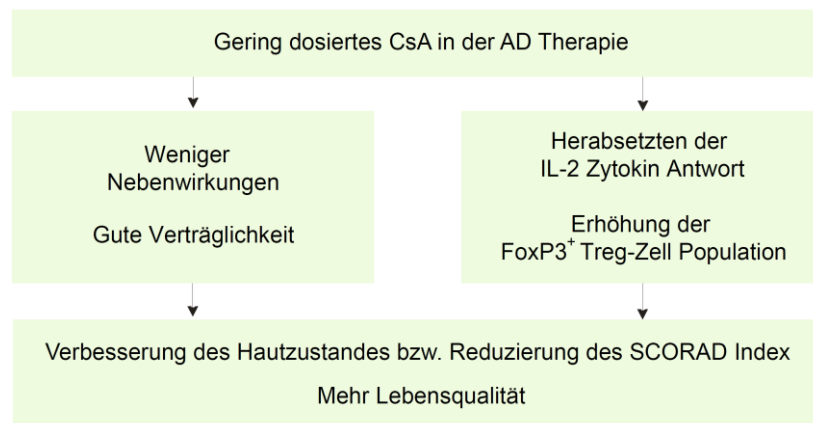
### **5.3 Gering dosiertes CsA hat einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der AD Patienten**

Die Therapie mit gering dosiertem CsA hat einen modulierenden Einfluss auf die potenziellen Immunantworten und auf die verschiedenen T-Zell Populationen. Die partielle Inhibierung der T-Zell Aktivierung und die Vergrößerung der Treg-Zell Population können zur Verbesserung der klinischen Symptome der untersuchten AD Patienten beitragen. In den Abbildungen 5.2 und 5.3 wurde der Zusammenhang zwischen der IL-2 Expression bzw. der Frequenz an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen und dem Schweregrad der Erkrankung, dem SCORAD Index, dargestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AD Patienten unter der Therapie mit gering dosiertem CsA eine Abnahme der IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen und eine vergrößerte FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zell Population aufweisen (siehe Abb. 4.5 und Abb. 4.13). Der positive Effekt der Therapie mit gering dosiertem CsA auf die Population der Treg-Zellen ist allerdings nur in einem bestimmten CsA Konzentrationsbereich möglich. Verschiedene CsA Konzentrationen führen zu unterschiedlichen Effekten auf die Treg-Zell Population. Durch höhere CsA Konzentrationen wird die TZR abhängige Aktivierung erheblich beeinträchtigt und die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen inhibiert, was sich negativ auf die Population der Treg-Zellen auswirkt (25, 278, 279) und die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Geringe CsA Konzentrationen hingegen resultieren in einer herabgesetzten TZR abhängigen Aktivierung und IL-2 Expression (siehe Abb. 4.5 und Abb. 4.6), einer gesteigerten Treg-Zell Proliferation *in vitro* (siehe Abb. 4.18) bzw. einer stabilen Erhöhung der Frequenz und Anzahl an FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen *in vivo* (siehe Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit an unerwünschten Nebenwirkungen zu leiden geringer (siehe Abb. 5.4).

Viele Anstrengungen werden unternommen, neue Strategien für Treg-Zell basierte Therapien für allergische Erkrankungen oder Transplantationpatienten und Patienten mit Autoimmunerkrankungen zu etablieren (22, 58, 282, 283). Das Ziel ist die Vergrößerung der suppressiv wirksamen Treg-Zell Population, die fehlgeleitete, überschießende oder unerwünschte Immunreaktionen in den Patienten unterbindet. Ein wesentliches Problem bei der Treg-Zell basierten Immuntherapie ist es, die ausreichende Anzahl an reinen Treg-Zellen zur Verfügung zu stellen. Der Einsatz von *ex vivo* expandierten oder induzierten Treg-Zellen



erfordert sehr aufwendige Präparationsprotokolle und es besteht die Gefahr der Verunreinigung bzw. der Expansion potenziell schädlicher Teff-Zellen. Zweckmäßiger und praktikabler erscheint dagegen die *in vivo* Induktion oder Expansion von Treg-Zellen. Die Modulation der Treg-Zell Population direkt im Patienten scheint besser geeignet zu sein für die Generierung von Antigen- oder Organ-spezifischen Treg-Zellen (284). Allerdings weist die Treg-Zell basierte Immuntherapie noch zahlreiche Limitierungen auf. Neben der Etablierung neuer Methoden zur *in vitro* und *in vivo* Expansion oder Induktion der Treg-Zellen müssen in zukünftigen Studien noch viele offene Fragen geklärt werden. Zum einen ist die Anzahl an Treg-Zellen, die für eine bestimmte Suppression erforderlich ist, unklar. Darüber hinaus müssen die in der Immuntherapie eingesetzten Treg-Zellen stabil sein, um die Expansion potenziell schädlicher nicht-Treg-Zellen im Patienten zu vermeiden. Die direkte Wirksamkeit der Treg-Zellen muss nachweisbar sein und die Antigenspezifität der Treg-Zellen muss eindeutig definiert werden können. Die Kombination aller Resultate aus Zellkulturversuchen mit humanem Material, Tiermodellen und klinischen Studien kann zu einer Optimierung der Immuntherapie und letztendlich zu einer gewünschten Modulation der Immunantwort im Patienten führen.



**Abb. 5.4 Gering dosiertes CsA führt zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes in den AD Patienten.** Die AD Patienten profitieren von CsA vermittelten Effekten auf die potenziell mögliche Immunantwort und die Population der Treg-Zellen. Durch die geringen Dosen ist die CsA Therapie besser verträglich.

Das in dieser Arbeit etablierte biologische CsA Funktionstestsystem ist ein weiterer Schritt in Richtung einer individuell gestalteten immunsuppressiven CsA Therapie und leistet somit einen Beitrag, die Lebensqualität und Sicherheit der CsA behandelten Patienten zu erhöhen. Die erzielten Erkenntnisse zur Beeinflussung der Treg-Zell Population bzw. der T-Zell Aktivierbarkeit durch gering dosiertes CsA hilft die in den AD Patienten stattfindenden CsA bedingten Mechanismen weiter zu entschlüsseln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen anregen, neue Mechanismen des AD zugrunde liegenden Pathomechanismus aufzudecken und innovative Strategien für die Treg-Zell basierte Immuntherapie zu entwickeln.

