

**Der Einfluss von TGF- β 1 auf regulatorische T-Zellen in einem
murinen Modell für Asthma**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Katrin, Julia Presser
geboren in Darmstadt

Mainz, Juli 2007

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

02.10.2007

Manchmal ist sogar das Ende das Ziel

Martin Gerhard Reisenberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Asthma Bronchiale	1
1.1.1. Pathophysiologie des Asthmas	1
1.1.2. Immunpathogenese des Asthmas	3
1.2. Asthma im Tiermodell	4
1.2.1. Lungenfunktionsmessung an Mäusen	6
1.3. Regulatorische T-Zellen	7
1.3.1. Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen	7
1.3.2. Induzierte regulatorische T-Zellen	10
1.3.3. Suppressionsmechanismen	11
1.3.4. Regulatorische T-Zellen und Allergie	12
1.3.4.1. Regulatorische T-Zellen und Asthma	13
1.4. Transforming Growth Factor β	14
1.4.1. TGF- β Signalkaskade	15
1.4.2. TGF- β und Entzündung	17
1.4.3. TGF- β und die Generierung von Treg	17
1.4.4. Die Rolle von TGF- β bei Asthma	18
1.5. Hypothesen und Fragestellungen	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Laborgeräte	20
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3. Sonstige Verbrauchsmittel	21
2.1.4. Chemikalien	21
2.1.5. Antikörper	22
2.1.6. Microbeads für MACS-Isolierungen	22
2.1.7. CBA-, ELISA- und sonstige Kits	23
2.1.8. Oligonukleotide	23
2.1.9. Puffer und Lösungen	24
2.1.10. Wasser	25
2.1.11. Software	25

2.1.12. Versuchstiere	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien	27
2.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	27
2.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	27
2.2.4. DNA Elektrophorese	28
2.2.5. Herstellung von Einzelzellsuspensionen	28
2.2.5.1. Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus <i>muriner</i> Milz	28
2.2.5.2. Isolierung von CD4 ⁺ Zellen aus Milz-Einzelzellsuspensionen	29
2.2.5.3. Isolierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen aus Milz- Einzelzellsuspensionen	29
2.2.5.4. Kontrolle der Reinheit der Zellisolationen	30
2.2.6. Durchflusszytometrische Messungen	30
2.2.6.1. Herstellung der durchflusszytometrischen Proben	30
2.2.7. Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Messung der Atemwegshyperreagibilität (AHR)	31
2.2.7.1. Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge	31
2.2.7.1.1. Adoptiver Transfer von CD4 ⁺ CD25 ⁺ sowie CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen in sensibilisierte Mäuse	31
2.2.8. Messung der AHR gegenüber β -Methyl-Acetylcholin (MCh) mittels Head-out Body-Plethysmographie	33
2.2.8.1. Aufbau der Messapparatur	34
2.2.8.2. Messablauf	34
2.2.9. Messung der Lungenwiderstands (RI) mittels invasiver Plethysmographie	35
2.2.10. Analyse von Zellen und Zytokinen aus der Broncho-alveolären Lavage Flüssigkeit (BALF)	36
2.2.10.1. Analyse von Zellen aus der BALF	36
2.2.10.2. Bestimmung von Zytokinen aus der BALF	37
2.2.10.2.1. TGF- β 1 ELISA zur Bestimmung von Gesamt TGF- β 1	37
2.2.10.2.2. Bestimmung von IL-13 in der BALF	38
2.2.10.2.3. Zytokinbestimmung mittels FlowCytomix [®]	38
2.2.10.2.4. Probleme bei der Auswertung der Zytokinbestimmung	39

2.2.11. Erstellen von Paraffinschnitten aus Lungengewebe	39
2.2.11.1. Hämatoxylin und Eosin Färbung von Lungengewebe	40
2.2.12. Mikroskopische Auswertung der peribronchialen Entzündung	40
2.2.13. Statistik	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Schutz vor AHR durch Überexpression von TGF- β 1 auf T-Zellen	41
3.1.1. Bestätigung des Schutzes vor AHR in hCD2-TGF- β 1 Tieren durch invasive „body Plethysmographie“	42
3.2. Transfer des Schutzes vor AHR auf wildtyp-Mäuse durch Zelltransfer von TGF- β 1 überexprimierenden T-Zellen	43
3.2.1. Schutz vor AHR durch Transfer von TGF- β 1 überexprimierenden CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	44
3.2.2. Bei den transferierten CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen handelte es sich um regulatorische T-Zellen	46
3.3. Vermittlung des Schutzes vor AHR durch einen Effekt von TGF- β 1 auf Empfänger-T-Zellen	47
3.4. Vermittlung des Schutzes vor AHR in transgenen Tieren durch TGF- β 1 und IL-10	49
3.5. Untersuchungen zur Entzündungsreaktion	51
3.5.1. Entwicklung einer peribronchialen Entzündung sowie einer BALF-Eosinophilie in hCD2-TGF- β 1 Mäusen, unabhängig von einem Schutz vor AHR	51
3.5.2. Keine Beeinflussung der peribronchialen Entzündung durch Transfer verschiedener Treg-Populationen	54
3.5.2.1. Verringerung der BALF-Eosinophilie durch Transfer von wildtyp-Treg	55
3.5.3. Ähnlich starke Entzündung in doppeltransgenen Tieren wie in OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen	56
3.5.4. Verstärkung der peribronchialen Entzündung durch Transfer von transgenen Treg in IL-10 ^{-/-} Mäuse	58
3.5.5. Keine wesentliche beeinflussung der BALF-Eosinophilie in IL-10 ^{-/-} Tieren durch den Transfer verschiedener Treg-Populationen	59
3.6. IL-13 unabhängiger Schutz vor AHR	60

3.7. Korrelation der BALF-Eosinophilie mit erhöhten IL-5 Konzentrationen in der BALF	64
3.8. Erhöhte TGF- β -Konzentrationen in der BALF durch TGF- β 1 Überexpression auf T-Zellen	67
4. Diskussion	70
5. Zusammenfassung	81
5.1. Ausblick	81
6. Literatur	83
7. Abkürzungen	94

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale

Erste Erwähnung findet der Begriff „Asthma“ in Homers Illias und wurde bereits 450 v. Chr. von Hippokrates in medizinischem Zusammenhang verwendet. Zwar kann Asthma als chronisch, entzündliche Erkrankung der Atemwege beschrieben werden, aber die dieser Symptomatik zu Grunde liegenden pathogenetischen Mechanismen sind immer noch nicht vollständig aufgeklärt.

Als Ursachen für Asthma kommen sowohl allergische als auch nicht allergische Faktoren in Frage, wobei 85% allergischer Natur sind [Romanet-Manent, et al., 2002]. Die hauptsächlich von Aeroallergenen, wie Hausstaubmilbenkot oder Gräserpollen ausgelöste Atemnot und Atemwegsüberempfindlichkeit ist nach bisherigem Stand der Forschung auf eine chronische Entzündung der Atemwege zurückzuführen, die sich durch eosinophile Granulozyten und T-Helfer-Zellen des Typs 2 (TH2) manifestiert [Cohn, et al., 2004]. TH2 Zellen setzen Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 frei, die neben erhöhter Mukusproduktion und dem strukturellen Umbau des Atemwegsgewebes charakteristisch für Asthma sind [Lee, et al., 1997, Zhu, et al., 1999].

Laut der World Health Organisation (WHO) sind 2005 255.000 Menschen an Asthma gestorben und es wird erwartet, dass diese Zahl in den nächsten 10 Jahren um weitere 20% zunimmt (WHO Fact sheet Nr. 307). Innerhalb Europas liegt die Prävalenz durchschnittlich bei 8,6%, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen west- und osteuropäischen Staaten zu finden ist. In Deutschland leidet jedes 10. Kind an allergischem Asthma, das damit die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe ist [Maziak, et al., 2003].

Diese Daten machen deutlich, dass auch aus einem volkswirtschaftlichen Interesse heraus die Aufklärung und somit die Verbesserung der Behandlungsstrategien dieser Krankheit von großer Wichtigkeit sind.

1.1.1. Pathophysiologie des Asthmas

An der Entzündung der Atemwege beim Asthma sind eine Vielzahl von Zellen, wie Mastzellen, T-Zellen und eosinophile Granulozyten, beteiligt. In suszeptiblen Individuen verursacht die allergische Entzündung vor allem nachts und früh morgens

Episoden von Stenoseatmung, Atemnot und Husten. Diese Symptome sind typischerweise verbunden mit einer anfallsweise auftretenden spontanen, oder nach Therapie reversiblen Atemwegsobstruktion, die auf einer erhöhten Bereitschaft der kleinen und mittleren Atemwege auf unspezifische Reize mit einer Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu reagieren, beruht (WHO workshop-report, 1995). Ursachen für das Auftreten eines symptomatischen Asthma-Anfalls und der damit verbundenen Atemwegsentzündung können neben Allergenen auch Viren und Luftverschmutzung sein [Busse, et al., 1998, Wardlaw, et al., 1993].

Die asthmatische Entzündungsreaktion lässt sich in eine Früh- und Spätphasereaktion einteilen. In der Frühphase kommt es zunächst zur Aktivierung von Zellen, die auf Ihrer Oberfläche allergenspezifische Antikörper vom Typ IgE tragen. Charakteristischerweise kommt es hier zur Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen, die Histamine, Eicosanoide und reaktive Sauerstoffprodukte freisetzen, welche ihrerseits eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, erhöhte Mukusproduktion und eine Vasodilatation bewirken [Calhoun, et al., 1992, Jarjour, et al., 1992, Tonnel, et al., 1983]. Weiterhin induzieren pro-inflammatorische Mediatoren eine Plasma-Exsudation in die Atemwege, in deren Folge es zu einem Ausstrom von Akutphase Proteinen kommt, die ihrerseits mit einer Verdickung der Atemwegswand und einer Verringerung des Atemwegskalibers assoziiert werden [Van Vyve, et al., 1995]. Zusätzlich kann es noch zu einer Ansammlung von Plasma in den Atemwegen kommen. Das Zusammenwirken dieser Ereignisse bewirkt schließlich die Atemwegsobstruktion.

Etwa acht Stunden nach der Allergenprovokation kommt es zur so genannten Spätphasereaktion. Sie geht einher mit der Infiltration und Aktivierung von Antigen-spezifischen $CD4^+$ (cluster of differentiation 4) T-Zellen, Makrophagen sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten [Bousquet, et al., 2000]. Als initialer Auslöser für die Infiltration gilt dabei die Freisetzung von Zytokinen aus Mastzellen. So konnte beispielsweise an Gewebeproben von Asthmapatienten bereits 24 Stunden nach Allergenkontakt eine Produktion von IL-2, IL-5 und GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) durch T-Zellen nachgewiesen werden [Bentley, et al., 1993]. Dies spricht für eine anhaltende Beteiligung von TH2 Zellen an der Pathogenese.

1.1.2. Immunpathogenese des Asthmas

CD4⁺ Zellen können zu distinkten Effektorzellpopulationen differenzieren, die sich durch ihr Zytokinprofil unterscheiden; die bestcharakterisierten Effektorzelltypen sind die TH1 und TH2 Zellen: TH1 Zellen sind für die zellvermittelte Immunität verantwortlich und zeichnen sich durch die Produktion der Zytokine IL-2, TNF-β und Interferon-Gamma (IFN-γ) aus. TH2 Zellen dagegen bilden IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13; sie stimulieren IgE Produktion, mukosale Mastozytose und Eosinophilie [Street, et al., 1991]. Bei gesunden Menschen ist das TH1/ TH2 Verhältnis ausgeglichen. Beim allergischen Asthma hingegen kommt es zu einer Verschiebung dieser Balance zu Gunsten der TH2-Zellen. Dies konnte anhand von T-Zellen, die aus Biopsien und Bronchiallavage Flüssigkeit (BALF) von Asthmapatienten isoliert wurden, gezeigt werden, die hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF exprimierten [Del Prete, et al., 1993]. Wie es zu dieser TH2-Polarisierung kommt, ist nicht voll verstanden. Sowohl TH1 als auch TH2 Zellen können sich aus naiven CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Durch Stimulation mit Allergenen über den MHC II Komplex von dendritischen Zellen (DC), kann eine Differenzierung zu TH0-Zellen erfolgen, die in der Lage sind TH1 und TH2 Zytokine zu produzieren. Bei hohen Allergendosen, sowie bei Anwesenheit von IL-12 erfolgt eine Differenzierung zu TH1-Zellen, wohingegen sich TH2-Zellen unter dem Einfluss von IL-4 und niedrigen Allergendosen entwickeln [Hsieh, et al., 1993, Seder, et al., 1992].

Wie schon erwähnt stimulieren TH2-Zellen die IgE Produktion. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad von Asthma mit der Anwesenheit allergenspezifischer IgE-Moleküle korreliert. Zumindest in der Maus wird die IgE Bildung in B-Zellen durch IL-4 und IL13, sowie durch eine CD40 abhängige Interaktion zwischen B- und T-Zellen induziert [Bacharier, et al., 1998, Wills-Karp, et al., 1999]. Das so gebildete IgE bindet an den IgE-Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und bewirkt, bei Kreuzvernetzung durch vorhandenes Allergen, eine Degranulation von Mastzellen, wodurch pro-inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden, welche die allergische Frühphasereaktion auslösen. Eine ebenfalls wichtige Rolle bei der Immunpathogenese des allergischen Asthmas wird den eosinophilen Granulozyten zugesprochen. Obwohl dabei auch IL-4 eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, vornehmlich durch die Hochregulation der VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) Expression, was eine Migration der Eosinophilen in Gewebe ermöglicht [Schleimer, et al., 1992], kommt IL-5

wahrscheinlich eine bedeutendere Rolle zu. Im Knochenmark ist es wichtig für die Stimulation der Eosinophilopoese sowie für die finale Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Eosinophilen. Des Weiteren fördert es die Adhäsion von Eosinophilen an Endothelzellen und die anschließende Migration vom Blut ins Gewebe, sowie das Überleben von Eosinophilen im Gewebe und deren zytotoxische Aktivität [Wills-Karp, et al., 1999]. Reife eosinophile Granulozyten haben einen hohen Gehalt an Granula im Zytoplasma, welche Entzündungsmediatoren wie das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN), Peroxidasen und kationische Proteine enthalten. Hier kommt dem MBP eine besondere Bedeutung bei der Pathogenese des Asthmas zu, da es in der Lage ist, direkt das Atemwegsepithel zu schädigen und die Atemwegsempfindlichkeit zu steigern. Außerdem kann es die Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten auslösen. Des Weiteren bilden Eosinophile auch Leukotriene, die eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, sowie eine verstärkte Gefäßpermeabilität bewirken und chemotaktisch auf Eosinophile wirken [Busse, et al., 1998].

Die Aktivierung der eosinophilen Granulozyten erfolgt hauptsächlich über den CCR-3 Rezeptor durch die Chemokine RANTES, Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP-1), Macrophage Chemoattractant Protein-2-4 (MCP-2-4) sowie die Eotaxine 1-3, die von Atemwegsepithelzellen, Makrophagen, Lymphozyten oder den Eosinophilen selbst gebildet werden können [Luster, 1998, Sung, 2000].

1.2. Asthma im Tiermodell

Um allergisches Asthma *in vivo* zu untersuchen, bieten Tiermodelle eine gute Grundlage. Ein besonders guter Modellorgansimus ist die Hausmaus (*mus musculus*), da sie nicht nur einfach in der Haltung ist, sondern auch die genetische Manipulation an der Maus sehr gut etabliert ist, und sich somit gezielt die Auswirkungen einzelner Gene auf Asthmaentwicklung und -entstehung untersuchen lassen.

Das gängige Mausmodell für Asthma beruht auf einer systemischen Immunisierung gegen ein artfremdes Protein, was zu einer allergenspezifischen TH2 Immunantwort führt und der anschließenden Inhalation des Allergens, was die Atemwegs-Hyperreagibilität (AHR) auslöst. Häufige Verwendung bei der systemischen Immunisierung findet Ovalbumin (OVA), das zusammen mit dem Adjuvans

Aluminiumhydroxyd ($\text{Al}(\text{OH})_3$) intraperitoneal (i. p.) appliziert wird [Jungsuwadee, et al., 2004]. Aber auch kleine Dosen eines gelösten artfremden Proteins, ohne ($\text{Al}(\text{OH})_3$) [Wills-Karp, et al., 1998] wiederholte intranasale oder intratracheale Instillation bestimmter Proteine [Shinagawa, et al., 2003] oder der i. p. Transfer von Antigen-gepulsten Makrophagen und/ oder dendritischen Zellen [Janssen, et al., 2002, Lambrecht, et al., 2000] werden verwendet, um Asthma auszulösen.

Bei Mäusen, die systemisch nicht sensibilisiert worden sind, kann durch reine Inhalation eines artfremden Proteins kein Asthma induziert werden [Sedgwick, et al., 1985]. Damit scheint eine gewisse Anzahl von antigenspezifischen TH2-Zellen in der Lunge vonnöten zu sein, damit Asthma ausgelöst werden kann. Dafür spricht, dass Hogan et al. zeigen konnten, dass Asthma durch Antigeninhalation ausgelöst werden kann, wenn zuvor antigenspezifische TH2-Zellen adoptiv transferiert worden sind [Hogan, et al., 1998]. Nach systemischer Sensibilisierung kann in Mäusen jedoch eine Atemwegsentzündung mit den Charakteristika des humanen Asthmas nach wiederholter Allergenexposition ausgelöst werden.

Neben *Schistosoma*-Eiern, bovinem Serum-Albumin und *Aspergillus fumigatus* wird zur Sensibilisierung am häufigsten OVA verwendet. Im Tiermodell spielt die Wahl des Adjuvans eine entscheidende Rolle, da es Schweregrad des Asthmas und TH2 Polarisation beeinflussen kann. So hat man herausgefunden, dass eine i. p. Injektion von ($\text{Al}(\text{OH})_3$) alleine die Produktion verschiedener TH2-Zytokine auslöst. Durch Hinzufügen eines artfremden Peptids kommt es im Empfängerorganismus zu einer massiven antigenspezifischen TH2-Immunantwort [Alkan, et al., 1996]. Zusätzlich kommt es auch in der Maus zu einer gesteigerten IgE Produktion; allerdings kann auch in IgE-defizienten Mäusen eine Asthmareaktion ausgelöst werden, die sich im Schweregrad nicht von einer Induktion im Wildtyp unterscheidet [Herz, et al., 1996]. Damit ist, anders als beim Menschen, eine gesteigerte IgE Produktion für die Pathogenese des Asthmas in der Maus nicht notwendig.

Innerhalb von 24 - 48 Stunden nach Allergenkontakt lassen sich in der BALF der Mäuse eosinophile Granulozyten nachweisen, die dann 70 - 80% der Gesamtzellen in der Lavage darstellen. So lassen sich nach Antigen-Immunisierung und -Provokation etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen in der BALF feststellen, wohingegen eine nicht immunisierte wildtyp-Maus nur ca. 2×10^4 Zellen zählt, die hauptsächlich aus Makrophagen und wenigen Lymphozyten bestehen.

1.2.1. Lungenfunktionsmessung an Mäusen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Lungenfunktion bei Mäusen zu messen, von denen jede Methode Vor- und Nachteile hat, weswegen es wichtig ist das beste System für die zu untersuchende Fragestellung zu ermitteln.

Prinzipiell kann zwischen invasiven und nicht-invasiven Methoden unterschieden werden. Für Untersuchungen am spontan atmenden, nicht anästhesierten Tier eignen sich am ehesten nicht-invasive Methoden. Hier haben sich im Laufe der letzten Jahre zwei Verfahren etabliert: die „whole body-plethysmography“ und die „head-out body-plethysmography“ [Glaab, et al., 2001, Hamelmann, et al., 1997a].

Bei der „whole body-plethysmography“ befindet sich das zu untersuchende Tier in einer Expositions-kammer, in der es sich frei bewegen kann. Um die Bronchoobstruktion zu messen, werden Druckveränderungen in der Kammer während des Einleitens verschiedener Konzentrationen eines Bronchokonstriktors gemessen. Dabei wird zunächst der Druck in der Kammer (P_b) gemessen, welcher bei einer Bronchoobstruktion abfällt. Aus dem Verhältnis dieses Abfalls und den P_b Maxima bei Expiration und Inspiration lässt sich der dimensionslose Parameter enhanced pause (P_{enh}) ermitteln. Mit zunehmender Bronchoobstruktion steigt P_{enh} an. In Versuchen konnten Hamelman et al. zwar zeigen, dass P_{enh} unabhängig von Atemmuster und -frequenz ist [Hamelmann, et al., 1997a], allerdings können expirationsbedingte Temperatur- und Feuchtigkeitsveränderungen Einfluss auf P_{enh} nehmen.

Diese Probleme können bei der „head-out body-plethysmography“ ausgeschlossen werden. Bei dieser Methode werden charakteristische Änderungen im Atemfluss mit der Bronchoobstruktion korreliert. Als Hauptparameter gilt die Verminderung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF_{50}). Anhand invasiver Messungen konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung des EF_{50} mit einem Anstieg des Atemwiderstandes korreliert, wobei nicht zwischen Veränderungen der Atemfunktion in peripheren und zentralen Atemwegen unterschieden werden kann [Vijayaraghavan, et al., 1993].

Will man die Lungenmechanik sowie Veränderungen zwischen peripheren und zentralen Atemwegen genauer untersuchen, muss die invasive Methode verwendet werden, da nur sie die Messung der Atemfluss- und Druckparameter am anästhesierten, intubierten und ventilerten Tier ermöglicht. So kann die

Lungenmechanik charakterisiert, sowie Lungendehnbarkeit (Compliance) und Strömungswiderstand (Resistance) erfasst werden [Gomes, et al., 2000].

1.3. Regulatorische T-Zellen

Um zu verhindern, dass Selbst-Antigene oder für den Organismus harmlose Antigene eine schädliche Immunantwort auslösen, haben sich Mechanismen entwickelt, die dies verhindern. Zum Einen werden Durch klonale Selektion autoreaktive Zellen eliminiert. Zum anderen scheinen, wie seit den 1980-er Jahren bekannt ist, so genannte regulatorische T-Zellen schädliche Immunantworten zu supprimieren.

1.3.1. Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen

Sakaguchi et. al. haben herausgefunden, dass eine CD25-depletierte, CD4⁺ Zellsuspension aus BALB/c Mäusen nach Transfer in immundefiziente Nackt-Mäuse, in einer multifokalen Autoimmunität resultiert. Dieser Effekt konnte durch einen zeitnahen Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen nach dem CD4⁺CD25⁻ Transfer aufgehoben werden [Sakaguchi, et al., 1995]. Durch diesen Versuch wurde die regulatorische T-Zelle (Treg) mit dem Vorhandensein der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 charakterisiert. Tatsächlich sind 5-10% der peripheren CD4⁺ Zellen in Mäusen und Menschen positiv für CD25. Das so genannte X-linked immunodeficiency syndrome (IPEX), eine Autoimmunkrankheit, die die meisten endokrinen Organe betrifft, wurde mit dem Fehlen von regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht. Durch Versuche an Scurfy-Mäusen, die ein ähnliches Krankheitsbild aufweisen, konnte herausgefunden werden, dass eine Mutation im Gen *foxp3* vorliegt, welche ursächlich für die Autoimmunität sowohl in der Maus als auch in Patienten mit IPEX ist [Brunkow, et al., 2001, Powell, et al., 1982].

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass *Foxp3* von essenzieller Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von natürlichen Treg ist. So kann eine Induktion der *foxp3* Expression in CD4⁺CD25⁻ Zellen zu einer Konversion dieser Zellen zu einem Treg Phänotyp führen [Fontenot, et al., 2003, Hori, et al., 2003]. Mit diesen Erkenntnissen war auch der bislang beste Marker für regulatorische T-Zellen gefunden. CD4 und CD25 alleine sind als Treg-Marker nicht ausreichend, da auch aktivierte T-Zellen diese Oberflächenmoleküle exprimieren.

Da Mäuse, die drei Tage nach Geburt thymektomiert wurden, eine multifokale Autoimmunität aufgrund eines Fehlens von Treg entwickeln [Asano, et al., 1996], lag die Vermutung nahe, dass Treg im Thymus generiert werden. Zum genauen Ablauf der Generation gibt es jedoch verschiedene Hypothesen:

Die Erste ist die so genannte „altered negative selection“. Sie beruht auf der Idee, dass CD25⁺ T-Zellen, die eine mittlere Affinität zu Selbstantigenen haben und der Depletion entgangen sind, in einen supprimierenden Zustand versetzt werden. Jordan et al. machten hierzu Versuche mit T-Zellrezeptor transgenen Mäusen und konnten zeigen, dass dendritische Zellen im Thymus als antigenpräsentierende Zellen maßgeblich an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen [Jordan, et al., 2001] (Abb. 1b).

Bensinger et al. hingegen fanden Hinweise für eine positive Selektion von Treg am Kortex des Thymus, bei der funktionale Treg erkannt und nicht funktionale in Apoptose gebracht werden [Bensinger, et al., 2001] (Abb. 1a).

Der genaue Ablauf der Treg-Generation bleibt jedoch, weiterhin unklar.