## 6 Ausblick

Die CsA Therapie stellt eine bedeutende und weitverbreitete immunsuppressive Therapie dar. Neben der Anwendung in der Dermatologie werden insbesondere Transplantationspatienten mit CsA behandelt. Der Erfolg einer CsA Therapie ist dabei nicht nur von der angemessenen und effektiven Unterdrückung des Immunsystems abhängig, sondern auch vom Auftreten der durch CsA hervorgerufenen unerwünschten Nebenwirkungen. Die verabreichten CsA Dosen haben dabei wesentlichen Einfluss auf das Auftreten dieser Nebenwirkungen. Das in dieser Arbeit etablierte Testsystem zur Bestimmung der Effekte des biologisch aktiven CsA im Blut von Patienten, kann eine Möglichkeit darstellen, die CsA Therapie zu optimieren, die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenwirkungen zu reduzieren und die CsA Therapie für den einzelnen Patienten individueller und somit sicherer zu gestalten. Neben weiterführenden Qualitätsprüfungen und Zulassungsstudien zur Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien, sind hinsichtlich der Anwendung dieses Testsystems für diagnostische Zwecke in der Klinik in weiteren Studien folgende Aspekte zu prüfen:

1. Kann die CsA Therapie signifikant durch das etablierte Testsystem optimiert werden?
2. Ist für die Dosisoptimierung die Bestimmung der IL-2 und NFATc1 Expression der stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen hinreichend?
3. Bleibt die Aussagekraft des Vollbluttestsystems auch bei Kombinationstherapien mit anderen Medikamenten neben CsA erhalten?
4. Werden die IL-2 und NFATc1 Expression der stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen differenziell durch die anderen eingesetzten Medikamente beeinflusst?
5. Ist das Vollbluttestsystem gut in die Klinikroutine integrierbar?

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit bei AD Patienten, die eine Therapie mit gering dosiertem CsA erhielten, eine Vergrößerung der Population an funktionell aktiven Treg-Zellen festgestellt. Folgende Aspekte sollten hinsichtlich dieser Modulation der Treg-Zell Population untersucht werden:

1. Finden bei der Therapie mit gering dosiertem CsA neben der Treg-Zell Expansion auch Prozesse der Treg-Zell Induktion statt?
2. Welche Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren sind bei der Treg-Zell Induktion involviert?

Darüber hinaus ist insbesondere die Stabilität der Treg-Zellen nach dem Absetzen der CsA Therapie und die weitere Entwicklung des Krankheitsbildes der AD Patienten interessant. Da in der vorliegenden Arbeit nur drei AD Patienten nach dem Beenden der CsA analysiert wurden, sind wiederholte Messungen der Treg-Zell Population und der IL-2 Expression im Blut weiterer Patienten, sowie eine parallele Beobachtung des Hautbildes anzustreben. Dazu sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie stabil sind die Treg-Zellen nach dem Absetzen der CsA Therapie?
2. Korreliert eine eintretende Verringerung der Treg-Zellzahl nach dem Absetzen der CsA Therapie mit einem sich verschlechternden Hautbild?
3. Führen bestimmte Ereignisse, z.B. eine Infektion, nach dem Absetzen der CsA Therapie zu einer Veränderung der Treg-Zellzahl und des Hautbildes?

Die Therapie mit gering dosiertem CsA führte bei den in dieser Arbeit untersuchten AD Patienten zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome. Es gibt wenige Beispiele aus der Klinik, dass einzelne AD Patienten nicht wie gewünscht auf die CsA Therapie reagierten, sich keine Verbesserung des Hautbildes einstellte und die CsA Therapie abgebrochen werden musste. Um die AD Patienten aufzuspüren, die nicht auf die CsA Therapie ansprechen, ist die Vergrößerung der Patientenkohorte unumgänglich. Durch die Untersuchung dieser ausgewählten, nicht auf die CsA Therapie ansprechenden AD Patienten könnten aufschlussreiche Erkenntnisse, u.a. über den Einfluss der Treg-Zellen auf den Krankheitsverlauf erworben werden. Folgende Fragestellungen sollten in diesem Zusammenhang untersucht werden:

1. Unterscheiden sich die AD Patienten, die nicht auf die CsA Therapie ansprechen, in ihrem Krankheitsbild zu den erfolgreich mit CsA behandelten AD Patienten?
2. Wie wirkt sich die CsA Therapie auf die Aktivierbarkeit der T-Zellen in diesen, nicht auf die CsA Therapie ansprechenden AD Patienten aus?
3. Tritt bei AD Patienten, die nicht auf die CsA Therapie ansprechen, eine Vergrößerung der funktionell aktiven Treg-Zell Population auf?
4. Welche Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren könnten bei diesen nicht auf die CsA Therapie ansprechenden AD Patienten differentiell reguliert sein?

## 7 Zusammenfassung

Die AD ist eine T-Zell vermittelte, chronische, rezidivierende und entzündliche Erkrankung der Haut, die in schweren Fällen erfolgreich mit gering dosiertem CsA behandelt wird. Dabei führt das Immunsuppressivum CsA über die Inhibierung der Phosphatase CaN zur Blockierung der TZR vermittelten Signaltransduktionswege und nimmt somit Einfluss auf die TZR abhängige Entwicklung der T-Zellen.

Es ist bekannt, dass suboptimale Stimulationsbedingungen im Mausmodell *in vitro* und *in vivo* zur Induktion von immunsuppressiven Treg-Zellen führen (59, 60). In der vorliegenden Arbeit war zu prüfen, ob die Therapie mit gering dosiertem CsA in den AD Patienten zu vergleichbaren, suboptimalen Stimulationsbedingungen für die T-Zellen führt und eine Modulation der Treg-Zell Population zu beobachten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Testsystem etabliert, das die Bestimmung der Effekte von biologisch aktivem CsA auf die Aktivierbarkeit von peripheren T-Zellen im Blut der zu untersuchenden AD Patienten ermöglicht. Hierfür erfolgte in *ex vivo* stimulierten Vollblutproben die durchflusszytometrische Bestimmung der CaN abhängigen und CsA sensitiven IL-2 Zytokin Expression und der Expression des Transkriptionsfaktors NFATc1 in CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die in dieser Arbeit untersuchten AD Patienten zeigten während der Therapie mit gering dosiertem CsA ( $2,1 \pm 0,4$  mg/kg/d) signifikante Verbesserungen des Krankheitsbildes ( $n = 17$ ;  $P < 0,001$ ).