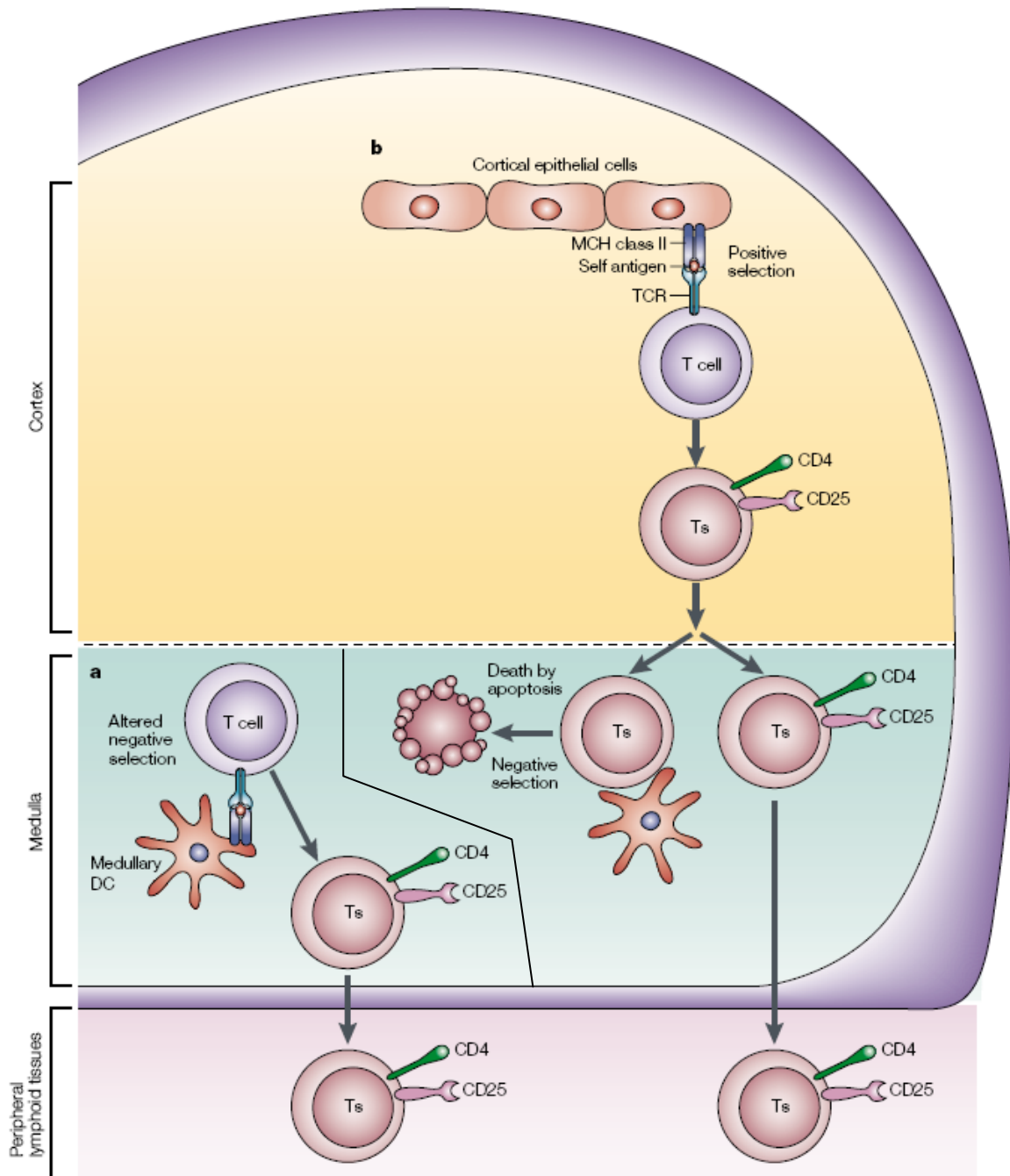


Abb. 1: Entwicklung von Treg im Thymus

Zur Entstehung von Treg im Thymus gibt es zwei Hypothesen. In (a) ist die „altered negative selection“ dargestellt: CD25⁺ Zellen bekommen Kontakt zu medullären dendritischen Zellen, die ein Selbstantigen präsentieren. Gibt es eine mittlere Affinität zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Komplex erhält die Treg ihre suppressiven Eigenschaften und wird in die Peripherie entlassen. In (b) ist die positive Selektion gezeigt. Bereits im Kortex erkennen Treg über ihren T-Zellrezeptor den MHC-Komplex an kortikalen Epithelzellen. Je nach Affinität zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Komplex wird die Treg in die Peripherie entlassen oder mittels Apoptose in der Medulla negativ selektiert

Nach Shevach [Shevach, et al., 2002]

1.3.2. Induzierte regulatorische T-Zellen

Neben den natürlich vorkommenden Treg, die im Thymus generiert werden, können regulatorische T-Zellen auch in der Peripherie gebildet werden. Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass es zu einer Konversion in der Peripherie von $CD4^+CD25^-$ zu $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ Zellen kommt, wenn niedrige Dosen von Antigen vorhanden sind [Apostolou, et al., 2004].

Bei der Konversion zu Treg in der Peripherie scheint die Anwesenheit bestimmter Zytokine eine wichtige Rolle zu spielen. Vor allem TGF- β und/ oder IL-10 sind hier häufig diskutiert. So haben Chen et al. herausgefunden, dass TGF- β durch Induktion der foxp3 Expression in der Lage ist, $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu Treg zu konvertieren [Chen, et al., 2003]. Weiterhin konnten Schramm et al. zeigen, dass eine gestörte TGF- β Signaltransduktion in T-Zellen zu einer Verringerung der $CD4^+CD25^+$ Zellpopulation in der Peripherie, nicht aber im Thymus führt, was mit einer Verringerung der foxp3 Expression in diesen Zellen einher geht. Überexpression von TGF- β in T-Zellen hingegen resultierte in einem vermehrten Vorkommen von $CD4^+CD25^+$ Zellen sowohl im Thymus als auch in der Peripherie, was hier mit einer erhöhten foxp3 Expression korreliert ist [Schramm, et al., 2004]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass TGF- β eine wichtige Rolle bei Konversion und Homeostase von Treg zu spielen scheint

Das Vorkommen von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, die IL-10 produzieren und sehr ähnliche suppressierende Fähigkeiten besitzen wie natürlich vorkommende Treg, wird ebenfalls berichtet [O'Garra, et al., 2004]. Eine Population dieser Zellen exprimiert jedoch im Unterschied zu den natürlichen Treg, kein Foxp3 und scheint sich daher anders zu entwickeln.

Dies zeigt, dass es verschiedene Arten von Zellen mit suppressiven Eigenschaften gibt. Die am besten charakterisierten sind die schon beschriebenen natürlich vorkommenden Treg. Daneben gibt es noch die sogenannten Tr1 Zellen, welche antigenspezifisch sind und hohe Mengen an IL-10 und/ oder TGF- β produzieren. Ihre Generation konnte in Menschen *in vivo* während der Frühphase einer allergenspezifischen Immuntherapie beobachtet werden, was dafür spricht, dass sie durch hohe und ansteigende Dosen von Antigen induziert werden können [Jutel, et al., 2003]. Da Tr1 Zellen die Fähigkeit besitzen, allergenspezifische TH1 und TH2 Antworten herunterzuregulieren, gelten sie als vielversprechendes Instrument für neue Therapieansätze bei Autoimmunkrankheiten [Taylor, et al., 2006].

Ein weiterer Zell-Typ mit suppressiven Eigenschaften sind die so genannten TH3 Zellen, die sich vor allem durch eine hohe Expression von TGF- β und eher geringeren Mengen von IL-10 und IL-4 auszeichnen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass transgene T-Zellen, die TGF- β unter dem IL-2 Promotor überexprimieren, nach Antigenstimulation die foxp3 Expression sowohl in CD25⁺ als auch in CD25⁻ T-Zellen hochregulieren und unabhängig von der CD25 Expression *in vivo* suppressiv sind [Carrier, et al., 2007a, Carrier, et al., 2007b]. Sie werden hauptsächlich nach oralem Kontakt mit Antigenen gebildet, womit antigenspezifische TH3 Zellen, die TGF- β überexprimieren, eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der mukosalen Toleranz zu spielen scheinen [Weiner, et al., 2001].

1.3.3. Suppressionsmechanismen

Zu den Suppressionsmechanismen von Treg ist bisher noch nicht viel bekannt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Suppression von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch natürliche Treg nur nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors der Treg, beispielsweise mit einem Antikörper gegen CD3 stattfindet. Dabei scheint der Hauptmechanismus der Suppression darin zu liegen, dass Zellkontaktabhängig die IL-2 Expression in den Responderzellen blockiert wird [Shevach, et al., 2002].

In vitro konnte bisher kein Hinweis dafür gefunden werden, dass Zytokine bei der Suppression eine Rolle spielen. So konnte beispielsweise gezeigt werden dass IL-10 *knock out* Treg *in vitro* genauso gut supprimieren, wie wildtyp-Zellen [Thornton, et al., 1998]. *In vivo* hingegen gibt es Hinweise, dass z. B. IL-10 oder auch TGF- β für die Suppression wichtig sind. Dabei ist nicht für jedes Modell geklärt, ob die Zytokine von den Treg selber exprimiert werden, oder von den Responderzellen [Huber, et al., 2004, Suri-Payer, et al., 2001]. Damit scheint das Zytokinmilieu am Ort der Wirkung von Treg einen Einfluss auf deren Suppressorwirkung zu nehmen.

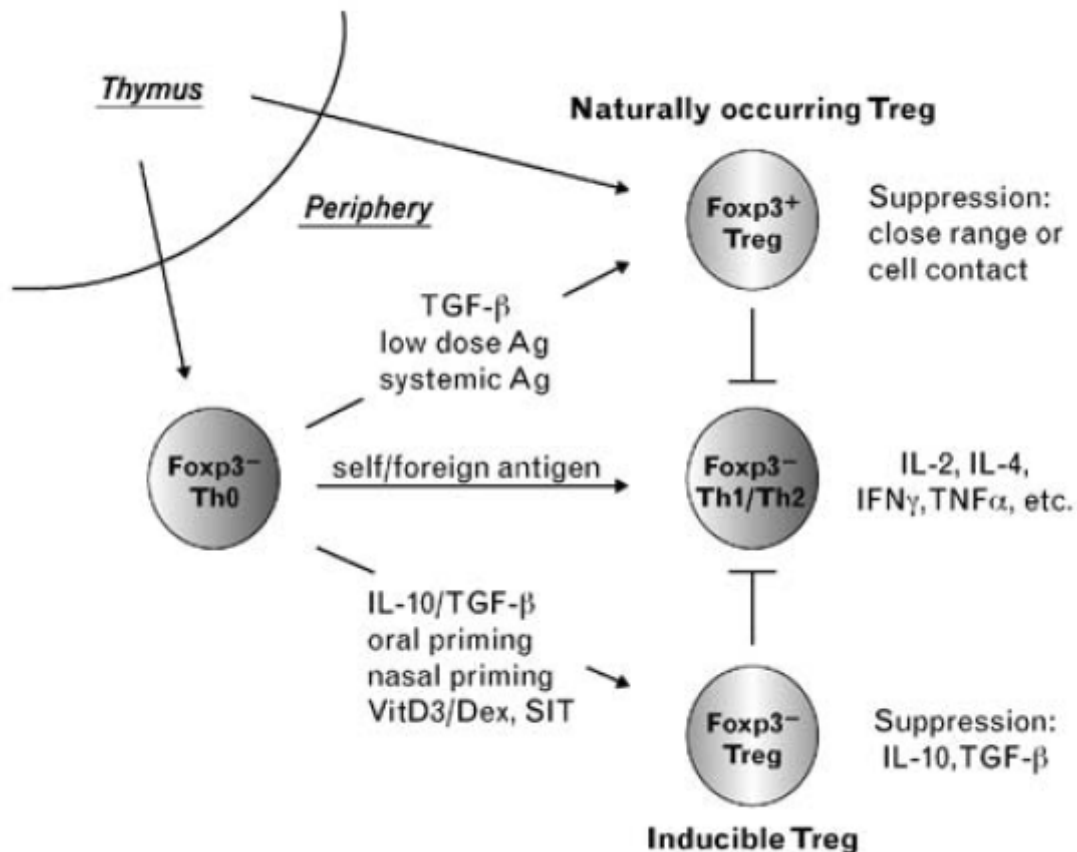


Abb. 2: Natürliche Treg vs. induzierte Treg

T-Zellen kommen entweder als natürliche regulatorische T-Zellen oder als naive T-Zellen (TH0) aus dem Thymus. Nach Antigenkontakt entwickeln sich die TH0 Zellen zu TH1 oder TH2 Zellen. Unter bestimmten Bedingungen kann sich die TH0 Zelle aber auch zu einer induzierten Foxp3 negativen Treg, wie Tr1 oder TH3 entwickeln, oder zu einer CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg, die sich von den natürlichen Treg nicht unterscheiden lässt. Die Suppression bei den natürlichen Treg scheint nur Zellkontakt abhängig zu sein, während sie bei den induzierten Treg von den Zytokinen IL-10 und/ oder TGF-β abhängig zu sein scheint.

Aus: [Wing, et al., 2006]

1.3.4. Regulatorische T-Zellen und Allergie

Bedenkt man, dass CD4⁺CD25⁺ depletierte Mäuse eine multifokale Autoimmunität entwickeln, wird schnell deutlich, dass Treg eine wichtige Rolle bei Autoimmunkrankheiten und Allergien spielen.

Allergische Reaktionen beruhen auf, TH2 und IgE Antworten auf ansonsten harmlose Antigene aus der Umwelt. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von wildtyp CD4⁺ Zellen in Antigen-spezifische T- und B-Zellrezeptormäuse die IgE-Produktion verringert. Dabei supprimierten die transferierten Zellen nicht die Expansion von

Lymphozyten im Empfängertier, sondern vielmehr deren IL-4-Expression und Entwicklung zu TH2-Zellen [de Lafaille, et al., 2001]. Auch der Wechsel zur IgE Produktion in B-Zellen wurde von den transferierten Zellen supprimiert. In Gesunden Individuen scheinen Treg durch Antigenkontakt an Darmmucosa oder Atemwegen induziert werden. Tatsächlich haben Akbari et al. festgestellt, dass IL-10 exprimierende dendritische Zellen in peribronchialen Lymphknoten regulatorische CD4⁺ Zellen induzieren können [Akbari, et al., 2001].

Welche Suppressorzell-Population für welche regulatorischen Mechanismen genau verantwortlich ist, ist zur Zeit noch ungeklärt. Die Induktion oraler und/ oder mucosaler Toleranz scheint von Tr1 und/ oder TH3-Zellen abhängig zu sein [Akdis, et al., 2005b, Jutel, et al., 2003].

Vergleicht man das T-Zellrepertoire von gesunden und allergischen Individuen, so fällt auf, dass die T-Zellen beider Gruppen die gleichen Antigene erkennen [Ebner, et al., 1995]. Allergiker wie Gesunde besitzen natürliche Treg, Tr1 und TH3-Zellen, allerdings liegen sie zu unterschiedlichen Anteilen vor. So können in gesunden Individuen 0,1% der peripheren, allergenspezifischen CD4⁺ Zellen dem Tr1 Typ zugewiesen werden. Damit bilden sie den zahlenmäßig am stärksten vertretenen Suppressorzelltyp gegen Allergene. In Allergikern hingegen sind weit mehr TH2-Zellen vorhanden und die Zahl der Tr1 Zellen ist deutlich verringert [Akdis, et al., 2005a]. Damit scheint die Ratio zwischen Tr1 und TH2-Zellen ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung einer Allergie zu sein.

1.3.4.1. Regulatorische T-Zellen und Asthma

Wie oben erwähnt, ist Asthma eine allergische Krankheit, die durch AHR und eine TH2 vermittelte Entzündung charakterisiert ist. Viele Experimente untersuchten die Wirkung von T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften bei der Asthmaentstehung. Dabei wird deutlich, dass die verschiedenen Suppressorzelltypen unterschiedliche Effekte auf AHR und Entzündung ausüben.

So konnte in einem Modell für chronische Atemwegsentzündung gezeigt werden, dass natürliche Treg die Lunge infiltrieren und Entzündung herunter regulieren; jedoch konnte kein Effekt auf die AHR beobachtet werden [Hadeiba, et al., 2003]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Transfer von CD25 depletierten ovalbuminspezifischen CD4⁺ Zellen in Empfängertieren eine verstärkte

inflammatorische Reaktion auslöst [Jaffar, et al., 2004]. Diese Versuche lassen den Schluss zu, dass natürliche Treg einen Einfluss auf die Atemwegsentzündung beim allergischen Asthma nehmen.

Versuche mit Tr1-ähnlichen Zellen hingegen zeigten eine andere Beeinflussung des experimentellen Asthmas. Oh et al. zeigten, dass der Transfer von IL-10 überexprimierenden OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen in sensibilisierte Empfängertiere in einem Rückgang der Eosinophilie und der AHR resultierte [Oh, et al., 2002].

In einem anderen Versuch zeigten Hansen et al., dass die Überexpression von latentem TGF- β in OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen ebenfalls zu einem Rückgang von Eosinophilie und AHR führte [Hansen, et al., 2000]. Weiterhin konnte von Schramm et al. gezeigt werden, dass Mäuse deren T-Zellen eine gestörte TGF- β Signalkaskade haben, suszeptibler für eine Asthmainduktion sind, als wildtyp-Mäuse [Schramm, et al., 2003].

Nicht zuletzt konnte gezeigt werden, dass eine intranasale Tollerisierung gegen Antigen von IL-10 produzierenden reifen dendritischen Zellen abhängt, die ihrerseits IL-10 exprimierende CD4⁺ Zellen induzieren [Akbari, et al., 2001, Akbari, et al., 2002]. Zusammengenommen demonstrieren diese Daten, dass es unterschiedliche Suppressorzelltypen sind, die Einfluss auf die verschiedenen Aspekte des Asthmas nehmen; wobei die wichtigste Rolle wohl den Tr1- Zellen zu kommt, da sie Einfluss sowohl auf die AHR als auch auf die Entzündung nehmen können.

1.4. Transforming Growth Factor β

Ursprünglich als Wachstumsfaktor identifiziert, hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass Transforming Growth Factor β (TGF- β) eine wichtige Rolle in der Immunregulation spielt. Bislang sind fünf Isoformen bekannt, von denen drei (TGF- β 1, 2 und 3) in Säugetieren vorkommen. Die TGF- β -Familie gehört zu den Zytokinen mit den wahrscheinlich vielfältigsten Aufgaben: Die einzelnen Isoformen üben Wirkung auf eine große Anzahl verschiedener Zelltypen aus und kontrollieren Zellwachstum, Zelldifferenzierung, beeinflussen Zellfunktionen und regulieren Genaktivität [Letterio, et al., 1998]. Besonders hervorgehoben werden soll im Folgenden der Einfluss von TGF- β 1 auf die Immunregulation.

1.4.1. TGF- β Signalkaskade

Zwar werden alle drei in Säugetieren vorkommenden TGF- β Moleküle von unterschiedlichen Genen kodiert, jedoch erfolgt die Signalweiterleitung über die gleiche Signalkaskade. Das reife TGF- β Homodimer (25kD) ist zunächst biologisch inaktiv, da es nichtkovalent an ein 75-kD, glykosiliertes latency-associated protein (LAP) gebunden ist, welches seinerseits kovalent an ein 135-kD binding protein gebunden ist [Wahl, et al., 1992]. Diese anfängliche Inaktivierung ist aufgrund der pleiotropen Wirkung von TGF- β notwendig. Der genaue Aktivierungsprozess muss noch aufgeklärt werden, jedoch wurde gefunden, dass das latente TGF- β an bovinen glatten Muskelzellen an Mannose 6-Phosphat/ insulin-like growth factor II Rezeptoren bindet und dort für die Aktivierung durch Proteasen wie Cathepsin und Plasmin suszeptibel wird. Proteasen sowie ein saures Milieu sorgen für die proteolytische Abspaltung des LAP [Dennis, et al., 1991, Kim, et al., 1990].

Das aktive Protein kann dann an einen transmembranen heteromeren Komplex aus zwei Serin/ Threonin Kinasen, die als Rezeptor Typl und Rezeptor TyplI (T β RI und T β RII) bezeichnet werden, binden. Nach Bindung von TGF- β an den Rezeptorkomplex, phosphoryliert der T β RII die Glycin-Serin-Domäne des T β RI. Dadurch wird der T β RI aktiviert, autophosphoryliert sich und aktiviert Smad2 und Smad3 ebenfalls durch Phosphorylierung, welche dann ein Heterodimer mit Smad4 bilden und in den Nucleus translozieren [Derynck, et al., 2003]. Dort reguliert der Komplex Effektorgene, bis er wieder dephosphoryliert wird und ins Zytoplasma zurück kehrt. Smad6 und Smad7 sind Proteine, die an den T β RI binden und dort die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 kompetitiv hemmen können. TGF- β induziert die Expression von Smad7, wodurch ein negativer feedback loop entsteht, der die Intensität und/ oder Dauer der TGF- β Transkription reguliert [Itoh, et al., 2000] (Abb.3).

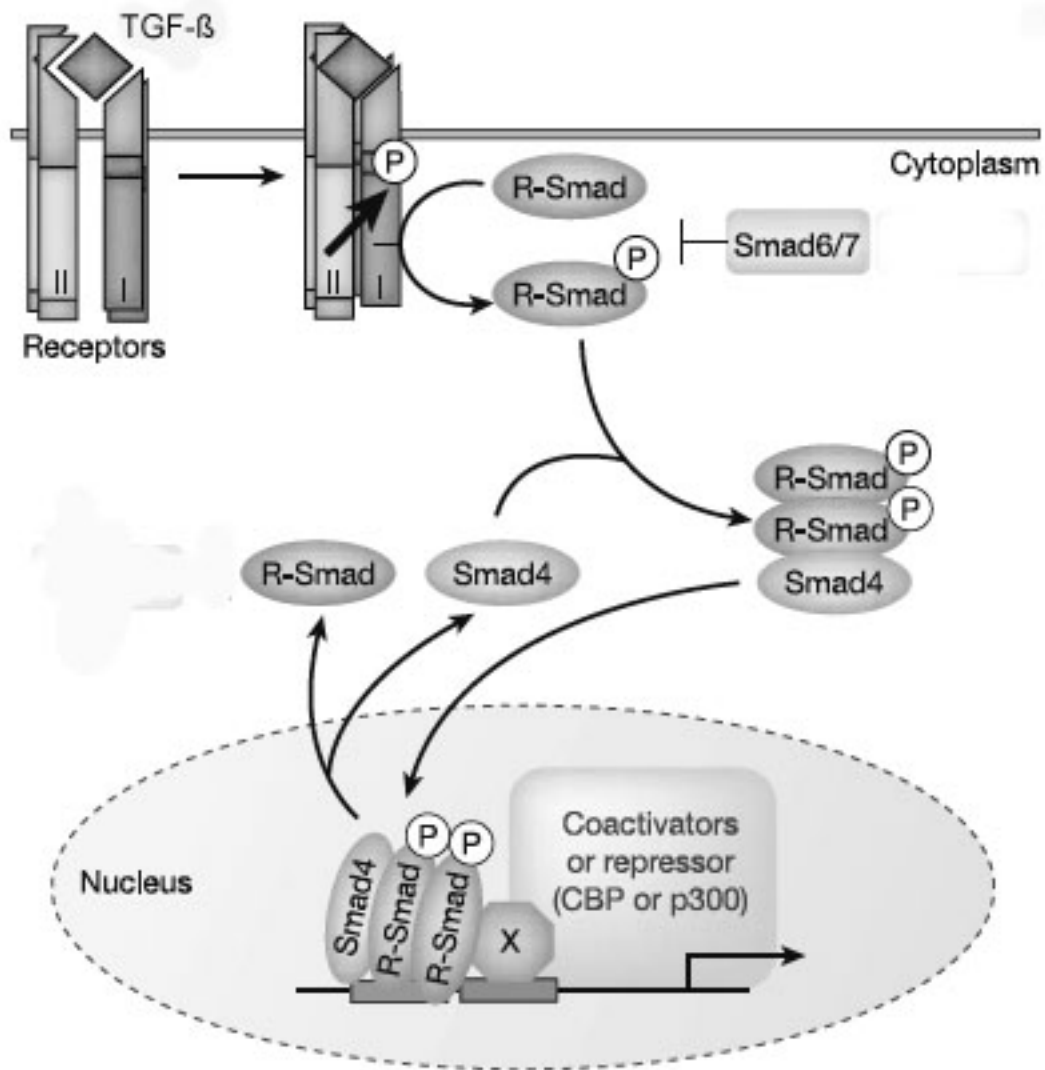


Abb.3: TGF-β Signalkaskade

Die Bindung von TGF-β an den TGF-βI/II Rezeptor-Komplex führt zur Phosphorylierung des TβRI, der seinerseits sg. R-Smad Proteine (Smad2 und Smad3) phosphoryliert. Smad2 und Smad3 bilden ein Heterodimer mit Smad4. Dieser Komplex aktiviert im Nucleus Effektorgene. Smad6 und Smad7 können durch Bindung an den TβRI die Phosphorylierung der R-Smads kompetitiv hemmen und so den TGF-β Signalweg unterbrechen.

Nach Derynck et al. [Derynck, et al., 2003]

1.4.2. TGF- β und Entzündung

Zu Anfang der 1990-er Jahre wurde eine TGF- β 1 *knock out* (TGF- β 1-/-) Mauslinie generiert, bei der die Tiere im Alter von 3 - 4 Wochen aufgrund von multifokalen Entzündungen sterben [Kulkarni, et al., 1993]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp auf aktivierte CD4⁺ Zellen zurückzuführen ist, welche die Entzündung durch das Freisetzen von entzündungsmediierenden Zytokinen hervorriefen [Shull, et al., 1992].

Außerdem wurde festgestellt, dass TGF- β chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und T-Zellen wirkt [Adams, et al., 1991, Fava, et al., 1991]. Sind die Leukozyten am Ort der Entzündung angelangt, unterliegt ihre Aktivierung und Regulierung sowohl anderen Zytokinen als auch wiederum TGF- β . So ist TGF- β z. B. in der Lage, die Expression von CD16 auf Monozyten zu induzieren, was zusammen mit anderen Adhäsionsmolekülen Phagozytose und das Freisetzen von Sauerstoffradikalen fördert [Welch, et al., 1990].

Zusammenfassend kann TGF- β damit eine proinflammatorische Wirkung für die Frühphase einer Entzündung zugesprochen werden.

Auf der anderen Seite konnte auch gezeigt werden, dass systemische Administration von TGF- β Entzündungsprozesse bei experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE), Transplantatabstoßung und experimenteller Arthritis herunterreguliert [Kuruville, et al., 1991, Wallick, et al., 1990]. Damit scheint ein Unterschied in der Wirkung auf Entzündung zwischen systemischer und lokaler Verteilung von TGF- β zu bestehen.

Vermutlich hängt die Wirkung von TGF- β von dem Differenzierungszustand der Zielzelle ab. Als früh freigesetzter Faktor bei Entzündungen wirkt es durch seinen Einfluss auf unreife Monozyten und T-Zellen entzündungsfördernd. Sind diese Zellen aktiviert und differenziert, werden sie suszeptibel für die inhibitorischen Eigenschaften des TGF- β [Wahl, et al., 1992].

1.4.3. TGF- β und die Generierung von Treg

Viele Versuche demonstrieren eine inhibitorische Funktion von TGF- β bezogen auf T-Zellproliferation und Effektorfunktion [Gorelik, et al., 2002, Gorelik, et al., 2000, Shull, et al., 1992]. In letzter Zeit hingegen konnte auch gezeigt werden, dass TGF- β die Generation von regulatorischen T-Zellen fördert:

So stellten Chen et al. fest, dass TGF- β durch die Induktion von Foxp3 an der Konversion von CD4⁺CD25⁻ zu CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen beteiligt ist [Chen, et al., 2003]. Horwitz et al. konnten zeigen, dass die Konversion nicht von TGF- β alleine abhängig ist, sondern dass IL-2 ebenfalls notwendig ist [Horwitz, et al., 2003]. Sie konnten sogar nachweisen, dass IL-2 und TGF- β die Suppressorkapazität von natürlichen Treg erhöhen. Dabei ist IL-2 vermutlich eher für die Homöostase zuständig, während TGF- β die regulatorischen Eigenschaften der Treg beeinflusst [Wan, et al., 2006].

Schramm et al. fanden heraus, dass ein intakter TGF- β Signalweg für die *in vivo* Expansion und Suppressorkapazität von CD4⁺CD25⁺ Zellen benötigt wird [Schramm, et al., 2004]. Auch in TGF- β -/- Mäusen konnte gefunden werden, dass die Anzahl der peripheren Treg, nicht jedoch der Treg im Thymus reduziert ist [Marie, et al., 2005]. Dies stützt die Hypothese, dass TGF- β essenziell für die Erhaltung der peripheren Treg Population ist.

1.4.4. Die Rolle von TGF- β bei Asthma

Will man die Rolle, die TGF- β in der Pathogenese des Asthmas spielt, verstehen, ist es auch hier wichtig, zwischen systemisch und lokal vorhandenem TGF- β zu unterscheiden. TGF- β wird von vielen Zellen in der Lunge produziert; unter anderem von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und epithelialen Zellen. TGF- β ist in der Lage, die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu stimulieren, was in einer erhöhten Matrixproduktion resultiert und damit zum „airway remodelling“, also dem strukturellen Umbau des Gewebes in der Lunge beiträgt. Tatsächlich konnten erhöhte TGF- β Konzentrationen in der BALF von Asthmatikern gefunden werden, die in einigen Studien mit der Höhe der subepithelialen Fibrose korreliert werden konnten [Homer, et al., 2005].

Fu et al. konnten zeigen, dass die tracheale Applikation eines TGF- β Expressions-Plasmids und die daraus resultierenden hohen TGF- β Konzentrationen in der Lunge zu einer Herunterregulierung der AHR und der Entzündung führte [Fu, et al., 2006b]. Hansen et. al. konnten einen ähnlichen Effekt durch die Überexpression von TGF- β auf CD4⁺ Zellen beobachten [Hansen, et al., 2000]. Beide Versuche zeigen, dass die lokale Applikation von TGF- β eher suppressiv wirkt.

1.5. Hypothesen und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer TGF- β 1 Überexpression von T-Zellen auf die Pathogenese des Asthmas in einem *murinen* Modell zu untersuchen.

Dabei waren folgende Fragen von besonderem Interesse:

- Wie wirkt sich die Überexpression von TGF- β 1 durch T-Zellen auf AHR und Entzündung aus?
- Lassen sich AHR oder Entzündung durch Transfer von Treg beeinflussen?
- Unterscheiden sich Treg und CD25⁻ T Zellen, die TGF- β 1 überexprimieren, in ihrem Effekt auf AHR und Entzündung?
- Welches sind die Zielzellen TGF- β 1 exprimierender Treg?
- Welche Rolle spielt IL-10 bei der Suppression durch Treg und in der Suszeptibilität gegenüber AHR?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Auflichtmikroskop MZ Apo	Leica, Bensheim
Durchflusszytometer FACSCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader	GigiScan 400 ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich
Forschungsmikroskop BX 51	Olympus, Japan
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Soft-Imaging-Bildanalyse System CV II	Soft Imaging System GmbH, Münster
Thermocycler Techne Genius	Thermo-Dux, Wertheim
Zellsorter FACS-Vantage SE	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 22 x 22mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalinjektionskanülen	B.Braun, Melsungen
Sterican® 0,40 x 12mm	
Einmalskalpelle Nr.11 steril	Feather über Produkte für Medizin, Köln
Gewebekulturplatten, 96 well Frickenhausen	Cellstar® über Greiner Bio-One,
MACS® -Separationssäulen LS+	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
NEUBAUER-Zählkammer 0,100 mm; 0,0025 mm ²	Brand, Wertheim
Nylonsiebe 40 µm/ 100 µm, steril	Falcon® über BD Labware, New Jersey, USA

Objektträger Polysine™	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen 94/16 mm, steril	Cellstar® über Greiner Bio-One,
Frickenhausen	
Pinzetten	Fischer Scientific, Schwerte
Scheren	Fischer Scientific, Schwerte
Spritzen 5 ml/ 10 ml	BD Labware, New Jersey, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Tuberkulinspritzen Luer 1 ml	B.Braun, Melsungen

2.1.3. Sonstige Verbrauchsmittel

Aqua ad iniectabilia Braun	B.Braun, Melsungen
100 ml/ 1000 ml	
BSA	Serva, Heidelberg
DNA-Polymerase RED Taq	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Fluka Chemie über Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	Vitromex, Geilenkirchen
DNA-Marker ΦX174 (<i>HaeIII</i>)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
PBS Dulbecco's	GIBCO™ über Invitrogen, Karlsruhe
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau 0,4%	GIBCO™ über Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4. Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Paisley, Schottland, UK
Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung mind. 37%	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol reinst	Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Salzsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

Alle anderen Chemikalien wurden über die Firmen Boehringer, Mannheim; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheim und Riedel-de Häen, Selze bezogen.

2.1.5. Antikörper

FACS-Antikörper

FITC-Conjugated Rat Anti-Mouse CD25	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D
FITC-Isotypenkontrolle	
PE-Conjugated Rat Anti-Mouse CD4	
PE-Isotypenkontrolle	
APC-Conjugated Anti Mouse/ Rat Foxp3	eBioscience, San Diego, USA
APC-Isotypenkontrolle	

2.1.6. MicroBeads für MACS-Isolierungen

Anti-FITC MicroBeads, mouse
 Anti-PE MicroBeads, mouse
 CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse
 alle Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

2.1.7. ELISA-, CBA- und sonstige Kits

TGF- β 1-ELISA:	huhn anti-Human TGF- β 1 biotinylierter Huhn anti-human TGF- β 1 Diluent Substratlösung R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-13 ELISA	Quantikine, R&D Systems
Th1/Th2-Kit, 10plex, mouse	mGM-CSF, mIFN- γ , mL-1 α , mL-2, mL-4, mL-5, mL-6, mL-10, mL-17, mTNF- α PE Positive Control Beads PE Negative Control Beads Fluoreszens-Beads Standards Reagent Dilution Buffer Streptavidin-Phycoerythrin Bender MedSystems, Wien, Österreich

2.1.8. Oligonukleotide

hCD2	5'-TTT GTA GCC AGC TTC CTT CTG-3'
CAX	5'-TGC ACT CAT CAG AGC TAC AGG-3'
TGF- β	5'-TCG ATA GTC TTG CAG GTG GAT-3'
TCR1	5'-CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG-3'
TCR2	5'-GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT-3'
IL-10 forw	5'-GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC-3'
IL-10 rev	5'-GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG-3'
IL-10 KO NEO5	5'-CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG-3'

Die Synthese der o. g. Oligonukleotide wurde durch Metabion, Martinsried, durchgeführt.

2.1.9. Puffer und Lösungen

10x ACK-Puffer	150mM NH ₄ Cl 10mM KHCO ₃ 1,3mM EDTA add 200 ml Aqua dest. ; pH 7,4
Coating-Puffer	1M NaHCO ₃ pH 8,0 1M Na ₂ CO ₃ pH 11,0 ⇒ 0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3
FACS-Puffer	3% FCS add 500 ml PBS
4%Formalin, gepuffert	9,07 g KH ₂ PO ₄ 11,86 g Na ₂ HPO ₄ in 860 ml Aqua dest. lösen add 140 ml 37% Formalin; pH 7,4
MACS-Puffer	2mM EDTA 0,5% BSA add 500 ml PBS
1x PBS	2,7mM KCl 1,5mM KH ₂ PO ₄ 137mM NaCl 6,5mM Na ₂ HPO ₄ add 1 l Aqua dest.; pH 7,4
10x PBS	80 g NaCl 11,6 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl add 1 l Aqua dest.; pH 7,0

Proteinase K-Puffer	10 ml 2M Tris (pH 7,6) 20 ml 0,5M EDTA 5 ml 20% SDS 165 ml Aqua dest.
50xTAE-Elektrophorese-Puffer	242 g Tris Base Tris-Acetat 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) add 1 l Aqua dest.; pH 8,0
1x TBS	12,1 g Tris-HCl 8,8 g NaCl add 1 l Aqua dest. ; pH 7,4
Wasch-Puffer (ELISA)	0,05% Tween20 add 1 l PBS ; pH 7,4

2.1.10. Wasser

Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (MilliQ plus, Millipore, Eschborn) deionisiert und anschließend autoklaviert.

Für RNA-Isolierungen, PCRs und Zellkultur wurde Wasser von B.Braun, Melsungen verwendet.

2.1.11. Software

analySIS® 3.2	Soft Imaging System GmbH, Münster
CellQuest Pro	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FlowCytomix Pro 1.0.4	Bender MedSystems, Wien, Österreich
MikroWin2000	Mikrotek Laborsystem, Overath
MS Office	Microsoft®, USA
MultiCalc Editor	Wallac, Freiburg
SPSS 9.0	SPSS Inc., Chicago, USA

2.1.12. Versuchstiere

Für alle *in vivo* Studien wurden Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet. Dabei entstammten die Mausstämme FVB/N und C57/Bl6 der Zucht des Tierstalls der ZVTE (Hochhaus am Augustusplatz, Mainz) bzw. der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Zusätzlich wurden die folgenden transgenen Tiere verwendet:

hCD2- Δ KT β RII [Schramm, et al., 2003]

hCD2-TGF- β 1 [Schramm, et al., 2004]

IL-10-/- [Kuhn, et al., 1993]

Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur (RT) von 20°C gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle hier beschriebenen Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G17/05 „Einfluss von Zytokinen sowie von regulatorischen T-Zellen auf die Homöostase von Leber und Lunge“ durchgeführt.

Da einige der transgenen Linien auf dem FVB/N wildtyp- und andere auf dem C57/Bl6 wildtyp-Hintergrund waren, wurden beide Wildtypstämme als Kontrollen untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der AHR zwischen beiden Stämmen festgestellt werden; daher werden im Folgenden alle Wildtypkontrollen als WT bezeichnet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien

Die Linien hCD2-TGF- β 1 und hCD2- Δ kT β RII wurden heterozygot gehalten und mittels PCR hinsichtlich des Transgenstatus untersucht. IL-10^{-/-} Tiere wurden homozygot verpaart und gelegentlich mittels PCR auf Homozygotie überprüft.

Um doppeltransgene Tiere aus den Linien hCD2-TGF- β 1 und hCD2- Δ kT β RII zu erhalten, wurden diese miteinander verpaart und die F1 Generation mittels PCR auf den Transgenstatus überprüft.

Die Generierung von hCD2-TGF- β 1 Tieren auf dem IL-10^{-/-} Hintergrund erfolgte durch Kreuzung beider Linien. Aus der daraus resultierenden F1 Generation wurden hCD2-TGF- β 1 x IL-10^{-/+} Tiere mit IL-10^{-/-} Mäusen verpaart, um wieder einen homozygoten *knock out* Hintergrund zu erreichen. Auch hier erfolgte die Genotypisierung mittels PCR.

2.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Als Ausgangsmaterial zur Isolation der genomischen DNA wurden Ohr- oder Schwanzbiopsien der Mäuse verwendet. Diese wurden bei 55°C über Nacht in 2mg/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer verdaut. Anschließend wurden die Proben 1:15 mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser verdünnt und davon 2 μ l zur PCR-Analyse als Template eingesetzt.

2.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Amplifikation mittels PCR wurden 2 μ l aus dem Proteinase K Gewebeverdaul bei ein Gesamtvolumen von 25 μ l pro Probe eingesetzt. Für die Reaktion wurde standardmäßig der ReadyMix REDtaq zusammen mit einer 1pM Konzentration an Primern verwendet und die so amplifizierten Produkte durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und visualisiert.

Als Standard PCR-Protokoll diente diese Vorlage:

- Nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 95°C folgten 30-35 Zyklen mit:
 - Denaturierung: 1 min bei 95°C
 - Annealing: 30 sec bei 55-65°C (Primerabhängig)

- Elongation: 4 sec/ 100 Basenpaare bei 72°C
- Finale Elongation: 10 min bei 72°C

2.2.4. DNA Elektrophorese

Die Proben wurden auf ein 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und entsprechend ihrer Größe in einer horizontalen Elektrophorese aufgetrennt. 0,5x TBE wurde als Laufpuffer verwendet. Als Größenmarker diente eine 100bp oder 1Kb DNA Leiter. Die Analyse des Gels erfolgte unter UV-Licht.

2.2.5. Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden an einer Sterilbank (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden steril filtriert (0,2µm Filter, Schleicher & Schuell, Dassel; Stericup™ Filtereinheiten 0,45µm, Millipore, Eschborn).

2.2.5.1. Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus *muriner* Milz

Für die Präparation der Milzzellen wurden Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchhaut median aufgeschnitten. Nach Eröffnung des Peritoneums und anschließender Darstellung der Milz, wurde diese vorsichtig am Milzhilus abpräpariert und von aufgelagertem, periplasmatischem Fett befreit. Jeweils fünf Milzen wurden mittels eines Spritzenkolbens (1ml Tuberkulinspritze, B.Braun, Melsungen) unter Zugabe von FACS-Puffer durch ein 100µm-Zellsieb (Falcon® über BD Labware, New Jersey, USA) gedrückt und in ein 50ml Röhrchen (Cellstar® über Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Diese Zellsuspension wurde dann 5 min lang bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus, Hanau) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun in 5ml 1x ACK-Puffer aufgenommen und 1 min zur Erythrozytenlyse inkubiert. Danach wurden 25ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellsuspension durch ein 100µm-Zellsieb gegossen, unter den o. g. Zentrifugationsbedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, je nach Weiterverwendung der Zellen, in einem bestimmten Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.5.2. Isolierung von CD4⁺ Zellen aus Milz-Einzelzellsuspensionen

Die aus 2.2.5.1 gewonnene Einzelzellsuspension wurde bei 1600 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert und in so viel MACS-Puffer aufgenommen, dass eine Zelldichte von 10⁸ Zellen/ 900µl entstand. Zu den Zellen wurden 100µl anti CD4 MACS-Beads gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit MACS-Puffer wurde das Pellet in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und auf eine mit Puffer äquilibrierte MACS-Säule in einem Magneten gegeben. Nach Durchfluss der Zellen wurde die Säule mit 3ml MACS-Puffer gewaschen, aus dem Magneten genommen und die CD4⁺ Zellen mit 5ml MACS-Puffer eluiert.

2.2.5.3. Isolierung von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ Zellen aus Milz-Einzelzellsuspensionen

Die aus 2.2.5.1 isolierten Zellen wurden in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und mit 15µl anti CD25-FITC Antikörper für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach waschen mit FACS-Puffer, wurden die Zellen in 900µl MACS-Puffer resuspendiert und für 9 min bei 4°C mit 90µl anti-FITC Beads inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, in 1ml Puffer aufgenommen und auf eine zuvor äquilibrierte MACS-Säule in einem Magneten gegeben. Nach Durchlauf der Suspension wurde die Säule mit 3ml MACS-Puffer gewaschen, aus dem Magnet genommen und die CD25⁺ Zellen mit 5ml Puffer eluiert. Der Durchfluss wurde zur Isolierung der CD4⁺CD25⁻ Zellen auf Eis aufbewahrt.

Als nächstes wurden die CD25⁺ Zellen abzentrifugiert, in 400µl FACS Puffer aufgenommen und mit 8µl anti CD4-PE Antikörper für 5 min auf Eis gefärbt. Nach Zusatz von 2,5ml FACS-Puffer konnten die Zellen mit einem Zellsorter gesortet werden.

¼ des CD25-depletierten Durchflusses wurde zentrifugiert und in 1ml MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100µl anti CD4-Beads, wurden die Zellen 15 min bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und, wie oben beschrieben, über eine Säule aufgereinigt.

2.2.5.4. Kontrolle der Reinheit der Zellisolationen

Während der Durchführung der Zellisolationen von CD4⁺CD25⁻- und CD4⁺CD25⁺-Lymphozyten aus der Milz, wurden 50µl Proben des Eluats und des Durchflusses entnommen, mit PE oder FITC gekoppelten Antikörpern gegengefärbt und sofort mit einem Durchflusszytometer (FACS-Canto, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen.

2.2.6. Durchflusszytometrische Messungen

Durch Anfärben von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet sind, können mittels Durchflusszytometrie bestimmte Zellpopulationen aus einer Zellsuspension bestimmt werden. Die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch LASER angeregt und von Photosensoren mit Filtern für bestimmte Wellenlängen gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Farbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) verwendet.

Die Aufnahme (10.000 gezählte Ereignisse) und Auswertung der Daten wurde unter Verwendung des Programms CellQuest Pro bzw. FACS-DIVA (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) vorgenommen.

2.2.6.1. Herstellung der durchflusszytometrischen Proben

Mononukleäre Zellen aus Milz und Lunge wurden nach der in 2.2.5. beschriebenen Methode isoliert. Für die Einzel- und Mehrfachfärbungen wurden von den zu untersuchenden Zellen $\sim 1 \times 10^6$ Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, in ein Rundbodenröhrchen (Falcon® über BD Labware, New Jersey, USA) gegeben und mit 1µg Antikörper versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4°C) (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau und Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) und anschließend mit 1ml PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort mit einem FACS-Canto (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen oder mit 2% PFA in PBS für 30 min bei 4°C fixiert und bis zur Messung in 500µl PBS bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Zu jeder Messung wurden die entsprechenden Isotyp-Kontrollen gefärbt sowie eine Nativprobe ohne Antikörper bereit gehalten.

2.2.7. Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Messung der Atemwegshyperreagibilität (AHR)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein gut etabliertes, *murines* Asthmodell genutzt [Schramm, et al., 2003, Takeda, et al., 1997], um die Effekte von TGF- β 1 auf regulatorische T-Zellen zu untersuchen. Die Messung der AHR erfolgte mittels „Head-out body-Plethysmographie“ [Glaab, et al., 2001], wobei diese Ergebnisse zusätzlich mittels invasiver Whole-body-Plethysmographie verifiziert wurden.

2.2.7.1. Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge

Die Sensibilisierung gegen ein Protein ist die Grundvoraussetzung für die Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell wurde die Sensibilisierung durch zwei intraperitoneale Injektionen von 100 μ g des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA Grade IV, Sigma, Steinheim, D), gelöst in 100 μ l PBS an den Tagen 0 und 14 des Versuchsprotokolls, in Verbindung mit 100 μ l des Adjuvans Aluminiumhydroxyd (Al(OH)₃) (Sigma) initiiert. Kontrolltiere erhielten 100 μ l PBS in Verbindung mit 100 μ l (Al(OH)₃). Die systemische Applikation von Ovalbumin führte im Laufe des Immunisierungsprozesses zur Bildung von OVA-spezifischen TH2-Zellen, wie sie auch beim menschlichen Asthma vorkommen.

An den Tagen 25, 26 und 27 folgte die Verabreichung eines Aerosols aus 1% OVA (Sigma, Grade V) in PBS für 20 min, wodurch es zu einem Antigenkontakt in der Lunge kam, der die lokale Entzündungsreaktion initiierte. Die Messung der AHR wurde an Tag 28 durchgeführt (Abb. 4).

2.2.7.1.1. Adoptiver Transfer von CD4⁺CD25⁺ sowie CD4⁺CD25⁻ Zellen in sensibilisierte Mäuse

Um den Einfluss unterschiedlicher Zellpopulationen auf die Asthmareaktion zu untersuchen, wurden jeweils 3,5x10⁵ der verschiedenen Zelltypen (Tab.1) aus OVA-sensibilisierten Tieren am Tag 25, mindestens drei Stunden vor dem ersten OVA-Aerosol, i. p. in ebenfalls sensibilisierte Tiere injiziert (Abb. 4).

Da hCD2-TGF- β 1 transgene T-Zellen verstärkt IL-10 exprimieren, sollte der Einfluss von IL-10 im verwendeten Modell untersucht werden. Hierzu wurden sowohl wildtyp- als auch hCD2-TGF- β 1 CD4⁺CD25⁺ Zellen in IL-10^{-/-} Tiere transferiert. Zusätzlich

bekam jeweils eine mit wildtyp- sowie eine mit transgenen Zellen transferierte Gruppe von Mäusen einen neutralisierenden IL-10 Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden, D) i. p. injiziert (62,5µg i. p. an Tag 25 und 27), um das IL-10, welches von den transferierten Zellen produziert wird, zu neutralisieren.

Alle transferierten Zellen wurden nach dem Sorten auf ihre Reinheit untersucht; sie lag immer zwischen 96 und 99%.

Transferierte Zellen	Empfängertiere
FVB CD4 ⁺ CD25 ⁺	FVB
FVB CD4 ⁺ CD25 ⁻	FVB
hCD2-TGF-β1 CD4 ⁺ CD25 ⁺	FVB
hCD2-TGF-β1 CD4 ⁺ CD25 ⁻	FVB
C57/B6 CD4 ⁺ CD25 ⁺	IL-10 -/-
C57/B6 CD4 ⁺ CD25 ⁺ + 125µg anti IL-10 AK	IL-10 -/-
hCD2-TGF-β1 CD4 ⁺ CD25 ⁺	IL-10 -/-
hCD2-TGF-β1 CD4 ⁺ CD25 ⁺ + 125µg anti IL-10 AK	IL-10 -/-
hCD2-TGF-β1 x hCD2-ΔkTβRII CD4 ⁺ CD25 ⁺	C57/B6
hCD2-TGF-β1 x IL-10 -/- CD4 ⁺ CD25 ⁺	C57/B6

Tab. 1: Auflistung der unterschiedlichen Zellpopulationen, die adoptiv transferiert wurden

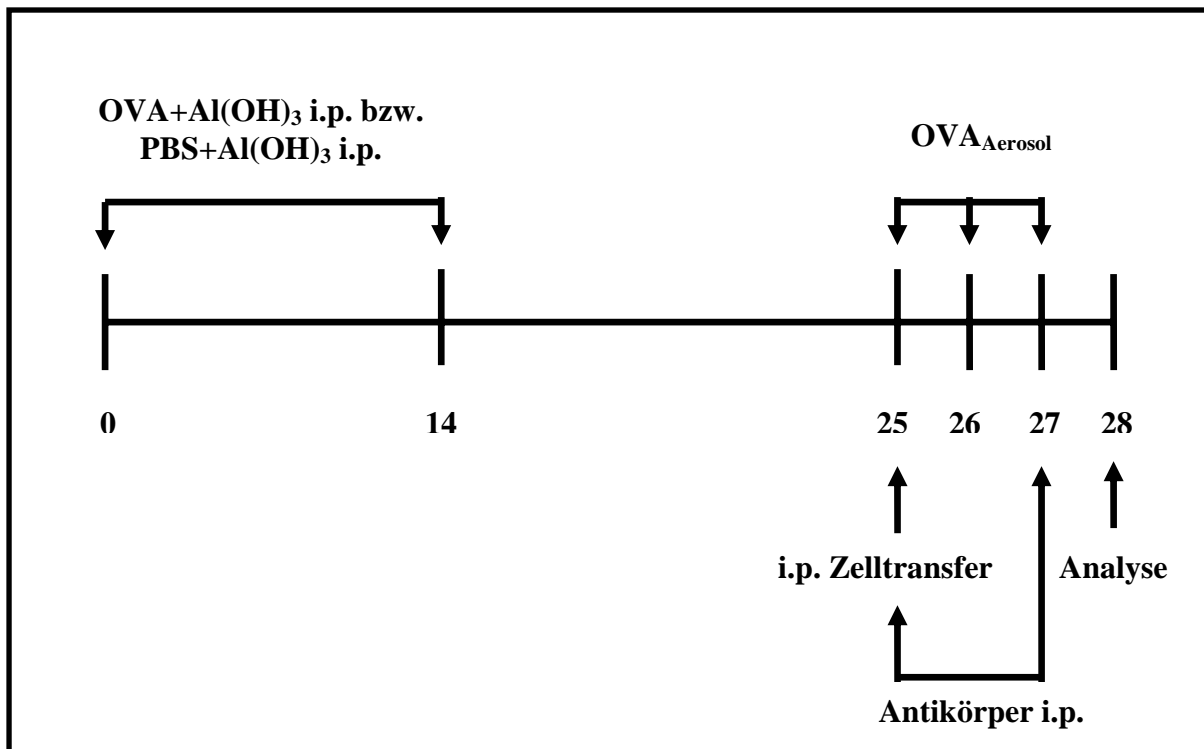


Abb. 4: Immunisierungsprotokoll

Zellen wurden an Tag 25, mindestens 3h vor dem OVA-Aerosol transferiert. Neutralisierender Antikörper wurde zum Einen an Tag 25 zusammen mit den Zellen verabreicht, zum Anderen an Tag 27 kurz vor dem OVA-Aerosol.

2.2.8. Messung der AHR gegenüber β -Methyl-Acetylcholin (MCh) mittels Head-out Body-Plethysmographie

Die Messung der AHR erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Renz aus der Abteilung für klinische Chemie und molekulare Diagnostik an der Universitätsklinik in Marburg.

Die Methode der Head-out Body-Plethysmographie ermöglicht die Messung verschiedener Lungenfunktionsparameter, wie dem halbmaximalen expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemfluss, dem Atemzugvolumen, der Expirations- bzw. Inspirationszeit, sowie der Atemfrequenz am spontan atmenden, nicht anästhesierten Tier. Als Basis für die Berechnung dieser Parameter dient dabei der expiratorische bzw. inspiratorische Atemfluss, der aus einer atmungsbedingten Druckveränderung innerhalb des Plethysmographen abgeleitet wird. MCh dient bei der Messung als Bronchokonstriktor, der eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur induziert, was zu einer Erhöhung des Atemwegswiderstands führt und somit eine Verringerung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF_{50}) bewirkt. Schließlich wird die

MCh-Konzentration ermittelt, die eine 50%-ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt (MCh_{50}).

2.2.8.1. Aufbau der Messapparatur

Das benutzte System bestand aus einem 2,5l Glaszylinder (Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover) als Expositions-kammer. Diese Kammer konnte über einen Eingang belüftet sowie mit Aerosolen versorgt werden. An einem Ausgang konnte die Abluft unter einem kontinuierlichen Luftstrom von 14 Litern/Minute mit einer Vakuum-Pumpe abgesaugt werden.

Vier Head-out Body-Plethysmographen aus Glas wurden an geschliffenen Verbindungsstücken so mit der Expositions-kammer verbunden, dass ein luftdichter Abschluss vorhanden war. An der in die Kammer ragenden Seite des Plethysmographen befand sich ein Latexkragen mit einer zentralen 8mm durchmessenden Öffnung, der als luftdicht abschließende Halskrause für die Versuchstiere diente (Abb. 5). Durch die Bewegung des Brustkorbs des atmenden Tiers wurde die Luft in der Kammer komprimiert oder gedehnt, wodurch am Ableitungsrohr des Plethysmographen ein Luftstrom entstand, der wiederum von einem Pneumotachographen (PTM 378/1.2, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) gemessen wurde. Da der Druck in der Kammer den Fluktuationen am Pneumotachographen entspricht, ist dieser immer proportional zur Atemstromstärke. Das Atemflusssignal jedes Tieres wurde seinerseits durch ein Potentiometer (CFBA, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) verstärkt und an einen Computer mit Analog-Digital-Wandlerkarte weitergeleitet. Unter Verwendung der Software NOTOCORD hem 3.5 (Notocord, Paris, F) wurden die gewonnenen Daten am Computer gespeichert und analysiert.

2.2.8.2. Messablauf

Jede Messung begann mit einer 15 minütigen Messung der so genannten Baseline $X \pm SD$ für den EF_{50} . Während 15 Minuten atmet eine Maus etwa 4000 mal ein und aus. Während dieser Messphase, wurden alle Werte aufgenommen, gemittelt und für jeden dieser Mittelwerte der Wert 100 festgelegt. Entsprechend auftretende Veränderungen gegenüber diesen Kontrolldaten wurden dann als prozentuale

Abweichung von der Baseline ermittelt. Im Anschluss an die Erfassung der Baseline wurde alle 5 min für jeweils 70 sec eine MCh-Lösung (β -Methyl-Acetylcholin, Sigma, Steinheim, D) in aerosoler Form und ansteigender Konzentration in die Expositions-kammer geleitet, während die Lungenfunktionsparameter weiterhin kontinuierlich aufgenommen wurden. Folgende Konzentrationen von MCh in PBS wurden in aufsteigender Reihe verwendet: 0mg/ml, 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml und 125mg/ml.