Mit Hilfe des Vollbluttestsystems wurde eine signifikante Reduktion der IL-2 exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen um  $53,1 \pm 32,1$  % ( $n = 24$ ;  $P < 0,001$ ) in den mit gering dosiertem CsA behandelten AD Patienten festgestellt. Neben dieser partiellen Inhibierung der T-Zell Aktivierbarkeit wurde eine signifikante Vergrößerung der Population an immunsuppressiven FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-Zellen in den mit gering dosiertem CsA behandelten AD Patienten ( $n = 24$ ) im Vergleich zu den unbehandelten AD Patienten ( $n = 20$ ) gemessen. Die Frequenzen und absoluten Zellzahlen der Treg-Zellen stiegen um das 1,4 bzw. um das 1,5 fache in den CsA behandelten AD Patienten an und waren über den untersuchten Zeitraum von bis zu 20 Wochen stabil. Die Treg-Zellen aus CsA behandelten und unbehandelten Patienten waren hierbei identisch hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Aktivität *in vitro*, ihrer Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle, wie CD25 und CD127, sowie ihrer Ausstattung mit dem Adhäsionsmolekül CLA, das eine Einwanderung in die Haut ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AD Patienten von der Therapie mit gering dosiertem CsA profitieren. Die Daten legen nahe, dass der therapeutische Effekt der CsA Therapie neben einer verminderten T-Zell Aktivierbarkeit auch auf der Zunahme einer funktionell aktiven Treg-Zell Population beruhen kann.

## 8 Summary

AD is a T-cell dependent chronic relapsing inflammatory skin disorder for which CsA has been shown to be an effective treatment for severe cases. CsA exerts immunosuppressive activity by inhibiting CaN dependent signal transduction pathways downstream of the TCR, thereby influencing TCR dependent cell fate decisions.

It has been demonstrated in murine animal models, that subimmunogenic stimulation conditions promote Treg-cell inductions *in vitro* and *in vivo* (59, 60). The aim of this work was to investigate, whether low dose CsA therapy in AD patients leads to suboptimal T-cell stimulation conditions and modulation of the Treg cell compartment.

In order to determine biologically active CsA in blood samples of CsA treated patients, a whole blood assay was established. Using flow cytometry, IL-2 and NFATc1 expression of CD3<sup>+</sup> T-cells were measured in *ex vivo* stimulated whole blood samples to determine the T-cell acitivatability in CsA treated AD patients.

In this study it is shown that AD patients were successfully treated with low dose CsA ( $2.1 \pm 0.4$  mg/kg/d) indicated by an improvement of symptoms ( $n = 17$ ;  $P < 0,001$ ). Using the whole blood assay it could be demonstrated, that TCR signaling in stimulated peripheral blood T-cells of CsA treated AD patients was reduced to  $53,1 \pm 32,1$  % ( $n = 24$ ;  $P < 0,001$ ). Beside this partial inhibition of TCR signaling it could be shown, that low dose CsA treated AD patients ( $n = 24$ ) had higher absolute numbers (1.5 fold change) and frequencies (1.4 fold change) of peripheral FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg-cells compared to untreated AD patients ( $n = 20$ ). During low dose CsA therapy (up to 20 weeks) this enlarged Treg-cell population remained stable. In addition, low dose CsA therapy did not influence skin homing properties, expression of Treg-cell specific surface molecules like CD25 and CD127 and cell numbers of CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations.

The results of this work demonstrate that AD patients benefit from low dose CsA therapy. In conclusion, the therapeutic effect of low dose CsA therapy in AD patients could be mediated by a reduction of T-cell activatability and by an increase in functional Treg-cell numbers.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10: 581-7
2. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascrain R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6: 15-25
3. Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 28: 445-89
4. Zhu J, Paul WE. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-69
5. Zhu J, Paul WE. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20: 4-12
6. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9: 833-44
7. Ohkura N, Sakaguchi S. 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 32: 95-106
8. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-82
9. Gallegos AM, Bevan MJ. 2006. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 209: 290-6
10. Kyewski B, Klein L. 2006. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24: 571-606
11. Lohmann T, Leslie RD, Londei M. 1996. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 9: 385-9
12. Semana G, Gausling R, Jackson RA, Hafler DA. 1999. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun* 12: 259-67
13. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13: 829-40
14. Jenkins MK, Schwartz RH. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165: 302-19
15. Alferink J, Tafuri A, Vestweber D, Hallmann R, Hammerling GJ, Arnold B. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 282: 1338-41
16. Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR. 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 188: 409-14
17. Walker LS, Abbas AK. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2: 11-9
18. Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-52
19. Chatila TA. 2009. Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 38: 265-72, vii
20. Thompson C, Powrie F. 2004. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol* 4: 408-14
21. Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62
22. Chatila TA. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116: 949-59; quiz 60
23. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120: 227-35; quiz 36-7
24. Zheng Y, Rudensky AY. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8: 457-62
25. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176: 3593-602
26. Shevach EM. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu Rev Immunol* 18: 423-49
27. Chatila TA. 2008. Molecular mechanisms of regulatory T-cell development. *Chem Immunol Allergy* 94: 16-28
28. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626-35
29. Josefowicz SZ, Rudensky A. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30: 616-25
30. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. 2005. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4: 579-86
31. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212: 8-27
32. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64

33. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. 2007. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 119: 482-7
34. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203: 1701-11
35. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. 2008. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 223: 371-90
36. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9: 194-202
37. Torgerson TR, Ochs HD. 2007. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 120: 744-50; quiz 51-2
38. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106: R75-81
39. Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, Hermine O, Vijay S, Gambineri E, Cerf-Bensussan N, Fischer A, Ochs HD, Goulet O, Ruemmele FM. 2007. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 132: 1705-17
40. Riley JL, June CH. 2005. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105: 13-21
41. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8: 523-32
42. Shevach EM. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-45
43. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566-9
44. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104: 2840-8
45. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174: 1783-6
46. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, Ley TJ. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27: 635-46
47. Thornton AM, Shevach EM. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-96
48. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2480-8
49. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8: 1353-62
50. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111: 251-9
51. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204: 1303-10
52. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-12
53. Mellor AL, Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762-74
54. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118: 240-9
55. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107: 3925-32
56. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21: 503-13
57. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180: 5916-26
58. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. 2009. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol* 123: 749-55; quiz 56-7
59. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6: 1219-27
60. Kim JM, Rudensky A. 2006. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212: 86-98

61. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199: 1455-65
62. Khattar M, Chen W, Stepkowski SM. 2009. Expanding and converting regulatory T cells: a horizon for immunotherapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57: 199-204
63. Rautajoki KJ, Kylaniemi MK, Raghav SK, Rao K, Lahesmaa R. 2008. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med* 40: 322-35
64. Fietta P, Delsante G. 2009. The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 102: 61-74
65. Wan YY. 2010. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130: 166-71
66. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73
67. Paul WE, Seder RA. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-51
68. O'Garra A, Arai N. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10: 542-50
69. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21: 713-58
70. Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13: 139-45
71. Jorritsma PJ, Brogdon JL, Bottomly K. 2003. Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4+ T cells. *J Immunol* 170: 2427-34
72. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. 2004. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 202: 139-56
73. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185: 817-24
74. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-69
75. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338-42
76. Mowen KA, Glimcher LH. 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* 202: 203-22
77. Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 173-88
78. Tahvanainen J, Pykalainen M, Kallonen T, Lahteenmaki H, Rasool O, Lahesmaa R. 2006. Enrichment of nucleofected primary human CD4+ T cells: a novel and efficient method for studying gene function and role in human primary T helper cell differentiation. *J Immunol Methods* 310: 30-9
79. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-32
80. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-41
81. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-52
82. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 226: 57-79
83. Clark RA. 2010. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* 130: 362-70
84. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. 2009. More stories on Th17 cells. *Cell Res* 19: 399-411
85. Malek TR, Castro I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33: 153-65
86. Belz GT, Masson F. 2010. Interleukin-2 tickles T cell memory. *Immunity* 32: 7-9
87. Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. 2006. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 349-66
88. Gaffen SL. 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14: 63-77
89. Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. 2008. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226: 19-28
90. Lenardo MJ. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353: 858-61
91. Van Parijs L, Biuckians A, Ibragimov A, Alt FW, Willerford DM, Abbas AK. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* 158: 3738-45
92. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10: 371-8
93. Nel AE. 2002. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol* 109: 758-70
94. Beetz S, Marischen L, Kabelitz D, Wesch D. 2007. Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol Res* 37: 97-111
95. Rojo JM, Bello R, Portoles P. 2008. T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol* 640: 1-11



96. Wilkinson SE, Nixon JS. 1998. T-cell signal transduction and the role of protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* 54: 1122-44
97. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24: 419-66
98. Acuto O, Michel F. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3: 939-51
99. Pages F, Ragueneau M, Rottapel R, Truneh A, Nunes J, Imbert J, Olive D. 1994. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369: 327-9
100. Khoshnan A, Bae D, Tindell CA, Nel AE. 2000. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165: 6933-40
101. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27: 591-619
102. Bour-Jordan H, Bluestone JA. 2009. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 229: 41-66
103. Billadeau DD. 2010. T cell activation at the immunological synapse: vesicles emerge for LATer signaling. *Sci Signal* 3: pe16
104. Dong S, Corre B, Nika K, Pellegrini S, Michel F. 2010. T cell receptor signal initiation induced by low-grade stimulation requires the cooperation of LAT in human T cells. *PLoS One* 5: e15114
105. Zikherman J, Jenne C, Watson S, Doan K, Raschke W, Goodnow CC, Weiss A. 2010. CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity* 32: 342-54
106. Mustelin T, Tasken K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 371: 15-27
107. Sommers CL, Samelson LE, Love PE. 2004. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays* 26: 61-7
108. Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6: 67-78
109. Sahu N, August A. 2009. ITK inhibitors in inflammation and immune-mediated disorders. *Curr Top Med Chem* 9: 690-703
110. Seminario MC, Wange RL. 2003. Lipid phosphatases in the regulation of T cell activation: living up to their PTEN-tial. *Immunol Rev* 192: 80-97
111. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. 2006. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 25: 701-15
112. Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-34
113. Mor A, Philips MR. 2006. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* 24: 771-800
114. Das J, Ho M, Zikherman J, Govern C, Yang M, Weiss A, Chakraborty AK, Roose JP. 2009. Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells. *Cell* 136: 337-51
115. Tao L, Wadsworth S, Mercer J, Mueller C, Lynn K, Siekierka J, August A. 2002. Opposing roles of serine/threonine kinases MEKK1 and LOK in regulating the CD28 responsive element in T-cells. *Biochem J* 363: 175-82
116. Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH. 1997. The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272: 14057-61
117. Marinari B, Costanzo A, Viola A, Michel F, Mangino G, Acuto O, Levrero M, Piccolella E, Tuosto L. 2002. Vav cooperates with CD28 to induce NF-kappaB activation via a pathway involving Rac-1 and mitogen-activated kinase kinase 1. *Eur J Immunol* 32: 447-56
118. Yamauchi J, Kaziro Y, Itoh H. 1999. Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells. *J Biol Chem* 274: 1957-65
119. Isakov N, Altman A. 2002. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 20: 761-94
120. Frischbutter S, Gabriel C, Bendfeldt H, Radbruch A, Baumgrass R. 2011. Dephosphorylation of Bcl-10 by calcineurin is essential for canonical NF-kappaB activation in Th cells. *Eur J Immunol*
121. Lewis RS. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19: 497-521
122. Choi JH, Ryu SH, Suh PG. 2007. On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 47: 104-16
123. Oh-hora M. 2009. Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* 231: 210-24
124. Hogan PG, Lewis RS, Rao A. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28: 491-533
125. Kahl CR, Means AR. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24: 719-36
126. Oh-hora M, Rao A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20: 250-8
127. Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. 1988. Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 61: 149-200
128. Baine I, Abe BT, Macian F. 2009. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunol Rev* 231: 225-40
129. Klee CB, Ren H, Wang X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273: 13367-70
130. Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E. 1999. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury. *Prog Neurobiol* 58: 1-30