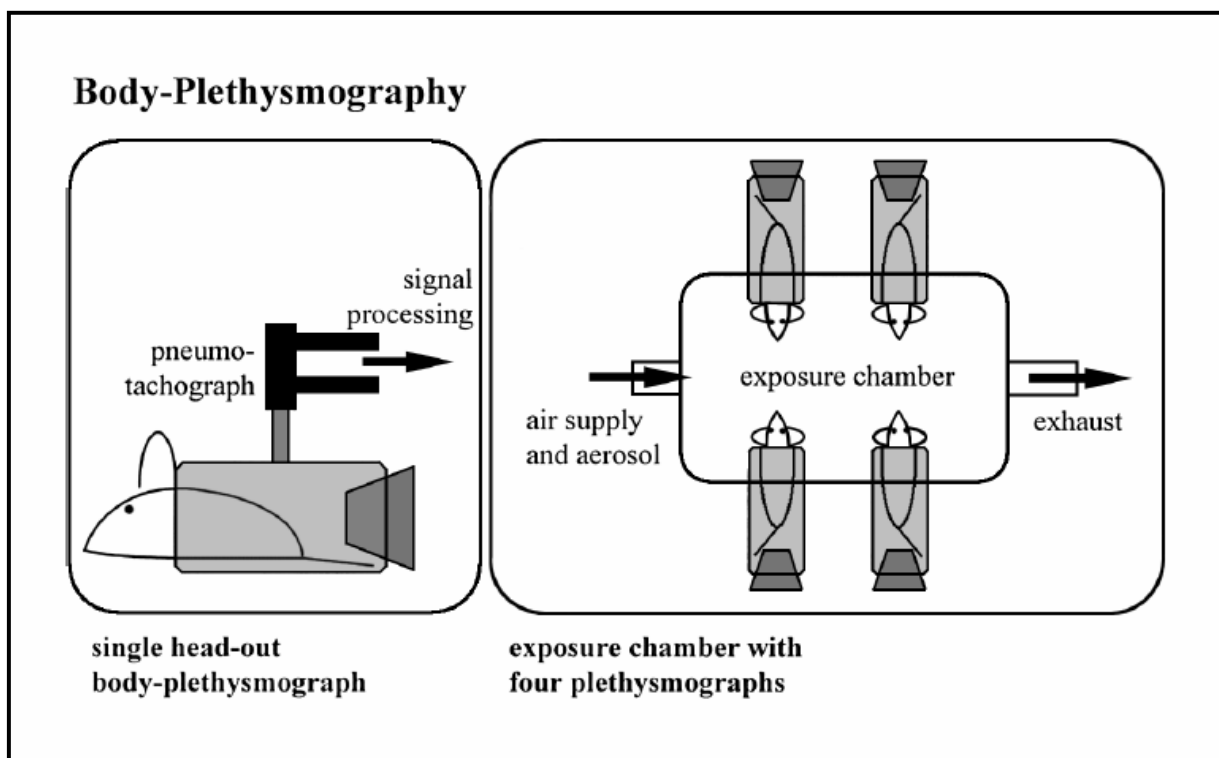


Abb. 5: Body-Plethysmographie

Darstellung des in der Arbeit verwendeten Head-out-Plethysmographen zur Ermittlung der AHR. Aus: [Glaab, et al., 2001]

2.2.9. Messung des Lungenwiderstands (RI) mittels invasiver Plethysmographie

Da es bei der Head-out Plethysmographie, z. B. aufgrund von Temperaturveränderungen im Plethysmograph zu Messungenauigkeiten kommen kann, wurde der Lungenwiderstand beispielhaft für vier OVA-immunisierte Wildtypen und vier OVA-immunisierte hCD2-TGF- β 1 Mäuse zusätzlich mit der invasiven Whole-

body Plethysmographie gemessen. Diese Messung fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Finotto an der Universitätsklinik in Mainz statt.

Mit Pentobarbital anästhesierte, spontan atmende Mäuse wurden tracheal kannuliert und mit einem Beatmungsgerät (Mouse Ventilator, Ugo Basile) beatmet. Zusätzlich wurde eine Kannüle in den Ösophagus eingeführt, die an einen Druckwandler angeschlossen war, welcher den transpulmonalen Druck (tracheal – ösophageal) aufzeichnete. Mittels eines isovolumetrischen Analysegerätes (Buxco Electronics) und der Software ByoSystem XA wurden die Daten digitalisiert und Lungenwiderstand (RI) sowie Lungenelastizität berechnet. Dabei gilt der Lungenwiderstand als Maß für die AHR und wird mit der isovolumetrischen Methode bestimmt, bei der Volumenveränderungen, sowie Druckveränderungen im Atemfluss bei Ein- und Ausatmung berechnet werden.

Auch bei dieser Methode wurden steigende Methacholindosen genutzt, um Bronchokonstriktion auszulösen. Dazu wurde das Methacholin so aerosolisiert, dass es über die tracheale Kanüle direkt in die Lunge gelangte.

2.2.10. Analyse von Zellen und Zytokinen aus der Broncho-alveolären Lavage Flüssigkeit (BALF)

Nachdem die AHR gemessen wurde, wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet, die Trachea frei präpariert und diese mit einem kleinen Loch versehen, durch welches die Lungen zweimal mit 800µl eiskaltem PBS mittels einer 1000µl-Pipette gespült wurden. Nachdem das Volumen der BALF bestimmt wurde, wurde diese für 5min bei 4°C mit 1500 rpm abzentrifugiert, der Überstand zur Zytokinbestimmung abgenommen und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen.

2.2.10.1. Analyse von Zellen aus der BALF

Die Anzahl an Lymphozyten in der BALF wurde mittels eines CASY® TT Zellzählsystems (Schärfe System, Reutlingen, D) bestimmt. Danach wurden aus jeweils 100µl Zellsuspension Zytospin-Präparate (500 rpm für 5 min) (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D) hergestellt, die zur Differenzierung nach Trocknen für mindestens 45 min mit Diff-Quick®-Lösung (Dade-Behring, Marburg, D) gefärbt wurden. Dazu wurden die Objektträger, nach Gebrauchsanweisung,

nacheinander jeweils dreimal in einer der drei Färbelösungen geschwenkt, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Die nun differenzial gefärbten Zellen konnten unter einem Durchlichtmikroskop je nach Zelltyp (Eosinophile, Makrophagen, Leukozyten) ausgezählt werden. Dabei wurden pro Maus insgesamt mindestens 200 Zellen gezählt und die Anzahl der unterschiedlichen Zellen pro 1ml BALF berechnet.

2.2.10.2. Bestimmung von Zytokinen aus der BALF

Zur Bestimmung verschiedener Zytokine aus der BALF wurden zwei Verfahren angewandt. Für die Bestimmung von IL-13 und TGF- β wurde ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt, wohingegen GM-CSF, IFN-g, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 und TNF-a mit einem TH1/ TH2 FlowCytomix[®] Kit (Bender MedSystems, Wien, A) bestimmt wurden.

2.2.10.2.1. TGF- β 1-ELISA zur Bestimmung von Gesamt TGF- β 1

Zunächst wurde der monoklonale Erstantikörper in einer Konzentration von 0,8 μ g/ml mit PBS verdünnt. 100 μ l dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung einer 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno[™]Platte, Nunc, Wiesbaden) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Dekantieren wurde die Platte mit Wasch-Puffer dreimal gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden, wurden 300 μ l Blockpuffer zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Platte, wurden pro Well 100 μ l der BALF pipettiert und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zuvor wurde die BALF noch mit 1N HCL versehen, für 10 min inkubiert und mit 1,2N NaOH/ 0,5M HEPES gestoppt, was zu einer Säureaktivierung des TGF- β in der BALF führte.

Zur Erstellung einer Standardreihe, die von 2000pg bis 0pg reichte wurde rekombinantes, humanes TGF- β 1 (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet; als Leerwert diente PBS/ 0,1% BSA-Lösung.

Als nächstes wurden nach erneutem Waschen 100 μ l des polyklonalen, biotinylierten Zweitantikörpers in einer Konzentration von 0,8 μ g/ml in PBS dazugegeben und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurden 100µl eines Streptavidin/ Horseradish-Peroxidase (HRP)-Konjugates pro Well (Konzentration: 1:1000) zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach anschließendem Waschen wurden 100µl der Substratlösung zugegeben und 20 - 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50µl Stopplösung (1M H₂SO₄) pro Well hinzugefügt, um die Farbreaktion zu beenden und die Platte konnte mit einem ELISA-Reader (GigiScan 400, ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen und mittels MikroWin2000 (Mikrotek Laborsystem, Overath) ausgewertet werden.

2.2.10.2.2. Bestimmung von IL-13 in der BALF

Zur IL-13 Bestimmung aus der BALF wurde der Quantikine ELISA (R&D Systems) nach Herstellerangaben verwendet. Zu jeweils 50µl Assay Diluent pro Well, einer bereits vom Hersteller mit anti IL-13 beschichteten 96-Well Platte, kamen 50µl Standard, Probe oder Positivkontrolle. Nach gutem Durchmischen auf einem Schüttler, wurde die Platte 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer kamen 100µl Maus IL-13 Konjugat für 2h in jedes Well. Nach erneutem Waschen wurden 100µl Substratlösung pro Well zugesetzt und die Platte für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach Abstoppen mit 100µl Stopplösung pro Well wurde innerhalb von 30 min die Optische Dichte mit einem ELISA-Reader gemessen und die entsprechenden Konzentrationen mittels MikroWin2000 berechnet.

2.2.10.2.3. Zytokinbestimmungen mittels FlowCytomix®

Der FlowCytomix Kit (Bender MedSystems) ist ein auf Fluoreszenz basierendes Immunoassayverfahren, welches in der Lage ist Zytokinkonzentrationen im FACS zu quantifizieren. Der Vorteil des FlowCytomix Kits liegt darin, dass in einem sehr geringen Probenvolumen bis zu zehn verschiedene Zytokine auf einmal bestimmt werden können.

Grundlage der Messung sind zehn verschiedene Arten von Latexpartikeln, die bei LASER-Anregung eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität zeigen. Jede der zehn Partikelpopulationen ist zudem mit einem anderen Primärantikörper gegen ein

spezifisches Zytokin beschichtet. Nach Zugabe der Proben, bzw. der Zytokinstandards, wird ein zweiter PE-konjugierter Antikörper zugefügt. Werden die Proben dann in einem FACS-Canto (Becton Dickinson, USA) gemessen, können zwei Fluoreszenzsignale detektiert werden: zum einen lassen sich aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel die Zytokine diskriminieren, zum Anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper, auf die Konzentration der verschiedenen Zytokine geschlossen werden. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers benutzt.

2.2.10.2.4. Probleme bei der Auswertung der Zytokinbestimmung

Aufgrund der großen Anzahl an Proben mussten die Zytokine in verschiedenen Tests an verschiedenen Tagen gemessen werden. Des Weiteren war das gewonnene Volumen an BALF mit ca. 1ml pro Tier nicht so groß, dass alle Zytokine von einem Tier mehrmals gemessen werden konnten. Im Ergebnisteil sind daher nur die vergleichbaren Gruppen grafisch zusammengestellt.

2.2.11. Erstellen von Paraffinschnitten aus Lungengewebe

Nach der wie unter 2.2.10. beschriebenen Erstellung der BALF wurde über das Loch in der Trachea 1ml 4%-ige Formallinlösung in die Lunge gefüllt, diese aus der Maus präpariert und in 4%-iger Formallinlösung für mindestens 24h inkubiert. Als nächstes wurde das Gewebe für zwei bis fünf Stunden mit Leitungswasser gespült und für jeweils 45 min durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt, nachdem es zuvor für mindestens acht Stunden in 100% Isopropanol dehydriert wurde. Nach insgesamt drei Stunden in Xylol wurden die Lungen zunächst für vier Stunden in flüssiges Paraffin gebracht, das schließlich gewechselt wurde, um das Gewebe über Nacht in frischem Paraffin zu inkubieren. Am nächsten Tag konnten die Lungen in frisches Paraffin überführt und in Silikonförmchen ausgehärtet werden. Nach Aufblocken der Paraffinblöckchen auf Blockhalter wurden 5µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica, Solms, D) gemacht.

2.2.11.1. Hämatoxylin und Eosin Färbung von Lungengewebe

Die wie unter 2.2.11. beschriebenen Lungen-Sektionen wurden in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit dreimaliger Inkubation in Xylol für jeweils 5 min, entparaffiniert und rehydriert. Anschließend kamen die Schnitte für ca. 1 min in eine Hämatoxylin-Lösung nach Gill II (Roth), wurden kurz mit destilliertem Wasser gespült und dann mit Leitungswasser für etwa 15 min gebläut. Danach folgte eine Färbung für 30 sec in 5% Eosin in 90% Ethanol. Das Gewebe wurde dann zweimal kurz in 100% Ethanol geschwenkt und 3 min in Xylol inkubiert. Zum Schluss sind die Präparate in xylolhaltigem Eindeckmedium (Entellan, Merck, Darmstadt, D) eingedeckelt worden und waren nach einer Trockenzeit von einem halben Tag fertig für die Analyse mit dem Mikroskop.

2.2.12. Mikroskopische Auswertung der peribronchialen Entzündung

Von jeder Lunge wurde ein H&E gefärbter Schnitt zur Bestimmung des peribronchialen Entzündungsinfiltrats herangezogen. Dazu wurden von jedem Schnitt drei repräsentative Entzündungsareale fotografiert und mittels der Software analySIS[®] 3 (Soft Imaging System GmbH, Münster) vermessen. Die so ermittelte infiltrierte Fläche wurde dann in Relation zur gesamt ausgemessenen Fläche gesetzt und der Prozentsatz für die Entzündung errechnet.

2.2.13. Statistik

Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney Test mittels der Software SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) angewandt. In den Grafiken sind Mittelwert und SEM (Standardfehler des Stichproben-Mittelwerts) angegeben. Ein P-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Schutz vor AHR durch Überexpression von TGF- β 1 auf T-Zellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression eines dominant negativen TGF- β II Rezeptors auf T-Zellen, also die Unterbrechung des TGF- β Signalwegs, zu einer höheren AHR Suszeptibilität im Vergleich zu wildtyp-Mäusen, in einem *murinen* Asthmodell führt [Schramm, et al., 2003]. Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass die Überexpression von TGF- β durch CD4⁺ Zellen die Pathogenese des Asthmas günstig beeinflusst [Hansen, et al., 2000]. Um den Zusammenhang zwischen Asthma und TGF- β näher aufzuklären und ob TGF- β eventuell als therapeutisches Werkzeug funktionieren kann, wurde eine Maus, die aktives TGF- β 1 T-zellspezifisch überexprimiert (hCD2-TGF- β 1), näher untersucht.

Dazu wurden sowohl wildtyp- als auch hCD2-TGF- β 1 transgene Mäuse mit OVA immunisiert (OVA-Al(OH)₃) und antigenspezifisch sensibilisiert. Als Kontrollgruppe dienten nicht immunisierte (PBS-Al(OH)₃ injizierte) wildtyp-Mäuse und transgene Tiere, die ebenfalls antigenspezifisch provoziert wurden. Wie erwartet, reagierten die OVA-immunisierten wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den nicht immunisierten Tieren mit einer signifikant höheren AHR (MCh₅₀: WT-OVA, 25,3 ± 2,95 mg/ml, vs. WT-PBS, 62,6 ± 7,97 mg/ml; p=0,0006). Im Vergleich dazu reagierten die OVA-immunisierten hCD2-TGF- β 1 Mäuse erst bei einem der nicht immunisierten wildtyp-Tiere vergleichbaren MCh₅₀ Wert, zeigten damit also einen Schutz vor AHR (MCh₅₀: hCD2-TGF- β 1-OVA, 64,2 ± 8,65 mg/ml, vs. WT-OVA, 25,3 ± 2,95 mg/ml; p=0,0025) (Abb. 6).

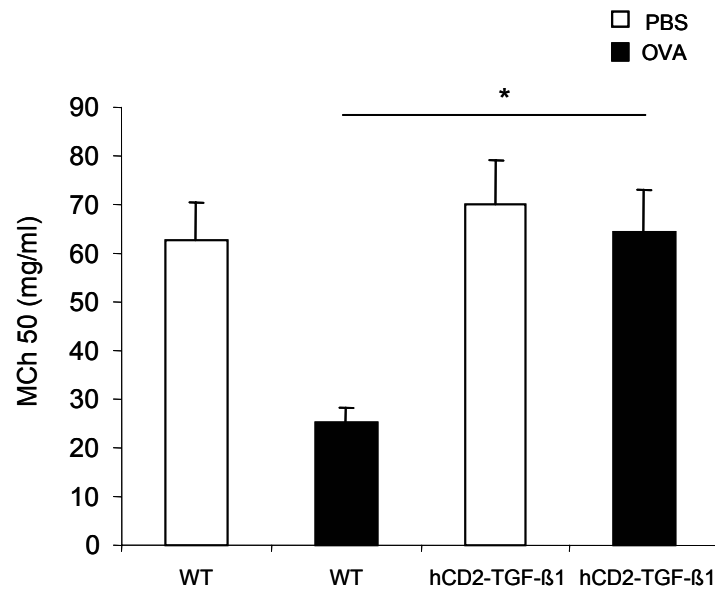


Abb. 6: Überexpression von TGF-β1 auf T-Zellen schützt vor AHR

OVA-immunisierte, transgene Tiere tolerierten signifikant höhere MCh₅₀ Konzentrationen, als OVA-immunisierte wildtyp-Tiere ($p=0,0025$).

3.1.1. Bestätigung des Schutzes vor AHR in hCD2-TGF-β1 Tieren durch invasive „body Plethysmographie“

Da, wie unter 1.2.1. beschrieben, die Messung der AHR mittels „Head-out Plethysmographie“ nur indirekt Aufschluss über den Atemwiderstand gibt, wurden die hCD2-TGF-β1 transgenen Tiere auch mittels invasiver „body Plethysmographie“ gemessen, um ganz sicher zu gehen, dass der protektive Effekt kein Messartefakt ist. Auch mit dieser Methode konnte ein Schutz vor AHR für die transgenen Tiere festgestellt werden (Abb. 7).

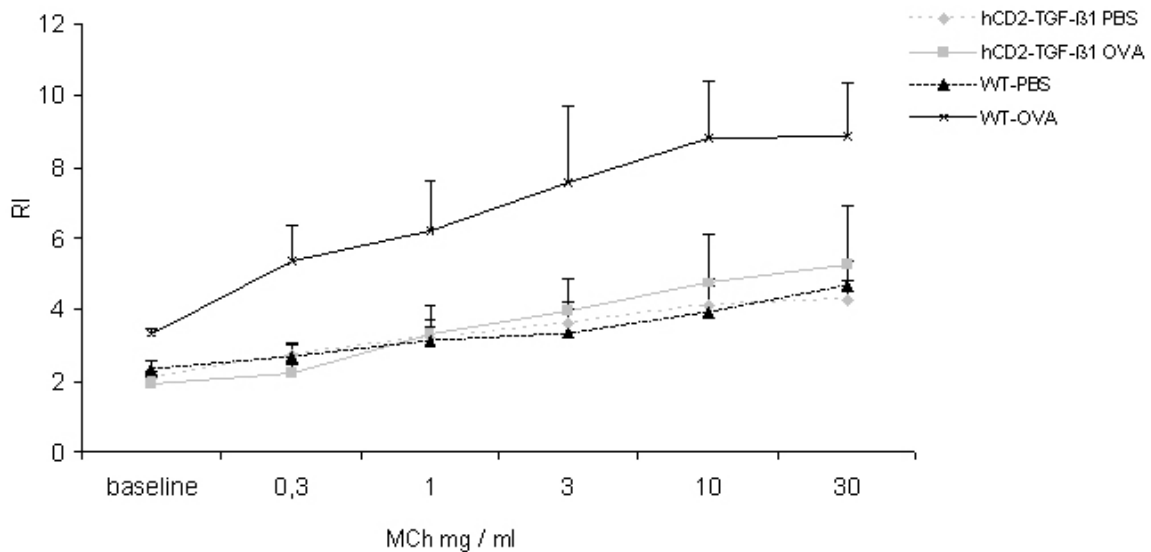


Abb. 7: Invasive „body plethysmographie“

Mittels invasiver „body plethysmographie“ konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Überexpression von TGF-β1 auf T-Zellen vor AHR schützt. OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse hatten einen signifikant höheren Lungenwiderstand (RI), verglichen mit OVA-immunisierten transgenen Tieren.

3.2. Transfer des Schutzes vor AHR auf wildtyp-Mäuse durch Zelltransfer von TGF-β1 überexprimierenden T-Zellen

Da TGF-β1 auf allen T-Zellen in den transgenen Tieren überexprimiert wird und diese Tiere erhöhte gesamt-TGF-β1 Spiegel in der BALF hatten, war es von großem Interesse zu sehen, ob der Schutz vor AHR allein durch erhöhte systemische Zytokinspiegel vermittelt wird oder durch einen bestimmten TGF-β1 überexprimierenden T-Zelltyp. Aus diesem Grund wurden zunächst 1×10^6 CD4⁺ Zellen aus hCD2-TGF-β1 Mäusen sowie aus wildtyp-Tieren in sensibilisierte wildtyp-Mäuse transferiert.

Die Messung der AHR ergab, dass der Schutz vor AHR durch den adoptiven Transfer von transgenen CD4⁺ Zellen vermittelt werden konnte. Im Vergleich zu den OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen, reagierten die mit transgenen Zellen transferierten Tiere signifikant schwächer mit einer Bronchokonstriktion (MCh₅₀ WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml, vs. WT-OVA+hCD2-TGF-β1 CD4⁺, $62,64 \pm 9,34$ mg/ml; $p=0,0006$). Tiere, die CD4⁺ Zellen aus wildtyp-Mäusen erhalten hatten, zeigten dagegen eine ähnlich starke AHR, wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse (MCh₅₀ WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml, vs. WT-OVA+WT CD4⁺, $21,68 \pm 3,7$ mg/ml) (Abb. 8).

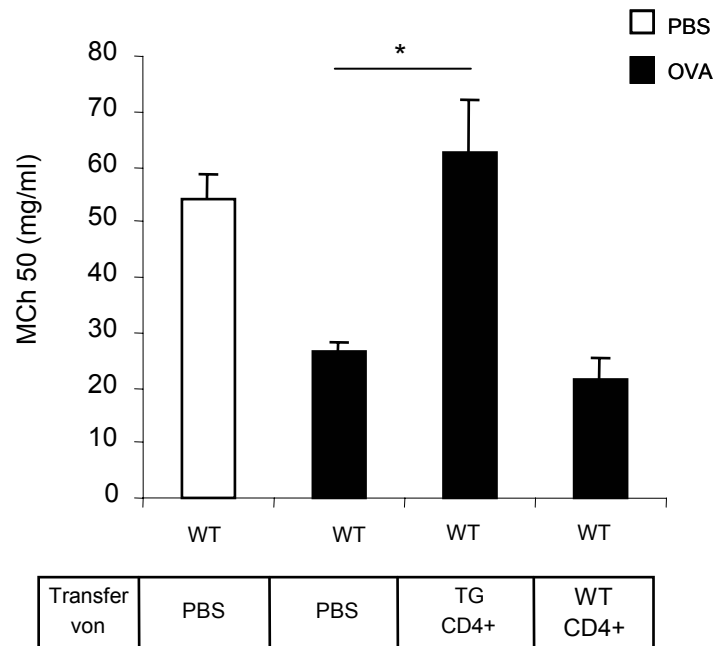


Abb. 8: Transfer des Schutzes vor AHR

Wildtyp-Tiere, die hCD2-TGF- β 1 transgene CD4⁺ Zellen transferiert bekommen hatten, zeigten einen signifikanten Schutz vor AHR, verglichen mit OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen ($p=0,0006$). Wildtyp-Mäuse, die mit wildtyp CD4⁺ Zellen transferiert wurden, zeigten eine ähnlich starke AHR wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse.

3.2.1. Schutz vor AHR durch Transfer von TGF- β 1 überexprimierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte im nächsten Schritt festgestellt werden, welche Subpopulation der CD4⁺ Zellen für den Schutz verantwortlich ist. Da, wie in der Einleitung erwähnt, besonders regulatorische T-Zellen im Fokus der immunologischen Forschung stehen und TGF- β einen Einfluss auf deren Suppressionswirkung zu haben scheint [Schramm, et al., 2004], wurden diese Zellen als nächstes transferiert.

Dazu wurden CD4⁺CD25⁺ Zellen aus der Milz von OVA-immunisierten, transgenen und wildtyp-Tieren isoliert sowie CD4⁺CD25⁻ Zellen aus den gleichen Tieren gewonnen. Jeweils $3,5 \times 10^5$ dieser Zellen sind vor der ersten OVA-Provokation i. p. in OVA-immunisierte Empfänger-wildtyp-Tiere injiziert worden. Bei der anschließenden Messung der AHR konnte ein signifikanter Schutz vor AHR in wildtyp-Mäusen festgestellt werden, die TGF- β 1 überexprimierende CD4⁺CD25⁺ T-

Zellen transferiert bekommen hatten, im Vergleich zu wildtyp-Mäusen, die statt Zellen eine PBS Injektion bekommen hatten (MCh_{50} WT-OVA+TG Treg, $67,9 \pm 6,2$ mg/ml, vs. WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml; $p=0,025$). Mit TGF- β 1 überexprimierenden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen konnte dieser Schutz nicht übertragen werden (WT-OVA+TG $CD4^+CD25^-$, $25,9 \pm 5,5$ mg/ml vs. WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml) (Abb. 9).

Auch der Transfer von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus wildtyp-Mäusen erbrachte keinen Schutz vor AHR (MCh_{50} , WT-OVA+WT Treg, $16,99 \pm 1,4$ mg/ml, vs. WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml); tatsächlich zeigten diese Tiere die stärkste Suszeptibilität für eine Bronchokonstriktion im Vergleich zu allen in dieser Arbeit untersuchten Tieren. Die wildtyp-Mäuse, die $CD4^+CD25^-$ Zellen aus wildtyp-Tieren transferiert bekamen, zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu nicht transferierten wildtyp-Mäusen (MCh_{50} , WT-OVA+WT $CD4^+CD25^-$, $26,95 \pm 5,2$ mg/ml vs. WT-OVA+PBS, $26,3 \pm 2,1$ mg/ml) (Abb. 9).

Somit konnte nur mit $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus TGF- β 1 überexprimierenden Tieren ein Schutz vor AHR vermittelt werden.

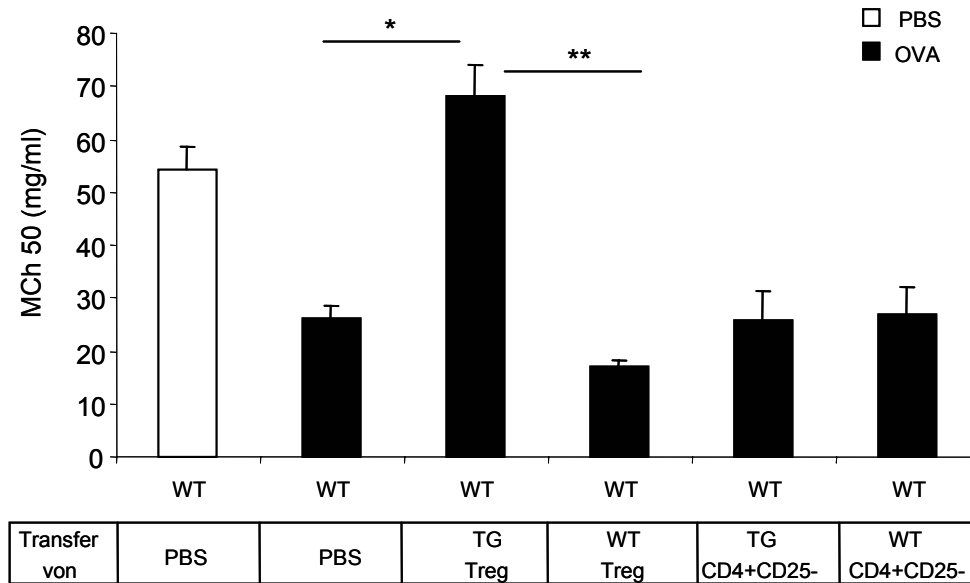


Abb. 9: Schutz vor AHR durch Transfer von TGF- β 1 überexprimierenden, regulatorischen T-Zellen

Im Vergleich zu OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen, reagierten wildtyp-Mäuse, die transgene Treg bekommen hatten bei einem signifikant höheren MCh₅₀ Wert ($p=0,025$). Verglichen mit Tieren die transgene CD4⁺CD25⁻ Zellen bekommen hatten liegt der MCh₅₀ Wert ebenfalls signifikant höher ($p=0,0016$). Alle anderen adoptiv transferierten Tiere lagen im gleichen Bereich wie die OVA-immunisierten wildtyp-Mäuse, wobei die Tiere, die Treg aus wildtyp-Tieren erhalten hatten, am stärksten reagierten.

3.2.2. Bei den transferierten CD4⁺CD25⁺ Zellen handelte es sich um regulatorische T-Zellen

Um auszuschließen, dass es sich bei den transferierten Zellen um aktivierte T-Zellen handelte, wurden die isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen auf den regulatorischen T-Zellmarker Foxp3 untersucht. Per FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass 96,8% der transgenen sowie 90,4% der wildtyp CD4⁺CD25⁺ Zellen Foxp3 positiv waren (Abb. 10).

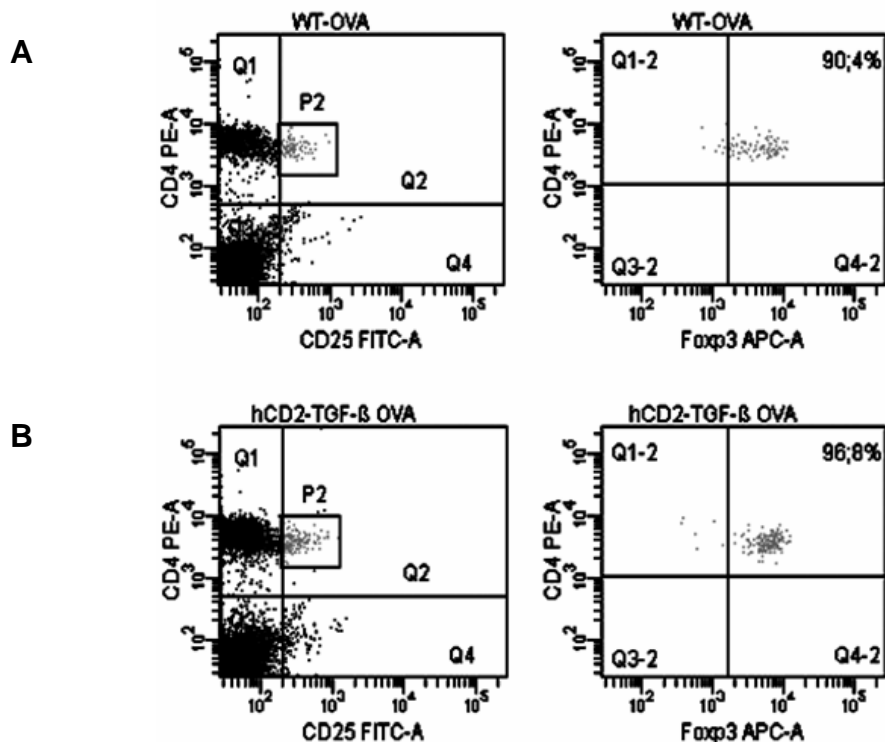


Abb. 10: FACS-Analyse der transferierten Zellen

Die, wie unter 2.2.5.3. beschrieben, isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen aus wildtyp-Tieren (A) und transgenen Mäusen (B) wurden auf die Expression von foxp3 analysiert. 96,8% der transgenen und 90,4% der wildtyp-Zellen waren positiv für den Transkriptionsfaktor.

3.3. Vermittlung des Schutzes vor AHR durch einen Effekt von TGF-β1 auf Empfänger-T-Zellen

In einem nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob die Wirkung des TGF-β1 bezogen auf den Schutz vor AHR parakrin oder autokrin ist. Dazu wurden zunächst Tiere die TGF-β1 auf T-Zellen überexprimieren mit solchen verpaart, die einen dominant negativen TGF-β II Rezeptor auf T-Zellen (hCD2-ΔkTβRII) überexprimieren und somit eine gestörte TGF-β Signalkaskade in T-Zellen haben.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen und OVA-immunisierten hCD2-TGF-β1 x hCD2-ΔkTβRII doppeltransgenen Tieren festgestellt werden (MCh₅₀, WT-OVA, 25,3 ± 2,95 mg/ml vs. dTG-OVA, 29,6 ± 3,62 mg/ml) (Abb. 11).

Da nur regulatorische T-Zellen, die TGF-β1 überexprimieren, einen Schutz vor AHR übertragen konnten, war es von Interesse festzustellen, ob der Schutz durch eine autokrine Wirkung des TGF-β1 auf die regulatorische T-Zelle selbst vermittelt wird

oder durch eine parakrine Wirkung auf Empfängerzellen. Dazu wurden regulatorische T-Zellen aus hCD2- Δ kT β RII x hCD2-TGF- β 1 doppeltransgenen Tieren in OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse transferiert. In diesem Versuch konnte ein Schutz vor AHR beobachtet werden (MCh₅₀, WT-OVA+PBS, 26,31 \pm 2,21 mg/ml vs. WT-OVA+dTG Treg, 74,6 \pm 7,43 mg/ml; p=0,0012) (Abb. 11).

Damit konnte gezeigt werden, dass der Schutz vor AHR durch die Wirkung von TGF- β 1 auf Empfänger T-Zellen vermittelt wird.

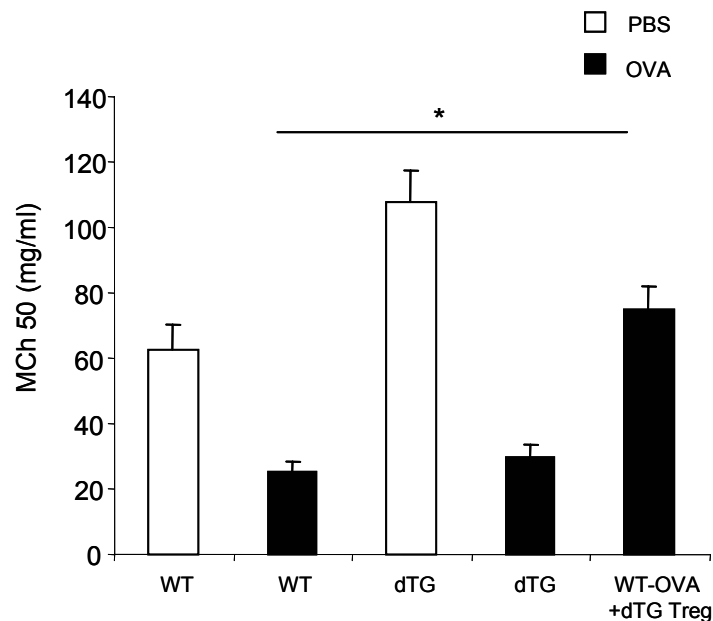


Abb. 11: Der Schutz vor AHR wird T-Zellabhängig vermittelt

Der protektive Effekt von TGF- β 1 überexprimierenden Tieren wurde nur vermittelt, wenn die TGF- β Signalkaskade in Empfänger-T-Zellen nicht gestört war. Tiere die doppeltransgen für die Überexpression eines dominant negativen TGF- β TypII Rezeptors sowie die Überexpression von TGF- β 1 auf T-Zellen waren, zeigten eine ähnlich starke AHR, wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse. Wildtyp-Tiere hingegen, die einen intakten TGF- β Rezeptor hatten und mit Treg aus doppeltransgenen Tieren transferiert wurden, waren geschützt vor AHR (p=0,0012).

3.4. Vermittlung des Schutzes vor AHR in transgenen Tieren durch TGF- β 1 und IL-10

Da regulatorische T-Zellen aus hCD2-TGF- β 1 Tieren auch vermehrt IL-10 produzieren [Schramm, et al., 2004], war es von Interesse zu sehen, ob der Schutz vor AHR nur durch TGF- β 1 vermittelt wird oder ob IL-10 hier auch eine Rolle spielt. Aus diesem Grund wurden IL-10 *knock out* (IL-10^{-/-}) Mäuse zur Untersuchung herangezogen. Mit einem ersten Versuch konnte zunächst reproduziert werden, dass IL-10^{-/-} Mäuse im Vergleich zu wildtyp-Tieren geschützt vor AHR sind [Makela, et al., 2000] (MCh₅₀, IL-10^{-/-} OVA+ PBS 67,85 \pm 6,7 mg/ml vs. WT OVA+ PBS, 26,31 \pm 2,21 mg/ml, p=0,002) (Abb. 12). Damit scheint das Fehlen von systemischem IL-10 protektiv auf die Ausbildung einer AHR zu wirken.

In einem nächsten Schritt wurden Treg aus hCD2-TGF β 1 Mäusen in IL-10^{-/-} Tiere transferiert. Um außerdem das IL-10 von den transferierten Zellen zu neutralisieren, wurde einer Versuchsgruppe zusätzlich ein anti IL-10 Antikörper verabreicht. Der beste Schutz vor AHR konnte bei der Gruppe beobachtet werden, die TGF- β 1 transgene regulatorische T-Zellen und keinen anti IL-10 Antikörper bekommen hatte (MCh₅₀, IL-10^{-/-} OVA+TG Treg, 125 \pm 0 mg/ml vs. IL-10^{-/-} OVA+ PBS, 67,85 \pm 6,7 mg/ml, p=0,0095). Tatsächlich hatten diese Tiere den höchsten MCh₅₀ Wert aller in dieser Arbeit untersuchten Tiere. Die Mäuse, die transgene Treg und einen anti IL-10 Antikörper transferiert bekommen hatten, zeigten einen signifikant schlechteren Schutz vor AHR, verglichen mit der Gruppe ohne Antikörper (MCh₅₀, IL-10^{-/-} OVA+TG Treg AK, 80,5 \pm 5,87 mg/ml vs. IL-10^{-/-} OVA+TG Treg, 125 \pm 0 mg/ml, p=0,0159). Damit scheint eine Co-Expression von IL-10 von hCD2-TGF- β 1 transgenen Treg notwendig zu sein, um vor AHR zu schützen.

Der Einfluss von wildtyp-Treg auf dem IL-10^{-/-} Hintergrund wurde ebenfalls untersucht. Auch hier erhielt eine Gruppe zusätzlich einen anti IL-10 Antikörper. Sowohl die Gruppe mit Antikörper als auch die ohne reagierte ähnlich stark wie untransferierte, OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Mäuse (MCh₅₀, IL-10^{-/-} OVA+PBS, 67,85 \pm 6,7 mg/ml vs. IL-10^{-/-} OVA+ WT Treg, 60,1 \pm 5,31 mg/ml bzw. IL-10^{-/-} OVA+ WT Treg AK, 54,73 \pm 5,53 mg/ml) (Abb. 12).

Zusammengenommen demonstrieren diese Versuche, dass die Abwesenheit von systemischem IL-10, protektiv gegenüber der Ausbildung einer AHR wirkt, dass aber IL-10, welches von regulatorischen T-Zellen produziert wird, diesen Schutz noch verstärkt.

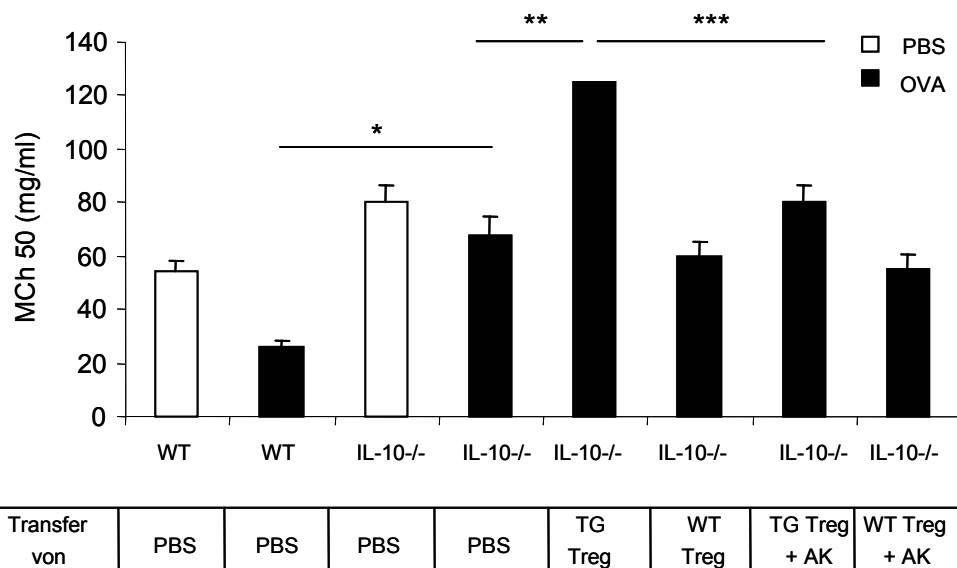


Abb. 12: AHR Messungen bei IL-10^{-/-} Tieren

IL-10^{-/-} Mäuse waren im Vergleich zu wildtyp-Mäusen vor einer AHR geschützt. Dieser Schutz ließ sich durch Transfer von transgenen Treg signifikant verbessern. Transferierte man zusätzlich zu den transgenen Treg einen neutralisierenden IL-10 Antikörper, verschlechterte sich der Schutz signifikant. Mit wildtyp-Treg transferierte IL-10^{-/-} Mäuse waren ähnlich gut vor AHR geschützt wie nicht transferierte IL-10^{-/-} Tiere. Damit schützt die Abwesenheit von systemischem IL-10 vor AHR; IL-10 das von Treg produziert wird verstärkt diesen Schutz (*p=0,002; **p=0,0095; ***p=0,0159).

Um weiter die Zusammenhänge einer IL-10- und TGF-β1-Produktion von regulatorischen T-Zellen, bezogen auf den Schutz vor AHR, aufzuklären, wurden hCD2-TGF-β1 Tiere auf den IL-10^{-/-} Hintergrund gekreuzt, so dass Mäuse entstanden, die nach wie vor TGF-β1 auf T-Zellen überexprimieren, aber nicht mehr in der Lage sind IL-10 zu bilden. Aus diesen Tieren wurden Treg isoliert und in OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse transferiert. In diesen Mäusen konnte kein Schutz vor AHR beobachtet werden (MCh₅₀, WT-OVA, 26,31 ± 2,1 mg/ml vs. WT-OVA+ IL-10^{-/-} x hCD2-TGF-β1 Treg, 28,8 ± 6,8 mg/ml) (Abb. 13). Somit genügt allein die Überexpression von TGF-β1 auf regulatorischen T-Zellen für den Schutz vor AHR nicht; eine IL-10 Expression transgener Treg muss ebenfalls vorhanden sein.

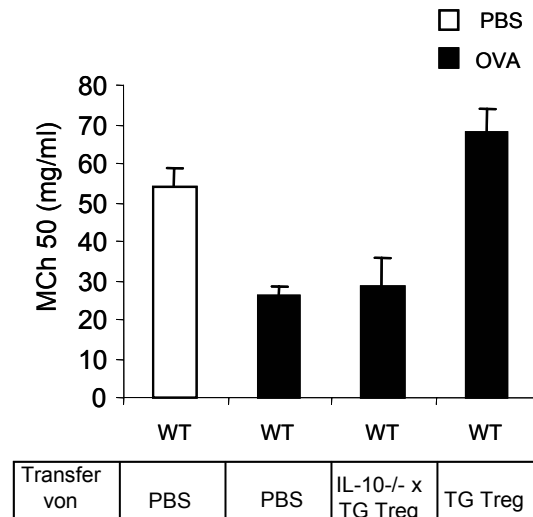


Abb. 13: Transfer von IL-10-/- x hCD2-TGF- β 1 Treg

Treg die TGF- β 1 überexprimieren, aber defizient für IL-10 sind, konnten keinen Schutz vor AHR vermitteln.

3.5. Untersuchungen zur Entzündungsreaktion

Ein weiteres wichtiges Kriterium von Asthma ist eine Gewebsinfiltration der Lunge mit eosinophilen Granulozyten. Diese Eosinophilie wird häufig in Zusammenhang mit der Entstehung von AHR diskutiert weswegen es von großem Interesse war, die Lungen der Versuchstiere histologisch zu untersuchen sowie die Zellzusammensetzung in der BALF zu analysieren.

3.5.1. Entwicklung einer peribronchialen Entzündung sowie einer BALF-Eosinophilie in hCD2-TGF- β 1 Mäusen, unabhängig von einem Schutz vor AHR

Interessanterweise konnte im Gewebe der vor AHR geschützten, OVA-immunisierten hCD2-TGF- β 1 Mäuse ein ähnlich starkes Entzündungsinfiltrat, bestehend aus Eosinophilen und Lymphozyten, gefunden werden, wie in ungeschützten, OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen (% der infiltrierten Lungenfläche: hCD2-TGF- β 1-OVA: $13,9 \pm 1,7$ % vs. WT-OVA+PBS: $10,1 \pm 0,6$ %) (Abb. 14).

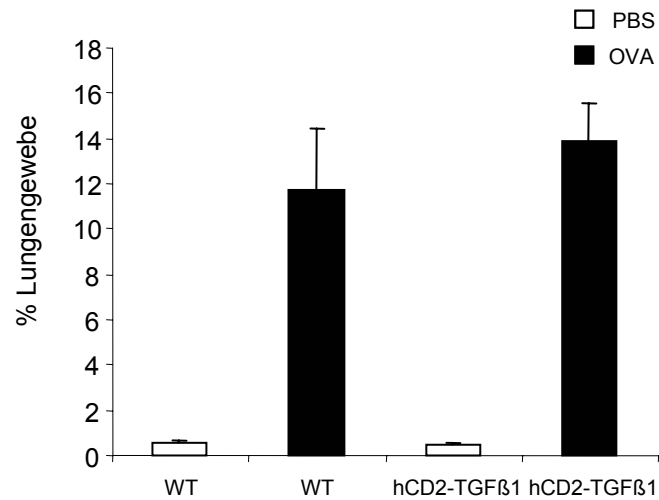


Abb. 14: Peribronchiale Entzündung in wildtyp-Mäusen und hCD2-TGF-β1 Tieren

OVA-Immunierte hCD2-TGF-β1 Mäuse zeigten ähnlich viel Entzündungsinfiltrat wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse.

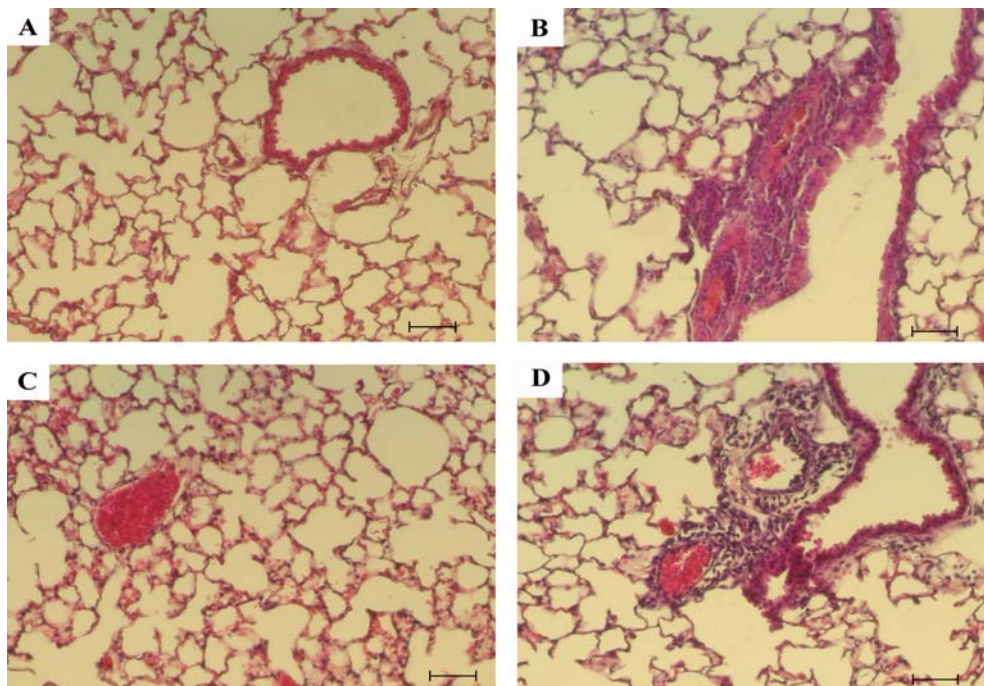


Abb. 15: Entzündung in wildtyp-Mäusen und hCD2-TGF-β1 Tieren.

Repräsentative histologische Schnitte, die H&E gefärbt sind, sind gezeigt: wildtyp-Mäuse (A) und transgene (C) nicht immunisierte Tiere zeigten keine Gewebsinfiltration. Eine Immunisierung mit OVA führte zu einer peribronchialen Infiltration mit Eosinophilen und T-Zellen in wildtyp-Mäusen (B) und transgenen (D) Tieren. Größenbalken repräsentieren eine Länge von 100μm

Weiterhin waren in der BALF von OVA-immunisierten hCD2-TGF- β 1 Tieren ähnlich viele eosinophile Zellen zu finden wie in OVA-immunisierten wildtyp-Tieren (hCD2-TGF- β 1-OVA: $0,41 \pm 0,061 \times 10^6$ Zellen/ ml vs. WT-OVA+PBS: $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml, n. s.). Allerdings wies die Lavage der transgenen Tiere signifikant mehr Makrophagen im Vergleich zu den wildtyp-Tieren auf (hCD2-TGF- β 1-OVA: $0,14 \pm 0,009 \times 10^6$ Zellen/ml vs. WT-OVA+PBS: $0,07 \pm 0,01 \times 10^6$ Zellen/ ml; $p=0,0095$) (Abb. 16).

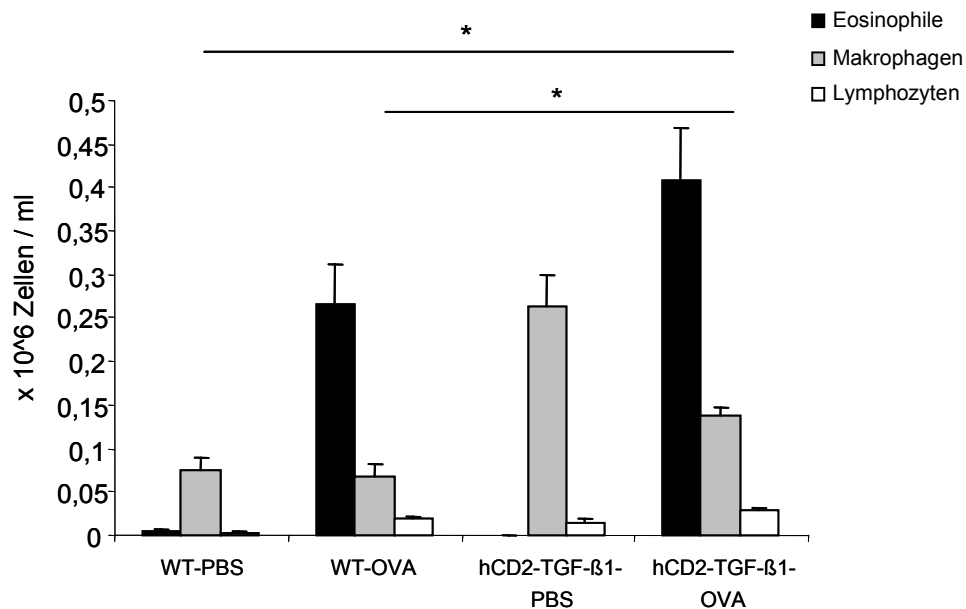


Abb.16: Zellverteilung in der BALF von wildtyp-Tieren und hCD2-TGF- β 1 Mäusen

OVA-immunisierte hCD2-TGF β 1 Mäuse hatten eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen in der BALF, die jedoch im Vergleich zu OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen nicht signifikant höher war. Allerdings fanden sich bei den OVA-immunisierten transgenen Tieren signifikant mehr Makrophagen, als bei OVA-immunisierten und nicht immunisierten wildtyp-Mäusen ($p=0,0286$).

3.5.2. Keine Beeinflussung der peribronchialen Entzündung durch Transfer verschiedener Treg-Populationen

Auch bei den vor AHR geschützten mit hCD2-TGF- β 1 Treg transferierten Tieren konnte eine starke Gewebsinfiltration beobachtet werden (Abb. 17). Die transferierten Mäuse hatten dabei eine signifikant stärkere Gewebsentzündung als nicht transferierte wildtyp-Mäuse (% der infiltrierten Lungenfläche: WT-OVA+TG Treg: $15,7 \pm 2,3$ % vs. WT-OVA+PBS: $10,1 \pm 0,6$ %; $p=0,025$).

Die Tiere, die mit regulatorischen T-Zellen aus wildtyp-Mäusen transferiert worden waren, zeigten eine gleich starke Gewebsentzündung wie nicht transferierte, OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse (% der infiltrierten Lungenfläche: WT-OVA+WT Treg: $10,1 \pm 1,1$ % vs. WT-OVA+PBS: $10,1 \pm 0,6$ %) (Abb. 17).

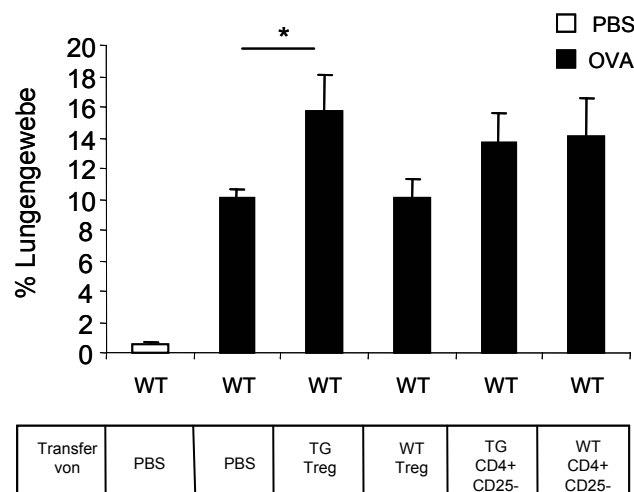


Abb. 17: Peribronchiale Entzündung in zelltransferierten wildtyp-Mäusen

Wildtyp-Mäuse, die Treg aus hCD2-TGF- β 1 transgenen Tieren erhalten hatten, zeigten eine signifikant größere Gewebsinfiltration als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse, obwohl sie vor einer AHR geschützt waren. Tiere, die wildtyp-Treg erhalten hatten, zeigten eine ähnlich starke Gewebsentzündung wie OVA-immunisierte wildtyp-Tiere. Mäuse die transgene oder wildtyp CD4⁺CD25⁻ Zellen erhielten, entwickelten eine stärkere Gewebsentzündung als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse ($p=0,025$).