131. Rao A, Luo C, Hogan PG. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-47
132. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498: 1-18
133. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476-89
134. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-32
135. Kiani A, Rao A, Aramburu J. 2000. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12: 359-72
136. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. 1998. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627-37
137. Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392: 42-8
138. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930-4
139. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93: 851-61
140. Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Hofer T, Palmethofer A. 2006. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol* 27: 461-9
141. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, Konig T, Avots A, Schmitt E, Berberich-Siebelt F, Schimpl A, Serfling E. 2002. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 16: 881-95
142. Moretta A, Ciccone E, Pantaleo G, Tambussi G, Bottino C, Melioli G, Mingari MC, Moretta L. 1989. Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunol Rev* 111: 145-75
143. Johnson HM, Russell JK, Pontzer CH. 1991. Staphylococcal enterotoxin superantigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 198: 765-71
144. Micusan VV, Thibodeau J. 1993. Superantigens of microbial origin. *Semin Immunol* 5: 3-11
145. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-8
146. Li Y, Sedwick CE, Hu J, Altman A. 2005. Role for protein kinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ) in TCR/CD28-mediated signaling through the canonical but not the non-canonical pathway for NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 280: 1217-23
147. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. 1976. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6: 468-75
148. Vine W, Bowers LD. 1987. Cyclosporine: structure, pharmacokinetics, and therapeutic drug monitoring. *Crit Rev Clin Lab Sci* 25: 275-311
149. 1986. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. Analysis at three years. The Canadian Multicentre Transplant Study Group. *N Engl J Med* 314: 1219-25
150. Ryan C, Amor KT, Menter A. 2010. The use of cyclosporine in dermatology: part II. *J Am Acad Dermatol* 63: 949-72; quiz 73-4
151. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-15
152. Sieber M, Baumgrass R. 2009. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 7: 25
153. Barik S. 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 2889-900
154. Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Orti L, Pantoja-Uceda D, Pineda-Lucena A, Cyert MS, Redondo JM. 2009. A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* 33: 616-26
155. Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, Ke H. 2002. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12037-42
156. Jin L, Harrison SC. 2002. Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13522-6
157. Podtschaske M, Benary U, Zwinger S, Hofer T, Radbruch A, Baumgrass R. 2007. Digital NFATc2 activation per cell transforms graded T cell receptor activation into an all-or-none IL-2 expression. *PLoS One* 2: e935
158. Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. 2001. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods* 253: 95-112
159. Stern JB, Smith KA. 1986. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science* 233: 203-6
160. Batiuk TD, Kung L, Halloran PF. 1997. Evidence that calcineurin is rate-limiting for primary human lymphocyte activation. *J Clin Invest* 100: 1894-901

161. Baumgrass R, Zhang Y, Erdmann F, Thiel A, Weiwad M, Radbruch A, Fischer G. 2004. Substitution in position 3 of cyclosporin A abolishes the cyclophilin-mediated gain-of-function mechanism but not immunosuppression. *J Biol Chem* 279: 2470-9
162. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113: 651-7
163. Ellis C, Luger T, Abeck D, Allen R, Graham-Brown RA, De Prost Y, Eichenfield LF, Ferrandiz C, Giannetti A, Hanifin J, Koo JY, Leung D, Lynde C, Ring J, Ruiz-Maldonado R, Saurat JH. 2003. International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment strategies. *Br J Dermatol* 148 Suppl 63: 3-10
164. Novak N, Bieber T, Leung DY. 2003. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 112: S128-39
165. Leung DY. 2000. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 105: 860-76
166. Spergel JM, Paller AS. 2003. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 112: S118-27
167. Rudikoff D, Lebowitz M. 1998. Atopic dermatitis. *Lancet* 351: 1715-21
168. Hinz T, Staudacher A, Bieber T. 2006. [Advances in the pathogenesis of atopic dermatitis]. *Hautarzt* 57: 567-70, 72-5
169. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113: 832-6
170. Sehra S, Tuana FM, Holbreich M, Mousdicas N, Tepper RS, Chang CH, Travers JB, Kaplan MH. 2008. Scratching the surface: towards understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. *Crit Rev Immunol* 28: 15-43
171. Diepgen TL. 2001. Atopic dermatitis: the role of environmental and social factors, the European experience. *J Am Acad Dermatol* 45: S44-8
172. Hanifin J, Rajka G. 1980. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*: 44-7
173. Nosbaum A, Hennino A, Berard F, Nicolas JF. 2010. Patch testing in atopic dermatitis patients. *Eur J Dermatol* 20: 563-6
174. Lipozencic J, Wolf R. 2010. The diagnostic value of atopy patch testing and prick testing in atopic dermatitis: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28: 38-44
175. Ricci G, Dondi A, Patrizi A. 2009. Useful tools for the management of atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol* 10: 287-300
176. Novak N, Bieber T. 2004. Pathophysiologie der Atopischen Dermatitis. *Deutsches Ärzteblatt* 108-20
177. 1993. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186: 23-31
178. Soderhall C, Marenholz I, Kerschner T, Ruschendorf F, Esparza-Gordillo J, Worm M, Gruber C, Mayr G, Albrecht M, Rohde K, Schulz H, Wahn U, Hubner N, Lee YA. 2007. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol* 5: e242
179. Schultz Larsen FV, Holm NV. 1985. Atopic dermatitis in a population based twin series. Concordance rates and heritability estimation. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 114: 159
180. Gaspari A, Tyring S. 2008. *Clinical and Basic Immunodermatology*: Springer
181. Forrest S, Dunn K, Elliott K, Fitzpatrick E, Fullerton J, McCarthy M, Brown J, Hill D, Williamson R. 1999. Identifying genes predisposing to atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 104: 1066-70
182. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38: 441-6
183. O'Regan GM, Irvine AD. 2008. The role of filaggrin loss-of-function mutations in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 406-10
184. Brown SJ, McLean WH. 2009. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol* 129: 543-52
185. Werfel T. 2009. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129: 1878-91
186. Jakasa I, Koster ES, Calkoen F, McLean WH, Campbell LE, Bos JD, Verberk MM, Kezic S. 2011. Skin barrier function in healthy subjects and patients with atopic dermatitis in relation to filaggrin loss-of-function mutations. *J Invest Dermatol* 131: 540-2
187. Eichenfield LF, Hanifin JM, Beck LA, Lemanske RF, Jr., Sampson HA, Weiss ST, Leung DY. 2003. Atopic dermatitis and asthma: parallels in the evolution of treatment. *Pediatrics* 111: 608-16
188. Strachan DP. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-60
189. Murata Y, Ogata J, Higaki Y, Kawashima M, Yada Y, Higuchi K, Tsuchiya T, Kawainami S, Imokawa G. 1996. Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *J Invest Dermatol* 106: 1242-9
190. Bos JD, Brennikmeijer EE, Schram ME, Middelkamp-Hup MA, Spuls PI, Smitt JH. 2010. Atopic eczema or atopiform dermatitis. *Exp Dermatol* 19: 325-31
191. Plotz SG, Ring J. 2010. What's new in atopic eczema? *Expert Opin Emerg Drugs* 15: 249-67