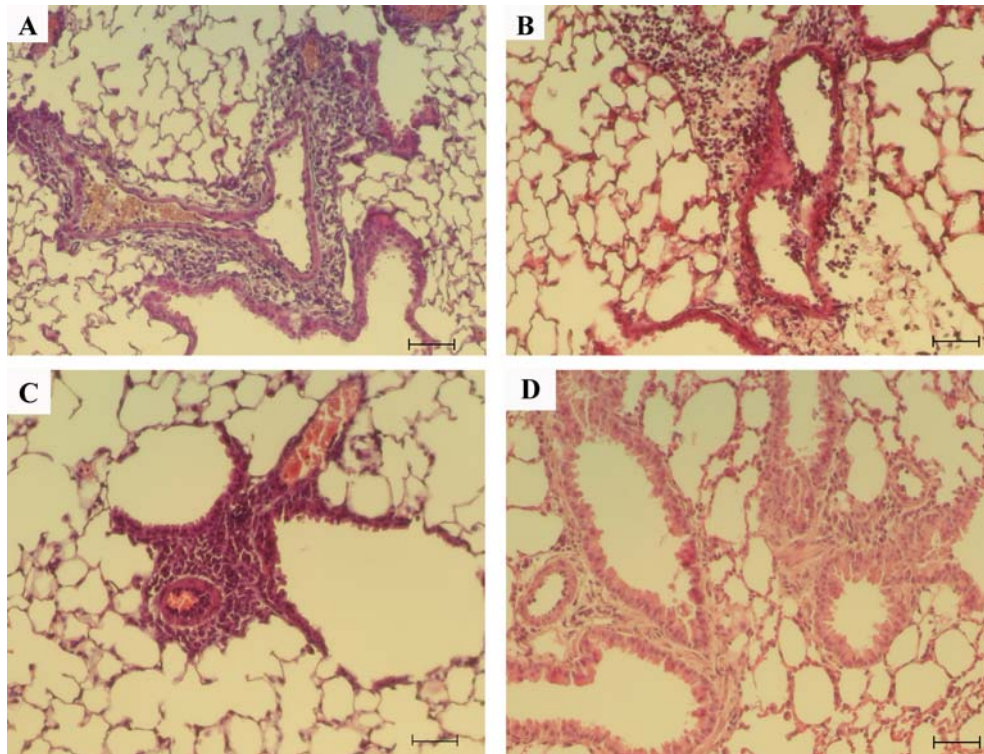


Abb. 18: Effekte von verschiedenen T-Zellpopulationen auf die Entzündung

Repräsentative, histologische Schnitte, die H&E gefärbt sind, sind gezeigt: Sowohl der Transfer von Treg aus wildtyp-Mäusen (A), als auch der Transfer von Treg aus transgenen Tieren (C) führte nicht zu einem Rückgang in der Gewebsentzündung. Tiere die $CD4^+CD25^-$ Zellen aus wildtyp-Mäusen (B) bekommen hatten, zeigten eine massive Gewebsentzündung, ähnlich wie Tiere, die transgene $CD4^+CD25^-$ Zellen erhalten hatten (D). Größenbalken repräsentieren $100\mu\text{m}$

3.5.2.1. Verringerung der BALF-Eosinophilie durch Transfer von wildtyp-Treg

Ähnlich wie bei den hCD2-TGF- β 1-OVA Mäusen waren auch bei den mit transgenen Treg transferierten Tieren die Eosinophilen in der BALF im Vergleich zu den OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen erhöht (WT-OVA+TG Treg: $0,28 \pm 0,06 \times 10^6$ Zellen/ ml vs. WT-OVA+PBS: $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml). Die BALF-Makrophagen waren hier im Vergleich zu den OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen zwar ebenfalls erhöht, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (WT-OVA+TG Treg: $0,12 \pm 0,03 \times 10^6$ Zellen/ ml vs. WT-OVA+PBS: $0,07 \pm 0,01 \times 10^6$ Zellen/ ml) (Abb. 19).

Interessanterweise zeigten wildtyp-Tiere, die wildtyp-Treg erhalten hatten, signifikant weniger Eosinophile in der BALF als nicht transferierte wildtyp-Mäuse (WT-OVA+WT Treg: $0,047 \pm 0,017 \times 10^6$ Zellen/ ml vs. WT-OVA+PBS: $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml; $p=0,0381$) (Abb. 19).

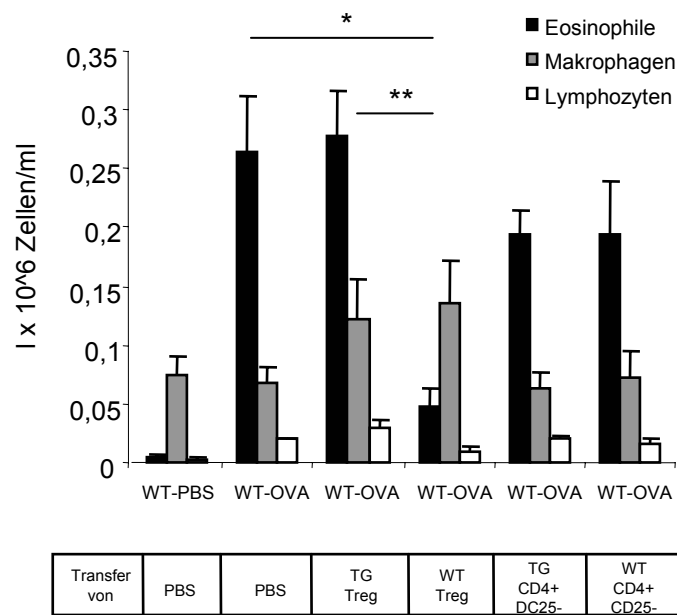


Abb. 19: Leukozytenverteilung in der BALF von zelltransferierten wildtyp-Mäusen

Wildtyp-Tiere, die regulatorische T-Zellen aus wildtyp-Mäusen erhalten hatten, zeigten signifikant weniger Eosinophile in der BALF als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse oder wildtyp-Tiere, die Treg aus hCD2-TGF- β 1 transgenen Tieren erhalten hatten (* $p=0,0381$; ** $p=0,0286$).

3.5.3. Ähnlich starke Entzündung in doppeltransgenen Tieren wie in OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen

Die Gewebsentzündung in hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgenen, OVA-immunisierten Tieren war ähnlich stark wie in OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen (% der infiltrierten Lungenfläche: dTG-OVA: $15,5 \pm 1,8$ %, vs. WT-OVA+PBS: $11,7 \pm 2,7$ %). Interessanterweise hatten wildtyp-Mäuse, die doppeltransgene Treg erhalten hatten, eine signifikant stärkere Gewebsentzündung (% der infiltrierten Lungenfläche: WT+ dTG Treg: $25,1 \pm 2,2$ %, vs. WT-OVA+PBS: $10,1 \pm 0,6$ %; $p=0,0007$) (Abb. 20).

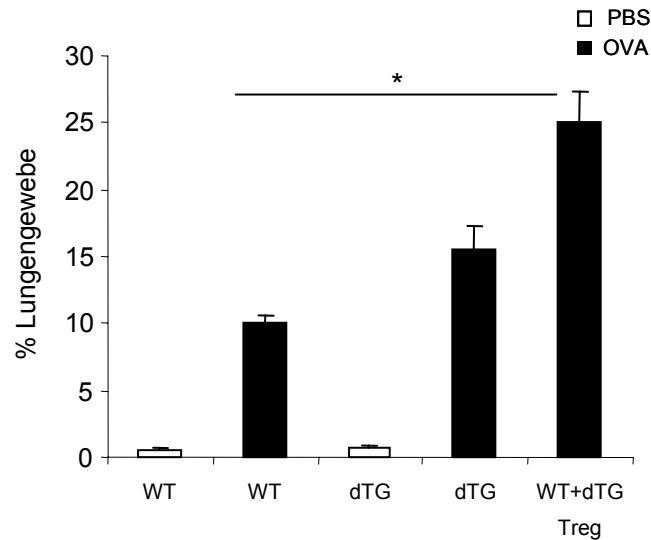


Abb. 20: Peribronchiale Entzündung in doppeltransgenen Tieren

OVA-immunisierte hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgene Tiere hatten eine ähnlich starke Gewebsentzündung wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse. Wildtyp-Tiere die doppeltransgene Treg erhalten hatten, zeigten eine signifikant stärkere Gewebsentzündung als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse ($p=0,0007$).

Die Eosinophilenzahl in der BALF von hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgenen, OVA-immunisierten Tieren war ähnlich hoch, wie in OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen; hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (dTG-OVA: $0,17 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml, vs. WT-OVA+PBS: $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml). Auch die wildtyp-Tiere, die regulatorische T-Zellen von doppeltransgenen Tieren bekommen hatten, wiesen im Vergleich zu OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der BALF-Eosinophilenzahl auf (WT+dTG Treg: $0,22 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml, vs. WT-OVA+PBS: $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$ Zellen/ ml). Bezüglich der Makrophagen und Lymphozyten gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 21).

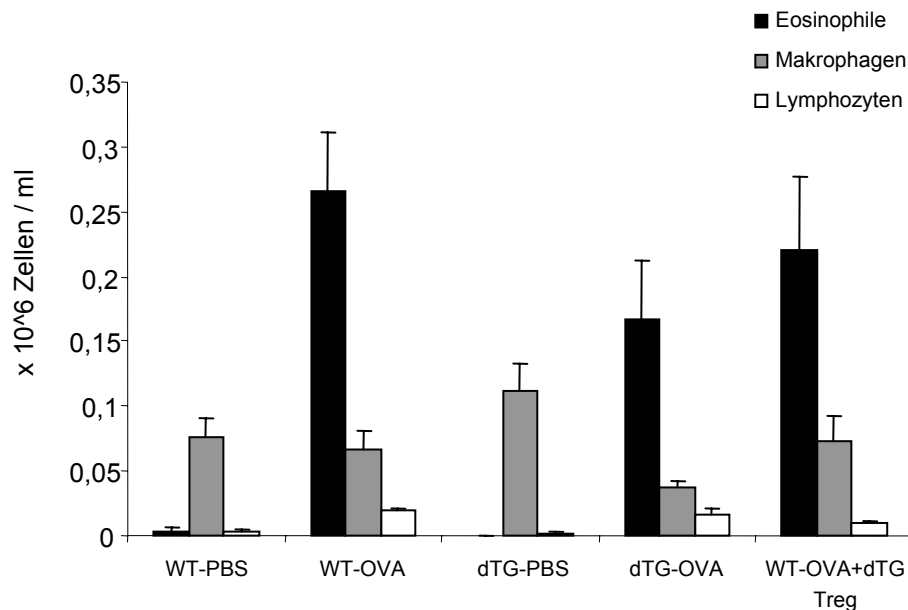


Abb. 21: Leukozytenverteilung in der BALF von doppeltransgenen Tieren

OVA-immunisierte hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgene Tiere zeigten eine ähnliche BALF-Zellzusammensetzung wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse. Auch wildtyp-Mäuse, die regulatorische T-Zellen von doppeltransgenen Tieren erhalten hatten, zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu OVA-immunisierten wildtyp-Tieren.

3.5.4. Verstärkung der peribronchialen Entzündung durch Transfer von transgenen Treg in IL-10^{-/-} Mäuse

Bei den IL-10^{-/-} Tieren hatten die Mäuse die mit hCD2-TGF- β 1 Treg transferiert wurden die stärkste Gewebsentzündung (% der infiltrierten Lungenfläche: IL-10^{-/-}+TG Treg: 41,6 \pm 10,7 %, vs. IL-10^{-/-}-OVA+PBS: 17,3 \pm 2 %; p=0,019). Mäuse, die zu den transgenen Treg noch einen IL-10 Antikörper bekommen hatten, waren zwar weniger entzündet, jedoch nicht statistisch signifikant (% der infiltrierten Lungenfläche: IL-10^{-/-}+TG Treg: 41,6 \pm 10,7 %, vs. IL-10^{-/-}+TGTreg AK: 24,1 \pm 2 %) (Abb. 22). Auch die IL-10^{-/-} Mäuse, die wildtyp-Treg bekommen hatten zeigten zwar eine Reduktion der Gewebsentzündung im Vergleich zu untransferierten IL-10^{-/-} Tieren, jedoch war auch sie nicht signifikant unterschiedlich (% der infiltrierten Lungenfläche: IL-10^{-/-}+WT Treg: 12,6 \pm 2,5 % vs. IL-10^{-/-} OVA+PBS: 17,3 \pm 2 %). Tiere, die zusätzlich zu den WT Treg noch einen anti IL-10 Antikörper bekommen hatten, verhielten sich wie OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Mäuse.

wildtyp-Tiere, die mit Treg aus hCD2-TGF- β 1 x IL-10^{-/-} Tieren erhalten hatten, wiesen eine ähnlich starke Gewebsinfiltration wie OVA-immunisierte wildtyp-Tiere auf

(% der infiltrierten Lungenfläche: WT+hCD2-TGF- β 1 x IL-10^{-/-} Treg: 14,8 \pm 1,6 % vs. WT-OVA+PBS: 11,7 \pm 2,3 %) (Abb. 22).

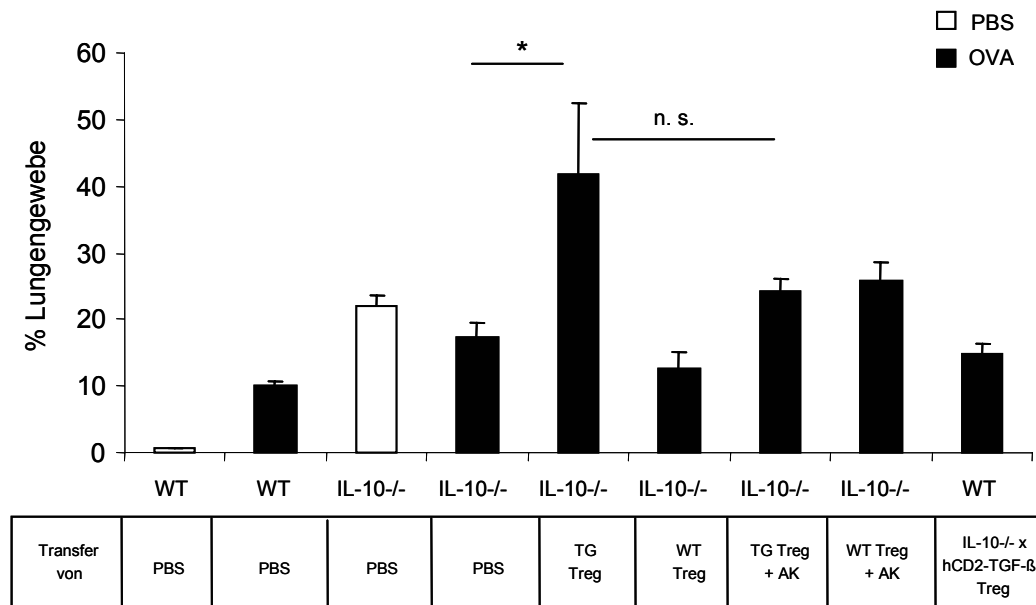


Abb. 22: Peribronchiale Entzündung bei IL-10^{-/-} Mäusen

IL-10^{-/-} Tiere, die hCD2-TGF- β 1 Treg bekommen hatten, zeigten eine signifikant stärkere Gewebsentzündung als OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Mäuse (*p=0,019). Die Tiere, die zusätzlich einen anti IL-10 Antikörper bekommen hatten, zeigten zwar weniger Entzündung, jedoch war sie statistisch nicht signifikant. Alle anderen mit Zellen transferierten IL-10^{-/-} Tiere hatten eine ähnlich starke Entzündung wie nicht transferierte IL-10^{-/-} Mäuse.

3.5.5. Keine wesentliche beeinflussung der BALF-Eosinophilie in IL-10^{-/-} Tieren durch den Transfer verschiedener Treg-Populationen

Bei den IL-10^{-/-} Tieren, die mit regulatorischen T-Zellen mit und ohne anti-IL-10 Antikörper transferiert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede bei Eosinophilen, Makrophagen oder Lymphozyten in der BALF sowohl im Vergleich untereinander, als auch im Vergleich zu OVA-immunisierten IL-10^{-/-} Tieren festgestellt werden. Vergleicht man diese Tiere mit OVA-immunisierten wildtyp-Tieren, welche im Gegensatz zu den IL-10^{-/-} signifikant suszeptibler für eine AHR waren, konnte auch hier für alle drei Zelltypen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 23).

Wildtyp-Mäuse, die regulatorische T-Zellen, die TGF- β 1 überexprimieren, aber IL-10 defizient sind, transferiert bekommen hatten, zeigten im Vergleich zu OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen zwar weniger Eosinophile, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 23).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich BALF-Eosinophilie sowie Gewebsentzündung unabhängig von einer AHR entwickeln können und dass wildtyp-Treg einen Einfluss auf die Eosinophilie zu nehmen scheinen.

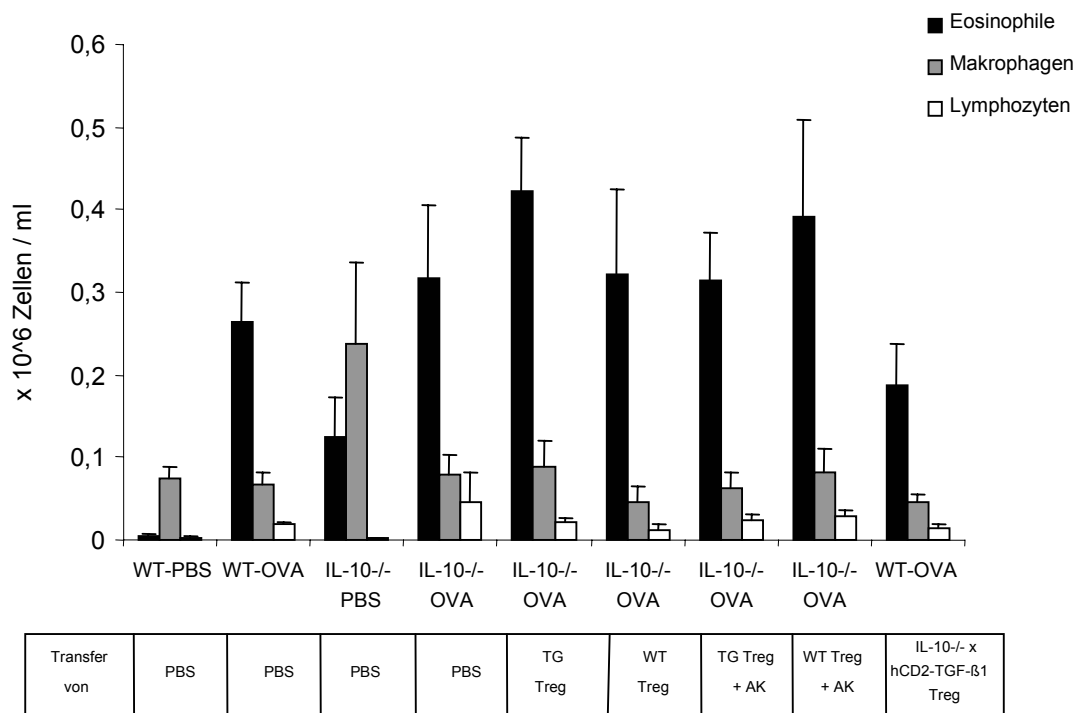


Abb. 23: Leukozytenverteilung in der BALF von IL-10-/- Tieren

Für die einzelnen Leukozytenpopulationen konnten zwischen den OVA-immunisierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.6. IL-13 unabhängiger Schutz vor AHR

Das Zytokin IL-13 wird häufig im Zusammenhang mit der Entwicklung einer AHR diskutiert. So konnten Walter et al. zeigen, dass die Depletion von IL-13 zwar zu einer TH2 vermittelten Entzündung, nicht jedoch zur Entwicklung einer AHR führt [Walter, et al., 2001]. Darum wurde IL-13 in der BALF von allen untersuchten Tieren ermittelt. Sowohl die vor AHR geschützten hCD2-TGF- β 1 Mäuse als, auch die wildtyp-Mäuse, die mit hCD2-TGF- β 1 Treg transferiert wurden, zeigten im Vergleich

zu OVA-immunisierten wildtyp-Tieren ähnlich hohe IL-13 Werte (hCD2-TGF- β 1-OVA: $53,97 \pm 9,61$ pg/ml; bzw. WT-OVA+TG Treg: $52,8 \pm 17,17$ pg/ml vs. WT-OVA+PBS: $45,73 \pm 20,14$ pg/ml) (Abb. 24 A). Tiere die, mit wildtyp-Zellen transferiert wurden, lagen im gleichen Bereich, wobei die Gruppe, die CD4⁺CD25⁻ Zellen erhielt, auffällig hohe IL-13 Werte hatte (WT-OVA+WT CD4⁺CD25⁻: $153,3 \pm 26,1$ pg/ml vs. WT-OVA+PBS: $45,73 \pm 20,14$ pg/ml) (Abb. 24 B).

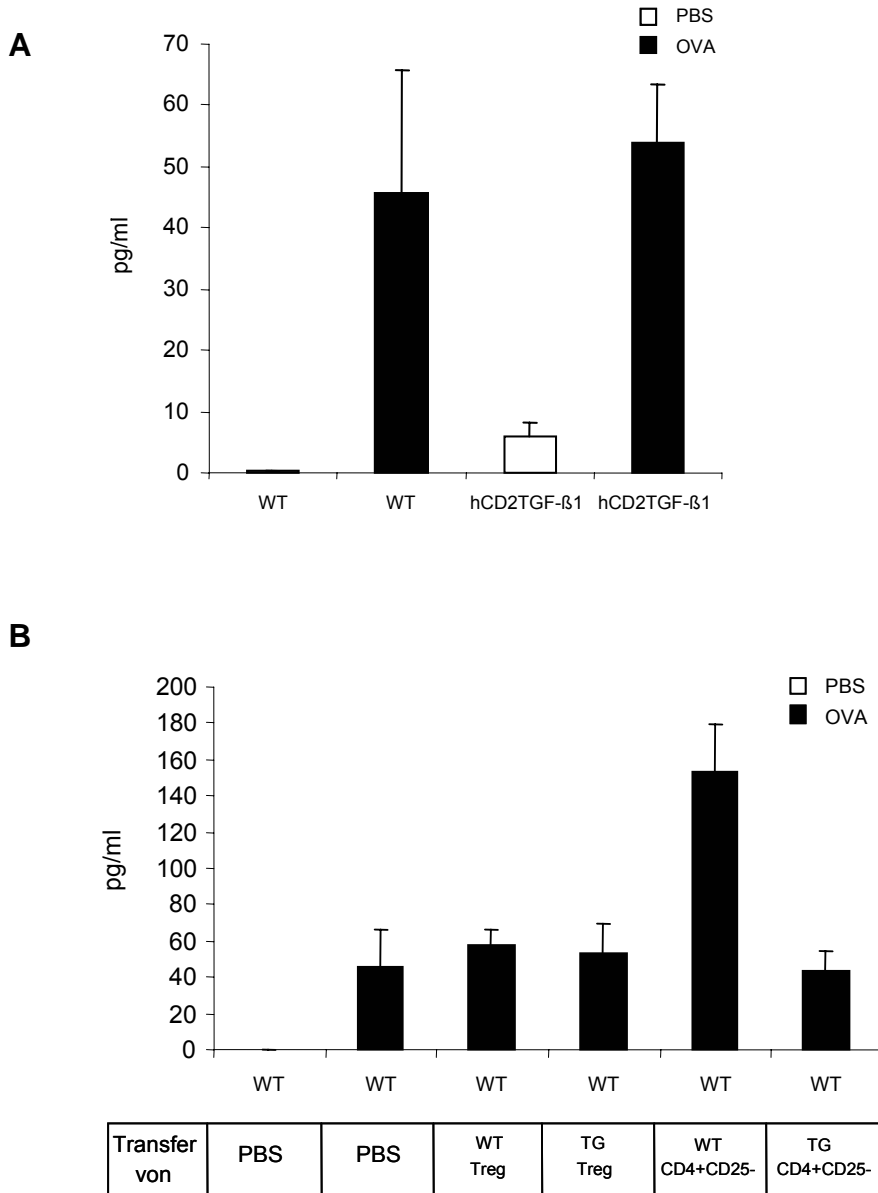


Abb. 24: IL-13-Spiegel in der BALF

Unabhängig von der Entwicklung einer AHR wurden in allen OVA-immunisierten Tieren erhöhte IL-13 Spiegel im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren gefunden. Tiere, die vor AHR geschützt waren, zeigten ähnliche Spiegel, wie ungeschützte Tiere. Ein auffallend hoher Wert konnte in der Gruppe gefunden werden, die mit CD4⁺CD25⁻ Zellen aus wildtyp-Mäusen transferiert wurde.

Bei den hCD2-TGF-β1 x hCD2-ΔkTβRII doppeltransgenen Tieren sowie bei den wildtyp-Mäusen, die regulatorische T-Zellen aus doppeltransgenen Tieren erhalten hatten konnte ebenfalls keine Korrelation von AHR und IL-13 festgestellt werden (Abb. 25). Gleiches gilt für die IL-10^{-/-} Mäuse, die Treg aus wildtyp-Mäusen und hCD2-TGF-β1 Mäusen erhalten hatten (Abb. 26). Zusammenfassend kann gesagt

werden, dass erhöhte IL-13 Werte bei allen entzündeten Tieren gefunden wurden und es somit keine Korrelation mit der AHR gibt.

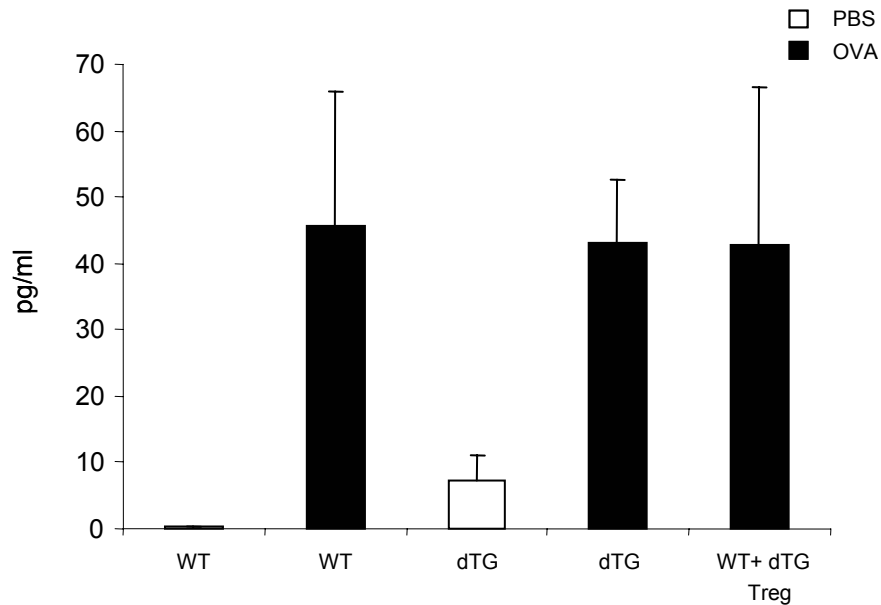


Abb. 25: IL-13-Spiegel in der BALF

OVA-immunisierte hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgene Tiere, sowie wildtyp-Mäuse die doppeltransgene Treg erhalten hatten, zeigten ähnliche IL-13 Konzentrationen in der BALF, wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse. Es konnte auch hier keine Korrelation zwischen AHR und IL-13 Spiegeln in der BALF gefunden werden.

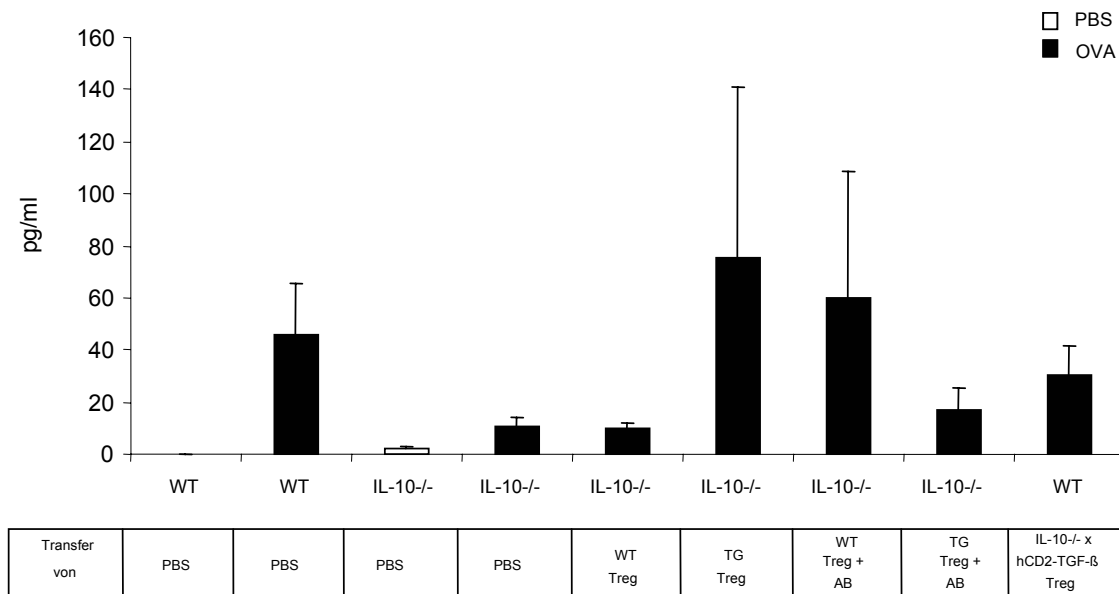


Abb. 26: IL-13-Spiegel in der BALF

Auch bei den IL-10^{-/-} Tieren konnte keine Korrelation von einem Schutz vor AHR und IL-13 in der BALF gefunden werden.

3.7. Korrelation der BALF-Eosinophilie mit erhöhten IL-5 Konzentrationen in der BALF

Das Zytokin IL-5 sorgt für eine gesteigerte Produktion von Eosinophilen im Knochenmark und deren Entsendung in die Zirkulation. Da in nahezu allen OVA-immunisierten Tieren erhöhte Eosinophilenzahlen in der BALF gefunden wurden, wurde die Lavage Flüssigkeit auf die IL-5 Konzentration hin untersucht.

Dabei fiel auf, dass die Tiere, die eine BALF-Eosinophilie hatten, auch erhöhte IL-5 Werte aufwiesen (Abb. 27).

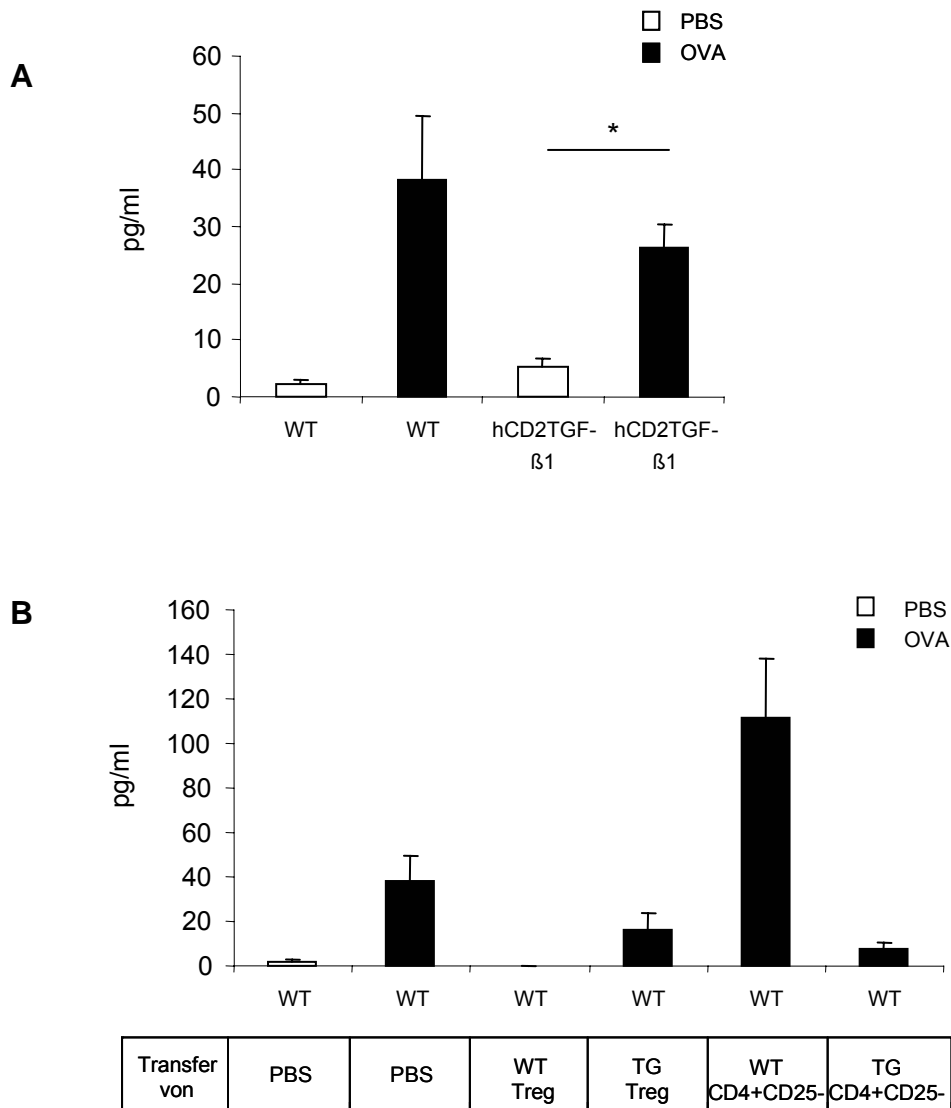


Abb. 27: IL-5-Spiegel in der BALF

(A) OVA-immunisierte hCD2-TGF-β1 transgene Tiere, die keine AHR entwickelten, aber eine Infiltration der Lunge mit Eosinophilen aufwiesen hatten signifikant höhere IL-5-Spiegel, als nicht immunisierte Tiere ($p=0,0159$). (B) Wildtyp-Mäuse, die sowohl mit transgenen Treg, als auch mit CD4⁺CD25⁻ Zellen transferiert wurden, hatten höhere IL-5-Spiegel in der BALF als nicht immunisierte wildtyp-Mäuse. Sehr hohe Konzentrationen fanden sich in der BALF von Tieren, die mit wildtyp CD4⁺CD25⁻ Zellen transferiert wurden. Bei Tieren, die Treg aus wildtyp-Tieren erhalten hatten konnte kein IL-5 in der BALF nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit einer niedrigeren Eosinophilenzahl.

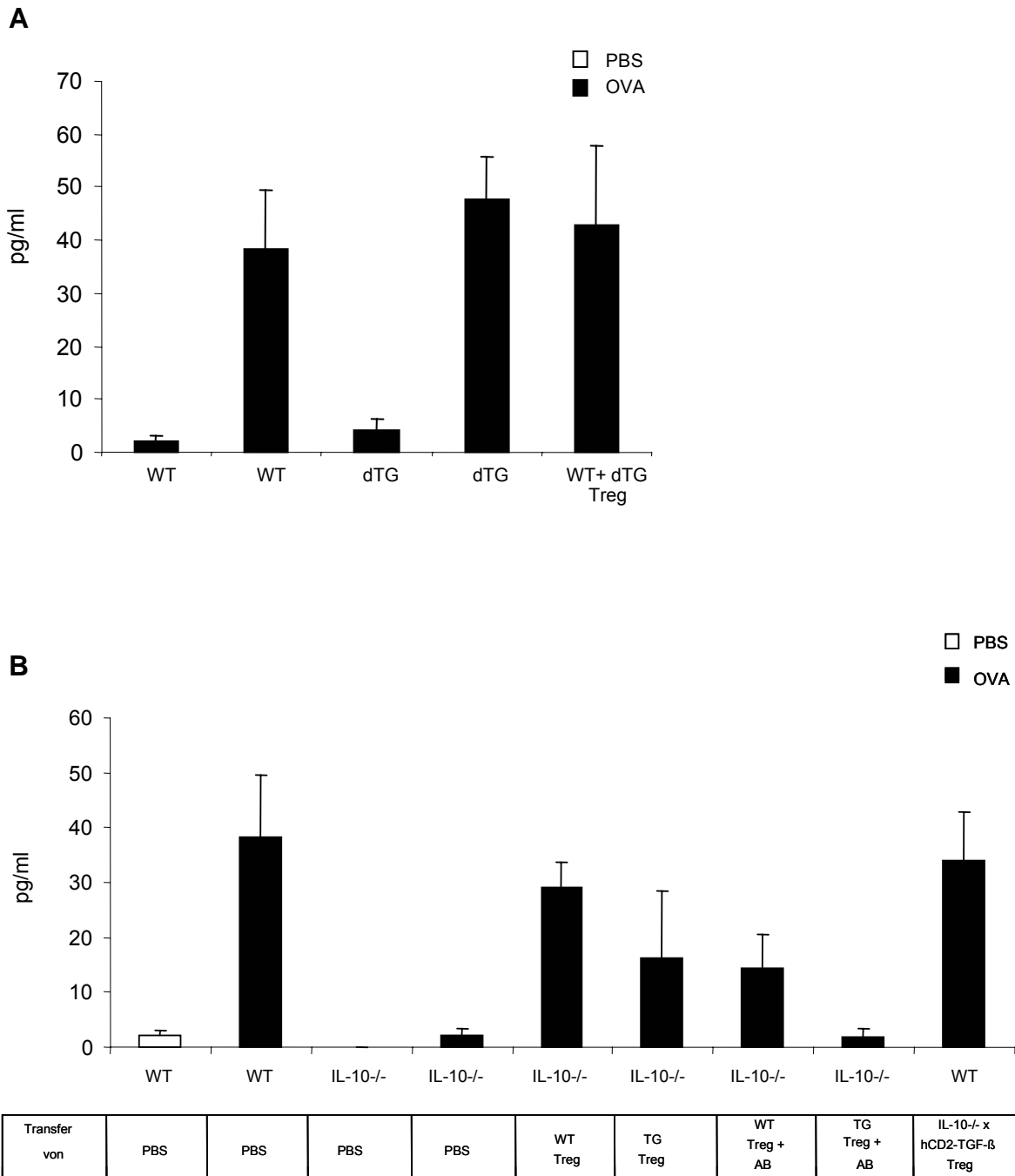


Abb. 28: IL-5-Spiegel in der BALF

(A) Auch OVA-immunisierte hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kt β RII doppeltransgene Tiere hatten erhöhte IL-5 Konzentrationen in der BALF, einhergehend mit einer BALF-Eosinophilie. Wildtyp-Mäuse, die mit doppeltransgenen Treg transferiert wurden und vor AHR geschützt waren, entwickelten eine Entzündung und zeigten ebenfalls erhöhte IL-5-Spiegel. (B) OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Mäuse hatten ähnliche IL-5-Spiegel in der BALF wie nicht immunisierte wildtyp-Mäuse. Gleiches gilt für IL-10^{-/-} Tiere, die mit hCD2-TGF- β 1 Treg und einem anti IL-10 Antikörper behandelt wurden. Alle übrigen IL-10^{-/-} Tiere, die mit Zellen transferiert wurden hatten höhere IL-5 Konzentrationen in der BALF, verglichen mit untransferierten IL-10^{-/-} Mäusen. Wildtyp-Tiere, die TGF- β 1 überexprimierende, aber IL-10 defiziente Treg erhalten hatten, hatten ähnliche IL-5-Spiegel in der BALF wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse.

3.8. Erhöhte TGF- β -Konzentrationen in der BALF durch TGF- β 1 Überexpression auf T-Zellen

Um herauszufinden, ob die Überexpression von TGF- β 1 auf T-Zellen auch zu erhöhten TGF- β Konzentrationen in der BALF führt, wurde die BALF von allen Tieren auf die Konzentrationen von Gesamt-TGF- β untersucht. Schon nicht immunisierte, transgene Tiere zeigten im Vergleich sowohl zu nicht immunisierten, als auch zu OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen signifikant höhere TGF- β Werte (hCD2-TGF- β 1-PBS: $403,83 \pm 31,8$ pg/ml vs. WT-PBS+PBS: $24,62 \pm 4,12$ pg/ml; $p=0,0002$ bzw. WT-OVA+PBS: $54,3 \pm 20,02$ pg/ml; $p<0,0001$). Die Konzentration steigerte sich noch deutlich in OVA-immunisierten transgenen Mäusen (hCD2-TGF- β 1-OVA: $1153,35 \pm 173,23$ pg/ml vs. hCD2-TGF- β 1-PBS: $403,83 \pm 31,8$ pg/ml; $p=0,0012$) (Abb. 29 A). Interessanterweise konnten ähnlich hohe TGF- β 1 Konzentrationen auch in wildtyp-Mäusen beobachtet werden, die mit hCD2-TGF- β 1 regulatorischen T-Zellen transferiert worden waren (hCD2-TGF- β 1-OVA: $1153,35 \pm 173,23$ pg/ml vs. WT+hCD2-TGF- β 1 Treg: $1254,57 \pm 191,55$ pg/ml). Auch der Transfer von transgenen CD4⁺CD25⁻ Zellen sorgte für höhere TGF- β Werte in der BALF (WT+hCD2-TGF- β CD4⁺CD25⁻: $791,13 \pm 99,3$ pg/ml vs. WT+hCD2-TGF- β 1 Treg: $1254,57 \pm 191,55$ pg/ml) (Abb. 29 B). Diese Tiere waren jedoch nicht vor AHR geschützt. Damit zeigen diese Daten, dass die TGF- β Spiegel in der BALF nicht mit dem Schutz vor AHR korrelieren.

Wildtyp-Tiere die regulatorische T-Zellen aus wildtyp-Mäusen bekommen hatten, hatten ähnlich hohe TGF- β Konzentrationen wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse (WT+WT Treg: $56,91 \pm 9,82$ pg/ml vs. WT-OVA+PBS: $54,3 \pm 20,02$ pg/ml). In wildtyp-Mäusen die CD4⁺CD25⁻ Zellen aus wildtyp-Tieren erhalten hatten, waren die TGF- β Werte im Vergleich zu den mit wildtyp-Treg transferierten Tieren zwar signifikant höher, jedoch lagen sie deutlich niedriger als bei den Tieren, die mit transgenen Zellen transferiert wurden (WT+WT CD4⁺CD25⁻ : $101,93 \pm 15,4$ pg/ml vs. WT+hCD2-TGF- β 1 CD4⁺CD25⁻ : $791,13 \pm 99,3$ pg/ml; $p=0,0002$) (Abb. 29 B).

Auch in hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgenen Tieren konnten im Vergleich zu wildtyp-Mäusen signifikant höhere TGF- β Konzentrationen in der BALF gefunden werden (dTG-OVA: $1184,98 \pm 225,6$ pg/ml vs. WT-OVA+PBS: $54,3 \pm 20,02$ pg/ml; $p=0,0006$). Schon nicht immunisierte doppeltransgene Mäuse hatten signifikant höhere Werte, als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse (dTG-PBS: $308,58 \pm 27,1$ pg/ml vs. WT-OVA+PBS: $54,3 \pm 20,02$ pg/ml; $p=0,0003$) (Abb. 30 A).

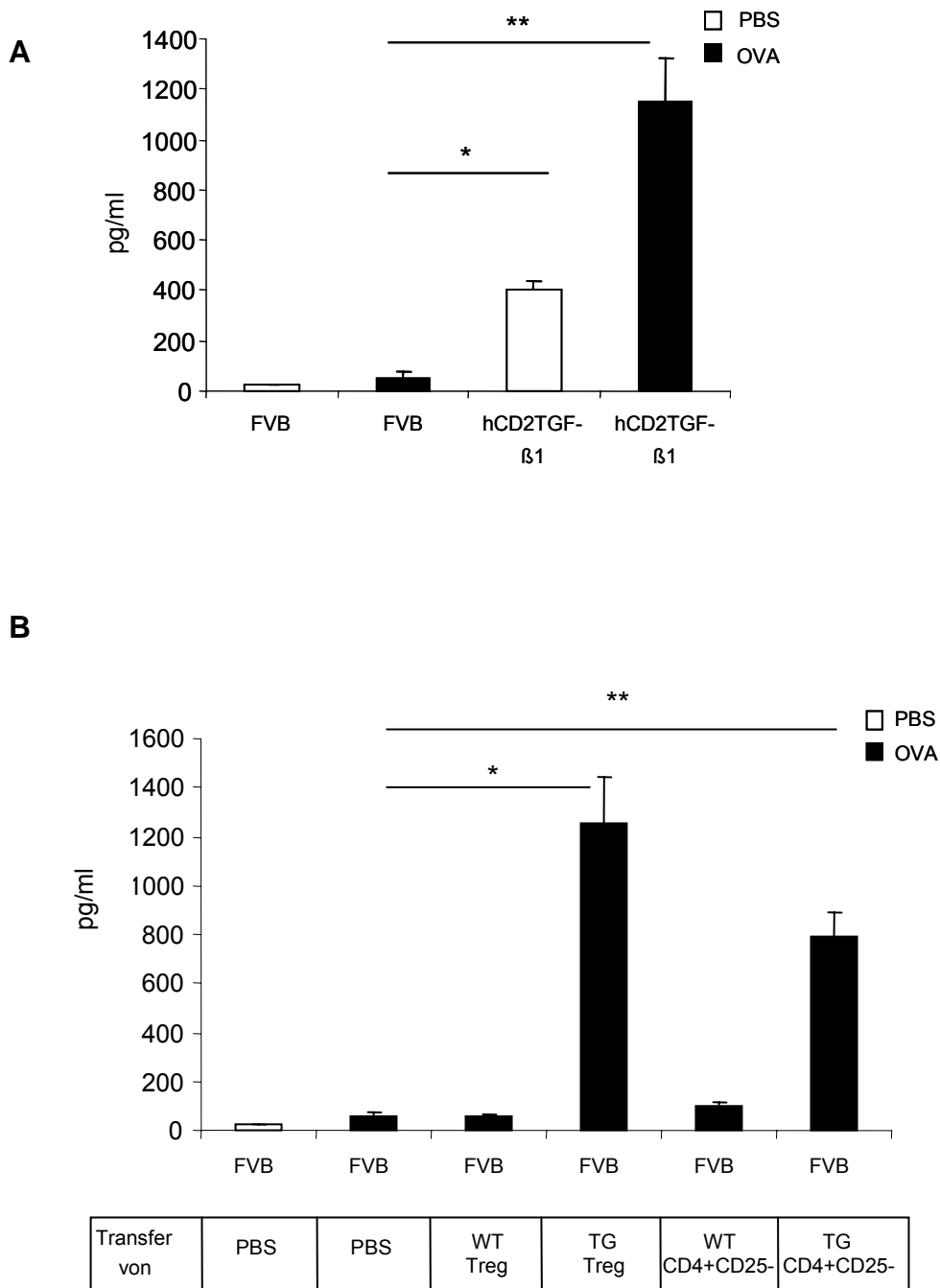


Abb. 29: Gesamt TGF-β-Spiegel in der BALF

Konzentrationen von gesamt TGF-β in der BALF von wildtyp-Mäusen, hCD2-TGF-β1 transgenen und mit unterschiedlichen T-Zellpopulationen transferierten Tieren (*p<0,0001; **p=0,0012). (A) Sowohl OVA-immunisierte, als auch nicht immunisierte hCD2-TGF-β1 Mäuse zeigten im Vergleich zu wildtyp-Mäusen signifikant höhere TGF-β Konzentrationen in der BALF. (B) Wildtyp-Tiere, die transgene T-Zellen transferiert bekommen hatten, zeigten signifikant höhere TGF-β Werte, als mit wildtyp-T-Zellen transferierte Tiere (*p=0,0007; **p=0,0002).

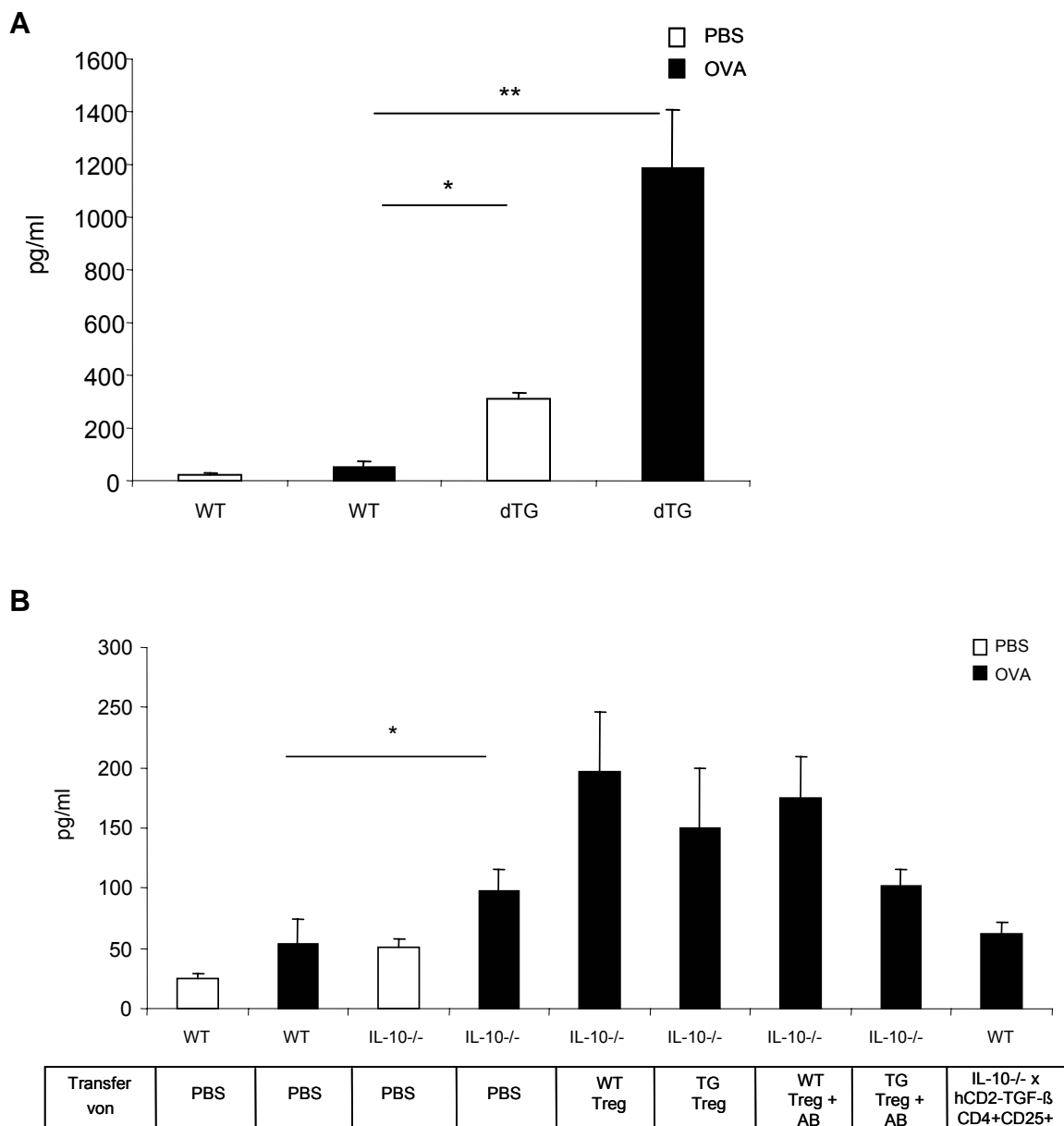


Abb. 30: Gesamt TGF-β-Spiegel in der BALF

Gesamt TGF-β-Spiegel in der BALF von hCD2-TGF-β1 x hCD2-ΔkTβRII doppeltransgenen, IL-10^{-/-} Tieren, die mit verschiedenen Zellpopulationen transferiert wurden, sowie wildtyp-Tieren, die verschiedene Treg bekommen hatten. (A) Bereits nicht immunisierte doppeltransgene Tiere hatten signifikant mehr Gesamt TGF-β in der BALF als OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse. OVA-immunisierte doppeltransgene Tiere hatten nochmals signifikant höhere TGF-β Konzentrationen als nicht immunisierte Tiere (*p=0,0003; **p=0,0006). (B) OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Mäuse hatten höhere TGF-β Konzentrationen in der BALF als OVA-immunisierte wildtyp-Tiere (*p=0,0293). Alle IL-10^{-/-} Tiere, die mit Zellen transferiert wurden hatten ähnlich hohe TGF-β Spiegel in der BALF wie OVA-immunisierte IL-10^{-/-} Tiere. Wildtyp-Mäuse, die TGF-β überexprimierende, aber IL-10 defiziente Treg bekommen hatten zeigten ähnliche TGF-β Konzentrationen in der BALF wie OVA-immunisierte wildtyp-Mäuse.