192. Pastar Z, Lipozencic J, Ljubojevic S. 2005. Etiopathogenesis of atopic dermatitis--an overview. *Acta Dermatovenerol Croat* 13: 54-62
193. Hanifin JM. 2009. Evolving concepts of pathogenesis in atopic dermatitis and other eczemas. *J Invest Dermatol* 129: 320-2
194. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C. 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 175: 1285-90
195. Wollenberg A, Klein E. 2007. Current aspects of innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33: 35-44
196. Akdis M. 2006. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 18: 738-44
197. Albanesi C, Pastore S. 2010. Pathobiology of chronic inflammatory skin diseases: interplay between keratinocytes and immune cells as a target for anti-inflammatory drugs. *Curr Drug Metab* 11: 210-27
198. Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. 2011. IgE, Mast Cells, and Eosinophils in Atopic Dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*
199. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. 1996. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 106: 446-53
200. Leung DY, Bieber T. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet* 361: 151-60
201. Bohm I, Bauer R. 1997. [Th1 cells, Th2 cells and atopic dermatitis]. *Hautarzt* 48: 223-7
202. Ong PY, Leung DY. 2006. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 6: 384-9
203. Akdis CA, Akdis M. 2009. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123: 735-46; quiz 47-8
204. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung DY, Lipozencic J, Luger TA, Muraro A, Novak N, Platts-Mills TA, Rosenwasser L, Scheynius A, Simons FE, Spergel J, Turjanmaa K, Wahn U, Weidinger S, Werfel T, Zuberbier T. 2006. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy* 61: 969-87
205. Amor KT, Ryan C, Menter A. 2010. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol* 63: 925-46; quiz 47-8
206. Schmitt J, Schmitt N, Meurer M. 2007. Cyclosporin in the treatment of patients with atopic eczema - a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 606-19
207. Berth-Jones J, Graham-Brown RA, Marks R, Camp RD, English JS, Freeman K, Holden CA, Rogers SC, Oliwiecki S, Friedmann PS, Lewis-Jones MS, Archer CB, Adriaans B, Douglas WS, Allen BR. 1997. Long-term efficacy and safety of cyclosporin in severe adult atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 136: 76-81
208. Sommerer C, Giese T, Schmidt J, Meuer S, Zeier M. 2008. Cyclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression. *Transplantation* 85: 15-21
209. Dantal J, Pohanka E. 2007. Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 1: i4-10
210. Andoh TF, Bennett WM. 1998. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 265-70
211. AWMF. 2011. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. In *Therapie mit Ciclosporin in der Dermatologie*
212. Griffin PJ, Da Costa CA, Salaman JR. 1987. A controlled trial of steroids in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 43: 505-8
213. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. 1981. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med* 305: 266-9
214. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P. 1979. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 2: 1033-6
215. Hijnen DJ, ten Berge O, Timmer-de Mik L, Bruijnzeel-Koomen CA, de Bruin-Weller MS. 2007. Efficacy and safety of long-term treatment with cyclosporin A for atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 85-9
216. Lee SS, Tan AW, Giam YC. 2004. Cyclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis: a retrospective study. *Ann Acad Med Singapore* 33: 311-3
217. Zonneveld IM, De Rie MA, Beljaards RC, Van Der Rhee HJ, Wuite J, Zeegelaaar J, Bos JD. 1996. The long-term safety and efficacy of cyclosporin in severe refractory atopic dermatitis: a comparison of two dosage regimens. *Br J Dermatol* 135 Suppl 48: 15-20
218. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. 2001. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs* 61: 1957-2016
219. Kahan BD. 1985. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* 40: 457-76
220. Billaud EM. 2005. C2 versus C0 cyclosporine monitoring: still not the end. *Transplantation* 80: 542; author reply 3-4
221. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K, Wonigeit K, et al. 1995. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 17: 642-54

222. Lindholm A. 1995. Cyclosporine A: clinical experience and therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 17: 631-7
223. Wong G, Chapman JR. 2008. Cancers after renal transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 22: 141-9
224. Tsunoda SM, Aweeka FT. 1996. The use of therapeutic drug monitoring to optimise immunosuppressive therapy. *Clin Pharmacokinet* 30: 107-40
225. Sketris I, Yatscoff R, Keown P, Canafax DM, First MR, Holt DW, Schroeder TJ, Wright M. 1995. Optimizing the use of cyclosporine in renal transplantation. *Clin Biochem* 28: 195-211
226. Magnasco A, Rossi A, Catarsi P, Gusmano R, Ginevri F, Perfumo F, Ghiggeri GM. 2008. Cyclosporin and organ specific toxicity: clinical aspects, pharmacogenetics and perspectives. *Curr Clin Pharmacol* 3: 166-73
227. Sommerer C, Giese T, Meuer S, Zeier M. 2009. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: is there a clinical benefit? *Nephrol Dial Transplant* 24: 21-7
228. Holt DW. 2002. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 657-63
229. Yano I. 2008. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet* 23: 150-7
230. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Fukatsu S, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Tanaka K, Inui K. 2005. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 78: 168-81
231. van Rossum HH, Romijn FP, Sellar KJ, Smit NP, van der Boog PJ, de Fijter JW, van Pelt J. 2008. Variation in leukocyte subset concentrations affects calcineurin activity measurement: implications for pharmacodynamic monitoring strategies. *Clin Chem* 54: 517-24
232. De Groote D, Gevaert Y, Lopez M, Gathy R, Fauchet F, Dehart I, Jadoul M, Radoux D, Franchimont P. 1993. Novel method for the measurement of cytokine production by a one-stage procedure. *J Immunol Methods* 163: 259-67
233. Giese T, Zeier M, Schemmer P, Uhl W, Schoels M, Dengler T, Buechler M, Meuer S. 2004. Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation* 77: 339-44
234. Hartel C, Schumacher N, Fricke L, Ebel B, Kirchner H, Muller-Steinhardt M. 2004. Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK 506): impact of interleukin-2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect. *Clin Chem* 50: 141-51
235. Stein CM, Murray JJ, Wood AJ. 1999. Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem* 45: 1477-84
236. Barten MJ, Rahmel A, Boldt A, Dhein S, Bittner HB, Tarnok A, Mohr FW, Gummert JF. 2007. Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function. *Comput Biol Med* 37: 1367-73
237. Gummert JF, Barten MJ, van Gelder T, Billingham ME, Morris RE. 2000. Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology. *Transplantation* 70: 1038-49
238. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, Lobashevsky A, Redfield R, Schweitzer E, Heredia A, Reardon E, Davis C, Bentejewski C, Fung J, Shapiro R, Zeevi A. 2003. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant* 17: 77-88
239. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, Burdick J, Elmagd KA, Zeevi A, Lopez-Cepero M, Daller JA, Gritsch HA, Reed EF, Jonsson J, Hawkins D, Britz JA. 2006. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 82: 663-8
240. Sottong PR, Rosebrock JA, Britz JA, Kramer TR. 2000. Measurement of T-lymphocyte responses in whole-blood cultures using newly synthesized DNA and ATP. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 307-11
241. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. 1972. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 43: 404-9
242. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2: 2049-56
243. Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan Y. 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 379-85
244. Parish CR. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77: 499-508
245. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. 1999. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 68: 1356-61
246. Santamaria-Babi LF. 2004. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol* 14: 13-8
247. Caproni M, Torchia D, Antiga E, Volpi W, del Bianco E, Fabbri P. 2006. The effects of tacrolimus ointment on regulatory T lymphocytes in atopic dermatitis. *J Clin Immunol* 26: 370-5
248. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. 2006. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118: 178-89
249. Schulz F, Marenholz I, Folster-Holst R, Chen C, Sternjak A, Baumgrass R, Esparza-Gordillo J, Gruber C, Nickel R, Schreiber S, Stoll M, Kurek M, Ruschendorf F, Hubner N, Wahn U, Lee YA. 2007. A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1097-102

250. Wallemacq PE. 2004. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clin Chem Lab Med* 42: 1204-11
251. Hartel C, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H, Muller-Steinhardt M. 2002. Delayed cytokine mRNA expression kinetics after T-lymphocyte costimulation: a quantitative measure of the efficacy of cyclosporin A-based immunosuppression. *Clin Chem* 48: 2225-31
252. van den Berg AP, Twilhaar WN, Mesander G, van Son WJ, van der Bij W, Klompmaker IJ, Slooff MJ, The TH, de Leij LH. 1998. Quantitation of immunosuppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin-2 production. *Transplantation* 65: 1066-71
253. Pai SY, Fruman DA, Leong T, Neuberger D, Rosano TG, McGarigle C, Antin JH, Bierer BE. 1994. Inhibition of calcineurin phosphatase activity in adult bone marrow transplant patients treated with cyclosporine A. *Blood* 84: 3974-9
254. Sanquer S, Schwarzinger M, Maury S, Yakouben K, Rafi H, Pautas C, Kuentz M, Barouki R, Cordonnier C. 2004. Calcineurin activity as a functional index of immunosuppression after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 77: 854-8
255. Sommerer C, Konstandin M, Dengler T, Schmidt J, Meuer S, Zeier M, Giese T. 2006. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. *Transplantation* 82: 1280-5
256. Konstandin MH, Sommerer C, Doesch A, Zeier M, Meuer SC, Katus HA, Dengler TJ, Giese T. 2007. Pharmacodynamic cyclosporine A-monitoring: relation of gene expression in lymphocytes to cyclosporine blood levels in cardiac allograft recipients. *Transpl Int* 20: 1036-43
257. Sommerer C, Hartschuh W, Enk A, Meuer S, Zeier M, Giese T. 2008. Pharmacodynamic immune monitoring of NFAT-regulated genes predicts skin cancer in elderly long-term renal transplant recipients. *Clin Transplant* 22: 549-54
258. Antunez C, Torres MJ, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Santamaria-Babi LF, Vera A, Blanca M. 2006. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 17: 166-74
259. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyo JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloze P, Halloran PF. 2007. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 357: 2562-75
260. Hijnen D, Haeck I, van Kraats AA, Nijhuis E, de Bruin-Weller MS, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF. 2009. Cyclosporin A reduces CD4(+)/CD25(+) regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 124: 856-8
261. Seneviratne SL, Black AP, Jones L, Bailey AS, Ogg GS. 2007. The role of skin-homing T cells in extrinsic atopic dermatitis. *QJM* 100: 19-27
262. Lin YT, Wang CT, Chao PS, Lee JH, Wang LC, Yu HH, Yang YH, Chiang BL. 2011. Skin-homing CD4+ Foxp3+ T cells exert Th2-like function after staphylococcal superantigen stimulation in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 41: 516-25
263. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. 1997. Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA- memory T cells. *J Immunol* 159: 4611-9
264. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. 2000. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 143: 373-8
265. Jiang S, Lechler RI. 2006. CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy for allergy, autoimmune disease and transplant rejection. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5: 239-42
266. Wing K, Fehervari Z, Sakaguchi S. 2006. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 18: 991-1000
267. Verbsky JW. 2007. Therapeutic use of T regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol* 19: 252-8
268. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. 2004. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 113: 756-63
269. Bellinghausen I, Konig B, Bottcher I, Knop J, Saloga J. 2005. Regulatory activity of human CD4 CD25 T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology* 116: 103-11
270. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. 2006. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 117: 176-83
271. Vukmanovic-Stejic M, McQuaid A, Birch KE, Reed JR, Macgregor C, Rustin MH, Akbar AN. 2005. Relative impact of CD4+CD25+ regulatory T cells and tacrolimus on inhibition of T-cell proliferation in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 153: 750-7
272. Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2007. Demonstration of circulating allergen-specific CD4+CD25highFoxp3+ T-regulatory cells in both nonatopic and atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 120: 429-36
273. Lal G, Bromberg JS. 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 114: 3727-35
274. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5: e38

275. Nagar M, Vernitsky H, Cohen Y, Dominissini D, Berkun Y, Rechavi G, Amariglio N, Goldstein I. 2008. Epigenetic inheritance of DNA methylation limits activation-induced expression of FOXP3 in conventional human CD25-CD4+ T cells. *Int Immunol* 20: 1041-55
276. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9: 83-9
277. Schrier R. *Diseases of the kidney and urinary tract*: Lippincott Raven
278. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I. 2007. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant* 39: 537-45
279. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. 2006. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation* 82: 1484-92
280. Lu X, Zhou L, Chen S. 2004. Prolongation of skin allograft survival by combined feeding of donor spleen cells and cyclosporine in mice. *Transplant Proc* 36: 2429-31
281. Filantenkov A, Schmidt H, Reutzel-Selke A, Seifert M, Doebis C, Jurisch A, Pratschke J, Neuhaus P, Volk HD, Tullius SG. 2002. Initial organ engraftment with a short-term low-dose CyA treatment induces tolerance for consecutive grafts in a model of strong histoincompatibility. *Transplant Proc* 34: 2895-6
282. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. 2006. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 118: 1-9
283. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K. 2004. Nephin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 114: 1475-83
284. Tran DQ, Shevach EM. 2009. Therapeutic potential of FOXP3(+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells. *Hum Immunol* 70: 294-9

## 10 Publikationen

### Poster

- 2007 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg**  
“Drug induced modulation of T-cell activation and differentiation in atopic dermatitis patients”
- 2008 8<sup>th</sup> International conference on new trends in immunosuppression and immunotherapy, Berlin**  
“Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T-cell population in patients with atopic dermatitis”
- 2008 3<sup>rd</sup> ENII-MUGEN Immunology Summer School, Capo Caccia (I)**  
“Drug induced modulation of T-cell activation and differentiation in atopic dermatitis patients”
- 2008 Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien (Au)**  
“Drug induced modulation of T-cell activation and differentiation in atopic dermatitis patients”
- 2009 2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology, Berlin**  
“Regulatory T-cell induction by low-dose Cyclosporine A therapy in atopic dermatitis patients”

### Vorträge

- 2008 11<sup>th</sup> German Meeting on Th1/Th2 research, Marburg**  
“Drug induced modulation of T-cell activation and differentiation in atopic dermatitis patients”
- 2008 12<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar**  
“Drug induced modulation of T-cell activation and differentiation in atopic dermatitis patients”



**Publikationen****2007 Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3.**

Sieber M, Karanik M, Brandt C, Blex C, Podtschaske M, Erdmann F, Rost R, Serfling E, Liebscher J, Pätzelt M, Radbruch A, Fischer G, Baumgrass R.  
Eur J Immunol. 2007 Sep;37(9):2617-26. PMID: 17694572

**2009 Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T-cell population in patients with atopic dermatitis.**

Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R.  
Allergy. 2009 Nov;64(11):1588-96. Epub 2009 Apr 29. PMID: 19432936

**2010 Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T-cells.**

Brandt C\*, Liman P\*, Bendfeldt H, Müller K, Reinke P, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R.  
Cytometry A. 2010 Jul;77(7):607-13. PMID: 20583270

**2010 Low-dose, but not high-dose, cyclosporine A promotes regulatory T-cell induction, expansion, or both.**

Baumgrass R\*, Brandt C\*, Wegner F, Abdollahnia M, Worm M.  
J Allergy Clin Immunol. 2010 Jul;126(1):183-4; author reply 184. Epub 2010 Jun 12.  
PMID: 20542321

\* Autoren haben im gleichen Maße zur Erstellung der Arbeit beigetragen.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

ACID	Aktivierungs-induzierte Zelltod
AD	Atopische Dermatitis
AP1	Activator Protein 1
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zell Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CD	Cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat, Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl Ester
CK1	Casein Kinase 1
CRAC	Ca <sup>2+</sup> release activated Ca <sup>2+</sup>
CsA	Cyclosporin A
CLA	Cutaneous leucocyte-associated antigen
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CyP	Cyclophilin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERK 1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2
FACS	Fluoreszenz-vermittelte Zellsortierung
FcεRI	Fcε Rezeptor I
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead box P3
FSC	Vorwärtsstreulicht
Gads	Grb2 related adapter downstream of Shc
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

---

Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GSK3	Glykogensynthase Kinase 3
ICOS	Inducible co stimulator
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IgE	Immunglobulin E
IL-2	Interleukin-2
IκB	Inhibitor von NFκB
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> Rezeptoren
ITAM	Immunoreceptor tyrosin based activation motif
Itk	IL-2 induced tyrosine kinase
iTreg-Zelle	induzierte Treg-Zelle
JNK	c-jun N terminal kinase
K	Gesunder Kontrollspender
LAG3	Lymphozyten Aktivierungsgen 3
LAT	Linker for activated T-cells
LC	Langerhans Zelle
LT	Lymphotoxin
MACS	Magnetische Zellsortierung
MAPK	Mitogenassoziierte Proteinkinase
MEK	MAPK Erk Kinase
MEKK1	MAPK/Erk Kinase Kinase 1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK4	Mytogen activated protein kinase kinase 4
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Studienteilnehmer
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nTreg-Zelle	natürlich vorkommende Treg-Zelle
ORAI	Ca <sup>2+</sup> release activated Ca <sup>2+</sup> channel protein
<i>P</i>	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

---

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PJ	Propidiumjodid
PKC $\theta$	Proteinkinase $\theta$
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PTK	Proteintyrosinkinase
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RasGRP	Ras guanyl nucleotide releasing protein
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
RT	Raumtemperatur
SCORAD	Scoring of atopic dermatitis
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B
SD	Standardabweichung
SLP76	Cytosolic adapter protein src homology 2 domain containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa
SOS	Son of sevenless
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STIM	Stromal interaction molecule
Teff-Zelle	Effektor T-Zelle
Th-Zelle	Helfer T-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
TZR	T-Zell Rezeptor
ZAP70	$\zeta$ chain associated protein kinase of 70 kDa
Z <sub>p</sub>	Zellteilungen pro Ausgangszelle
[3H] TdR	Tritium markiertes Thymidin

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Claudia Brandt

Berlin, den 20.07.2011