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnten einige neue Einblicke in die Wirkungsweise von regulatorischen T-Zellen auf die Pathogenese des Asthmas in einem *murinen* Modell gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- β 1 auf T-Zellen in transgenen Mäusen zu einem Schutz vor AHR, nicht aber zu einem Rückgang der Entzündung führt. Dieser Schutz vor AHR ließ sich durch Transfer von regulatorischen T-Zellen aus TGF- β 1 überexprimierenden Tieren auf wildtyp-Tiere übertragen. Auch diese Tiere entwickelten eine peribronchiale Entzündung. Mit der CD4⁺CD25⁻ Population aus den transgenen Tieren ließ sich kein Schutz vor AHR übertragen, obwohl auch hier die Empfängertiere hohe TGF- β 1 Konzentrationen in der BALF hatten. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass der Schutz zum einen durch die Wirkung von TGF- β 1 auf T-Zellen im Empfängertier vermittelt wird; zum anderen wurde gezeigt, dass neben der Überexpression von TGF- β 1 auch IL-10 von den Treg co-exprimiert werden muss, um einen Schutz vor AHR zu vermitteln.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener T-Zell Populationen auf AHR und Entzündung in einem *murinen* Asthmodell untersucht. Dazu wurden zunächst Treg aus OVA-immunisierten wildtyp-Mäusen in Empfänger-wildtyp-Mäuse transferiert. Wie schon von anderen berichtet, [Hadeiba, et al., 2003, Jaffar, et al., 2004] konnte auch in der vorliegenden Arbeit kein Effekt der transferierten, natürlichen Treg auf die AHR beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine andere Suppressor T-Zell-Population AHR reguliert. Aus diesem Grund wurden Mäuse mit in die Untersuchungen einbezogen, die das immunmodulatorische Zytokin TGF- β 1 auf T-Zellen überexprimieren. Tatsächlich waren diese transgenen Tiere vor einer AHR geschützt. Um weiter herauszufinden, wie dieser Schutz vermittelt wird, wurden auch aus diesen Tieren Treg isoliert und in Empfänger-wildtyp-Mäuse transferiert. Im Gegensatz zu den mit den wildtyp-Treg transferierten Tieren, waren diese Mäuse vor einer AHR geschützt. Der Transfer von CD4⁺CD25⁻ transgenen Zellen konnte keinen Schutz vermitteln, obwohl auch diese Zellen TGF- β 1 überexprimierten. Damit konnte für das benutzte Modell gezeigt werden, dass nur TGF- β 1 produzierende Treg die Ausbildung einer AHR verhindern.

Um näheres über die Wirkung des TGF- β 1 in dem hier verwendeten Modell herauszufinden, wurden zunächst hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgene Tiere untersucht, die zum einen TGF- β 1 auf T-Zellen überexprimieren, zum anderen aber auch eine unterbrochene TGF- β Signalkaskade in T-Zellen aufweisen. Diese doppeltransgenen Mäuse verhielten sich ähnlich wie wildtyp-Tiere und ein Schutz vor AHR in antigenspezifisch immunisierten Tieren konnte nicht festgestellt werden. Zusammen mit den Experimenten von Schramm et al. die zeigen, dass Mäuse mit einer gestörten TGF- β Signalkaskade suszeptibler für die Entwicklung einer AHR als wildtyp-Mäuse sind [Schramm, et al., 2003], war dies der erste Hinweis dafür, dass zur Protektion vor Hyperreagibilität ein intakter TGF- β Signalweg in T-Zellen vorhanden sein muss. Um dies weiter aufzuklären, wurden Treg aus hCD2-TGF- β 1 x hCD2- Δ kT β RII doppeltransgenen Tieren in wildtyp-Mäuse transferiert. Diese waren wiederum in der Lage einen Schutz vor AHR zu vermitteln. Da wildtyp-Tiere einen intakten TGF- β Rezeptor haben, spricht alles dafür, dass der Schutz vor AHR in diesem Modell über eine TGF- β 1 abhängige Interaktion zwischen Treg und Empfänger-T-Zellen vermittelt wird.

Es wurde bereits gezeigt, dass die tracheale Applikation von TGF- β zu einem Schutz vor AHR und einem Entzündungsrückgang führt [Fu, et al., 2006b]. Daher sollte festgestellt werden, ob auch im benutzten Modell eine hohe TGF- β 1 Konzentration alleine in der BALF ausreicht, einen Schutz vor AHR zu vermitteln, oder ob der Schutz nur durch eine Expression von TGF- β 1 durch Treg zu Stande kommt. Wildtyp-Tiere, die transgene Treg bekamen und vor AHR geschützt waren, wiesen im Vergleich zu ungeschützten wildtyp-Mäusen, hohe TGF- β 1 Konzentrationen in der BALF auf. Wildtyp-Tiere, die transgene CD4⁺CD25⁻ Treg bekamen, hatten ähnlich hohe TGF- β 1 BALF Konzentrationen wie transgene Tiere, waren jedoch nicht vor AHR geschützt. Damit reicht die alleinige Anwesenheit von TGF- β 1 in der BALF nicht aus, um einen Schutz vor AHR zu übermitteln; vielmehr sind die TGF- β 1 überexprimierenden regulatorischen T-Zellen dafür verantwortlich.

Da die in dieser Arbeit verwendeten hCD2-TGF- β 1 regulatorischen T-Zellen auch verstärkt IL-10 exprimieren und IL-10 in Zusammenhang mit einem Schutz vor AHR häufig diskutiert ist [Fu, et al., 2006a, Kearley, et al., 2005, Makela, et al., 2000], wurde der Einfluss von IL-10 ebenfalls näher untersucht. In Übereinstimmung mit den Befunden Anderer, [Ameredes, et al., 2005, Makela, et al., 2000] konnte hier anhand

von IL-10^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass die Abwesenheit von systemischem IL-10 zu einem Schutz vor AHR führt. Der protektive Effekt durch das Fehlen von systemischem IL-10 ist wahrscheinlich durch eine erhöhte Stickoxid (NO) Produktion in IL-10^{-/-} Mäusen bedingt [Ameredes, et al., 2005]. Tatsächlich wirkt Stickoxid relaxierend auf glatte Atemwegsmuskeln [Gruetter, et al., 1989], und an Asthmapatienten konnte gezeigt werden, dass NO Inhalation protektiv auf die Ausbildung einer AHR wirkt [Hogman, et al., 1993].

Weiterhin konnte der Schutz vor AHR in IL-10 *knock out* Tieren durch Transfer von hCD2-TGF- β 1 transgenen Treg so stark verbessert werden, dass die Auslösung einer AHR selbst mit der höchsten MCh Konzentration nicht mehr möglich war. Wurde zusätzlich zu den transgenen Zellen noch ein neutralisierender IL-10 Antikörper injiziert, führte dies wieder zu einer Verschlechterung der Protektion vor AHR. Der schützende Effekt blieb sogar ganz aus, wenn Treg aus IL-10 defizienten, TGF- β 1 überexprimierenden Tieren in wildtyp-Mäuse transferiert wurden. Dies spricht dafür, dass zwar das Fehlen von systemischem IL-10 den Schutz vor AHR begünstigt, die Co-Expression von IL-10 durch hCD2-TGF- β 1 transgene Treg aber notwendig ist, um vor AHR zu schützen. In weiteren Versuchen wäre es sicher lohnend zu sehen, ob die IL-10 *knock out* Tiere, die mit hCD2-TGF- β 1 Treg transferiert wurden noch höhere NO-Konzentrationen aufweisen, als IL-10^{-/-} Tiere, um zu herauszufinden, ob auch hier NO eine Rolle bei der Protektion spielt. Besonders deutlich wird durch die durchgeführten Versuche jedoch, dass bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Zytokine auf die AHR unbedingt zwischen systemischem und lokalem Vorliegen unterschieden werden muss. Für die periphere Toleranz konnte bereits gezeigt werden, dass IL-10 Expression von Suppressor-T-Zellen essenziell ist. Vor allem in der Sensibilisierungstherapie gegen Pollen scheinen antigenspezifische, IL-10 produzierende Suppressorzellen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung einer allergischen Reaktion zu spielen [Francis, et al., 2003].

Auch die Entzündung, ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Asthma, wurde untersucht. Eine Milderung der Entzündung konnte in der vorliegenden Arbeit an den wildtyp-Tieren beobachtet werden, die wildtyp-Treg bekommen hatten. Diese Mäuse, zeigten einen signifikanten Rückgang in der BALF-Eosinophilenzahl im Vergleich zu OVA-immunisierten Wildtyp-Mäusen. Bezogen auf die infiltrierte Gewebsfläche

konnten allerdings keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Eventuell könnte auch ein Rückgang in der infiltrierten Gewebsfläche beobachtet werden, wenn mehr wildtyp-Treg transferiert würden; die Anzahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen war möglicherweise nicht ausreichend, um einen Effekt auf das Entzündete Gewebe festzustellen. Auch Hadeiba et al. haben einen positiven Einfluss von natürlichen Treg auf die Entzündung, nicht jedoch auf die AHR gefunden [Hadeiba, et al., 2003].

Interessanterweise konnte auch in den vor AHR geschützten hCD2-TGF- β 1 transgenen, sowie in den wildtyp-Mäusen, die hCD2TGF- β 1 transgene Treg erhalten hatten, sowohl eine BALF Eosinophilie, als auch eine peribronchiale Entzündung festgestellt werden. Hansen et al. konnten im Gegensatz dazu einen Schutz vor AHR und Entzündung durch den Transfer von antigenspezifischen, TGF- β überexprimierenden CD4⁺ Zellen in einem Asthmodell zeigen [Hansen, et al., 2000]. Das Ausbleiben eines Effekts auf die Entzündung, in der vorliegenden Arbeit kann verschiedene Gründe haben. TGF- β gilt nicht nur als anti-inflammatorisches Zytokin, auch pro-inflammatorische Eigenschaften, wie Chemotaxis auf Eosinophile, sind bekannt [Brandes, et al., 1991, Kumar, et al., 2004, Luttmann, et al., 1998, Olsson, et al., 2001]. Weiterhin wurden in der BALF von Asthma Patienten ebenfalls erhöhte TGF- β -Spiegel gefunden [Kokturk, et al., 2003, Minshall, et al., 1997], was dem Zytokin im Zusammenhang mit Asthma, neben den im Tierversuch beobachteten protektiven Eigenschaften, auch eine pathogenetische Rolle zukommen lässt. Anders als in der vorliegenden Arbeit, haben Hansen et al. sämtliche CD4⁺ Zellen transferiert. Daher wäre es denkbar, dass Hansen et al. einen Entzündungsrückgang beobachtet haben, der von einer anderen CD4⁺ Population als TGF- β produzierenden Treg vermittelt wurde. In den letzten Jahren gibt es, wie bereits erwähnt, immer deutlichere Hinweise dafür, dass verschiedene T-Zellpopulationen an der Pathogenese des Asthmas beteiligt sind [Akdis, et al., 2005a, Shi, et al., 2005].

Oh et al. konnten einen Rückgang von AHR und Eosinophilie durch Transfer von IL-10 überexprimierenden, OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen zeigen [Oh, et al., 2002]. In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen konnte nur ein protektiver Effekt von IL-10 auf die AHR beobachtet werden. Ein Rückgang der BALF-Eosinophilie oder der peribronchialen Entzündung wurde nicht festgestellt. Möglicherweise hängt dies mit der gleichzeitigen Überexpression von TGF- β

zusammen, welches wie bereits beschrieben, auch eine pro-inflammatorische Wirkung hat. Des Weiteren könnte für den Rückgang der Entzündung auch bei Oh et al., ähnlich wie bei Hansen et al. [Hansen, et al., 2000], eine andere T-Zellpopulation als IL-10 transgene-Treg verantwortlich sein, da auch Oh et al. sämtliche CD4⁺ Zellen transferiert hatten.

Verschiedene Gruppen konnten auch einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von IL-10 in der Lunge und einem Schutz vor AHR und Entzündung finden, was im Widerspruch zu den bereits beschriebenen Versuchen mit IL-10^{-/-} Tieren zu stehen scheint [Makela, et al., 2000]. In den meisten Versuchen, durch die ein protektiver Effekt durch IL-10 festgestellt wurde, wurde ein Plasmid oder Virus als Vektor für die Applikation des Zytokins in der Lunge benutzt [Fu, et al., 2006a, Fu, et al., 2006b, Nakagome, et al., 2005]. Wie es zu dieser Diskrepanz zwischen dem Schutz sowohl durch Fehlen von systemischem IL-10, als auch durch die Überexpression von IL-10 in der Lunge kommt, bleibt vorerst unverstanden. Der Beobachtete Effekt durch die Applikation mit Plasmiden führt eventuell zu einer so starken Überexpression von IL-10 in der Lunge, dass eine Wirkung auf AHR und/oder Entzündung zwar beobachtet werden kann, jedoch ist es schwer einzuschätzen, wie aussagekräftig Versuche dieser Art, bezogen auf die Mechanismen der Zytokinwirkung sein können: Der massive Überschuss an einem anti-inflammatorischen Zytokin wird sich wohl meistens protektiv auswirken. Ausserdem ist das Zytokin so in der gesamten Lunge vorhanden, und es kann nicht mehr unterschieden werden, ob es ubiquitär vorkommen muss, um zu wirken, oder eventuell die Produktion durch einen bestimmten Zelltyp erfolgen muss.

Joetham et al. [Joetham, et al., 2007] untersuchten die Kombination einer Wirkung von TGF- β und IL-10 auf AHR und Entzündung. Sie konnten zeigen dass eine alleinige tracheale Gabe von 200 μ g TGF- β oder IL-10 keine Auswirkungen auf AHR und Entzündung hatten, wohingegen bei gleichzeitiger Gabe von IL-10 und TGF- β ein Schutz beobachtet wurde. Ein Schutz konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn antigenunspezifische, natürliche Lungen Treg, die ebenfalls TGF- β und IL-10 bilden, tracheal appliziert wurden. Ein Schutz mit antigenunspezifischen, natürlichen Lungen Treg aus IL-10^{-/-} Mäusen konnte nur dann erreicht werden, wenn die Treg vor Transfer mit rekombinantem IL-10 inkubiert wurden, was in einer gesteigerten TGF- β Expression dieser Zellen resultierte. Diese Publikation schlägt also einen antigenunabhängigen Schutz von Treg vor, der von IL-10 und TGF- β abhängt. Dabei

müssen beide Zytokine aber nicht zwangsläufig von den Treg gebildet werden. Auch hier wird eine bestimmte Treg-Population betrachtet, die wie es scheint antigenunspezifisch Einfluss auf AHR und Entzündung nimmt. Den beobachteten Einfluss der trachealen Applikation von hohen Dosen von TGF- β und IL-10 auf Entzündung und AHR sollte man allerdings wieder unter den oben erwähnten Gesichtspunkten betrachten: Es verwundert nicht einen protektiven Effekt durch sehr hohe Dosen an antiinflammatorischen Zytokinen zu beobachten, jedoch ist fraglich, ob eine Kombination von IL-10 und TGF- β in physiologischen Konzentrationen immer noch einen Effekt machte. Viel eher scheint auch bei diesen Versuchen im Vordergrund zu stehen, dass die Treg IL-10 und TGF- β produzieren und damit Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen.

Zur Untersuchung von allen Zytokinen sollte daher nicht die Frage, ob deren bloße An- oder Abwesenheit einen Effekt auf die Pathogenese des Asthmas macht, im Vordergrund stehen, sondern vielmehr welcher Zelltyp sezerniert sie und wie wirkt sich dies auf AHR und Entzündung aus?

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass AHR und Entzündung getrennt voneinander reguliert werden. Auch im Mensch lässt sich beobachten, dass eine von Eosinophilen geprägte Entzündung der Atemwege nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer AHR führen muss. Das Krankheitsbild der eosinophilen Bronchitis ist geprägt von einer Infiltration der Lunge mit eosinophilen Granulozyten, chronischem Husten und dem Fehlen einer AHR [Agarwal, et al., 2006, Scott, et al., 2006]. In Langzeitstudien konnte festgestellt werden, dass nur sehr wenige dieser Patienten eine AHR, sprich Asthma entwickeln; bei den meisten blieb die Entzündung ohne Bronchokonstriktion bestehen [Berry, et al., 2005]. Dies ist ein klares Indiz dafür, dass Eosinophile Granulozyten nicht zwangsläufig eine AHR auslösen müssen. Auch andere Gruppen haben in Tiermodellen eine Entkopplung von Entzündung und AHR beobachtet [Kobayashi, et al., 2003, Makela, et al., 2000, Walter, et al., 2001], was immer vom vorliegenden Zytokinmilieu abhing.

Die erhöhte Anzahl an Eosinophilen in der BALF der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, transgenen Tiere geht einher mit erhöhten BALF-Spiegeln des auf Eosinophile chemotaktisch wirkenden Zytokins IL-5. Dies scheint zunächst verwirrend, da IL-5 häufig in Zusammenhang mit AHR gesetzt wird [Leckie, et al., 2000, Lee, et al., 1997]. Kobayashi et al. zeigten jedoch in IL-5 transgenen Mäusen

eine massive Eosinophilie, die allerdings ebenfalls mit einem Schutz vor AHR einherging [Kobayashi, et al., 2003]. Weiterhin wurden hohe TGF- β Konzentrationen in der BALF dieser Tiere gefunden. Interessanterweise führte hier eine Neutralisierung des TGF- β zu einer Wiederherstellung der AHR in den IL-5 transgenen Tieren. Außerdem konnte in diesen Tieren keine Degranulation der Eosinophilen beobachtet werden. Wie in 1.1.2. beschrieben enthalten Eosinophile Entzündungsmediatoren und Leukotriene, die für die Auslösung einer AHR verantwortlich gemacht werden. Vor diesem Hintergrund wäre es sicherlich lohnend, die in dieser Arbeit verwendeten hCD2-TGF- β 1 Mäuse auf Degranulation der Eosinophilen zu untersuchen.

Auch IL-13 depletierte Tiere entwickeln eine massive Entzündung, aber keine AHR [Walter, et al., 2001]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit auch die IL-13 Spiegel in der BALF gemessen. Alle Tiere mit Entzündung wiesen erhöhte IL-13 Konzentrationen auf; auch solche die keine AHR entwickelten. Damit konnte in diesem Versuchsansatz kein Zusammenhang zwischen der AHR und erhöhtem IL13 in der BALF gefunden werden. Zhu et al., auf der anderen Seite fanden in IL-13 transgenen Mäusen eine starke Entzündung und die Entwicklung einer AHR [Zhu, et al., 1999]. Dies spricht ebenfalls dafür, dass nicht ein Zytokin alleine für die Regulierung der AHR oder Entzündung zuständig ist, sondern, dass verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Übertragen auf die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lässt sich damit sagen, dass die hohen IL-13 Werte in OVA-immunisierten Tieren mit Entzündung einhergehen, wie dies auch von Zhu et al. gefunden wurde; die Abwesenheit der AHR jedoch muss über andere Mechanismen reguliert sein.

Anhand des bisherigen Ergebnisstandes wird klar, dass es unbedingt notwendig ist, mehr über Zell-Zell-Interaktionen in der Lunge zu verstehen, sowie die molekularen Mechanismen in Effektor- und Zielzelle im Zusammenhang mit unterschiedlichen Zytokinen aufzuklären. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es um Schutz vor AHR zu vermitteln, zu einer Interaktion von Treg mit T-Zellen kommen muss und dass von den Treg TGF- β 1, sowie IL-10 exprimiert werden muss. Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass ein intakter TGF- β Signalweg in T-Zellen unabdingbar für den Schutz vor AHR ist. Der molekulare Mechanismus der IL-10-Wirkung bezüglich des Schutzes vor AHR konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, was in weiterführenden Experimenten unbedingt getan werden sollte.

Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob IL-10 direkt auf Effektor-T-Zellen wirkt, oder über APCs, wie von anderen beschrieben [Akbari, et al., 2001, Nakagome, et al., 2005]. Auch ein direkter Effekt sowohl von IL-10 als auch von TGF- β auf glatte Atemwegsmuskelzellen (ASM), könnte wichtige Aufschlüsse über die Pathogenese des Asthmas geben. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung ist über die genauen Ursachen der AHR sehr wenig bekannt. Die ASM jedoch nehmen eine wichtige Rolle ein, da sie auf Allergenspezifische und -unspezifische Reize mit einer Kontraktion reagieren (s. 1.1.1.), was schließlich zur AHR führt. Für IL-10 und TGF- β konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Expression verschiedener Chemokine in ASM supprimieren können [Chung, et al., 1999, John, et al., 1997, Sukkar, et al., 2004], die ihrerseits chemotaktisch auf eine Vielzahl von Zellen, wie z. B. T-Zellen, wirken können. Weiterhin konnten Hakonarson et al. an isolierten Hasen-ASM eine direkte Interaktion zwischen Muskel-Zellen und aktivierten T-Zellen nachweisen [Hakonarson, et al., 2001], die zu einer höheren Muskelkontraktivität führte. In neueren Studien konnte sogar nachgewiesen werden, dass ASM in der Lage sind, CD4⁺ T-Zellen Antigene über den MHC II Komplex zu präsentieren und diese dann zu aktivieren [Veler, et al., 2007]. Dadurch könnte die ASM durchaus zur „Zielzelle“ für Treg werden: Die TGF- β 1/ IL-10 produzierende Treg könnte durch Antigene auf der ASM stimuliert werden und dann ihrerseits die CD4⁺ Zellen supprimieren, die ansonsten eine AHR auslösen würden. Dazu ist aber weder zu den Suppressionsmechanismen der Treg, noch zu der Rolle der ASM in der Pathogenese des Asthmas genügend bekannt, weswegen hier vorerst nur spekuliert werden kann. Weiterführende Versuche, die diese Mechanismen aufklären sind daher unablässig. Sehr wichtig in diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung, ob es auch zu Interaktionen von CD8⁺ Zellen mit ASM kommt, da in anderen Krankheitsmodellen gefunden wurde, dass TGF- β produzierende Treg CD8⁺ Zellen supprimieren. So konnten Green et al. zeigen, dass eine Diabetesprogression in der Maus über Suppression von CD8⁺ Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Treg verhindert werden konnte [Green, et al., 2003]. Essenziell für den Mechanismus war hier ein intakter TGF- β Rezeptor auf den CD8⁺ Zellen, sowie die TGF- β Produktion der Treg. Auch in Tumormodellen konnte eine Treg- und TGF- β -abhängige Suppression von CD8⁺ Zellen beobachtet werden [Chen, et al., 2005, Jarnicki, et al., 2006]. Bislang sind vor allem die Auswirkungen von TH2 Zellen auf die Entwicklung einer AHR untersucht, so dass es zur Rolle von CD8⁺ Zellen nur wenige Daten gibt. Es konnte aber im Mausmodell gezeigt werden, dass

auch $CD8^+$ Zellen maßgeblich an der Entwicklung der AHR beteiligt sein können [Hamelmann, et al., 1996]. Würden durch die transgenen Treg in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell $CD8^+$ Zellen supprimiert, ließe sich so auch wiederum die Entzündung erklären, die durch die unsupprimierten $CD4^+$ TH2 Zellen zustande kommt (Abb. 31). Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, ob die transgenen Treg tatsächlich $CD8^+$ Zellen supprimieren, was noch getan werden sollte. In diesem Zusammenhang wäre sicherlich interessant zu sehen, ob ASM auch in der Lage sind Antigene über MHC I Komplexe zu präsentieren.

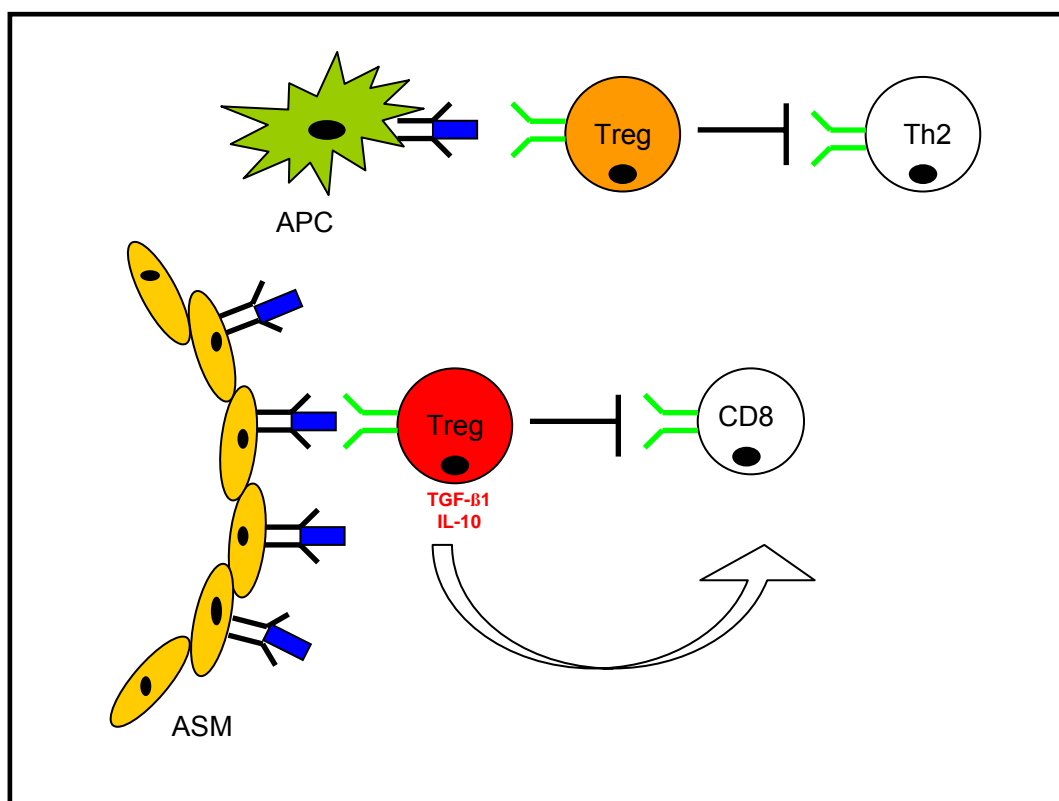


Abb. 31: Schema eines möglichen Wirkmechanismus verschiedener Treg Populationen in der Lunge.

IL-10/ TGF- β 1 exprimierende Treg könnten durch Antigene, die über MHC I Komplexe von ASM Zellen präsentiert werden, stimuliert werden und so die Aktivierung von $CD8^+$ Zellen verhindern. Dadurch würde die Bildung einer AHR verhindert. Natürlich vorkommende Treg könnten von Antigenen stimuliert werden, die von Lungen APC (z. B. DC) präsentiert werden und die Aktivierung von TH2 Zellen verhindern, was in einer Suppression der Entzündung resultieren könnte.

Auch Makrophagen nehmen einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese des Asthmas. In Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Alveolarmakrophagen in einer Verstärkung der Antigenpräsentation von Lungen DCs, sowie in einer Erhöhung der T-Zell Proliferation in der Lunge resultiert [Holt, et al., 1993, Thepen, et al., 1994]. Damit üben Makrophagen also auch eine supprimierende Wirkung aus. Interessanterweise wiesen die hCD2-TGF- β 1 transgenen Mäuse, die in dieser Arbeit untersucht wurden, signifikant mehr Makrophagen in der BALF auf, als wildtyp- Tiere was sich mit der chemotaktischen Wirkung von TGF- β auf Makrophagen erklären lässt [Li, et al., 2006]. Möglicherweise tragen also auch die Makrophagen in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell zur Suppression der AHR bei, was allerdings noch näher untersucht werden müsste.

Auch in B-Zell-defizienten Mäusen wurde eine Lungenesosinophilie, zusammen mit hohen IL-5 Spiegeln in der BALF, sowie der Abwesenheit einer AHR gefunden [Hamelmann, et al., 1997b]. Erklärt wurde dies durch die Abwesenheit von IgE, das von B-Zellen in Anwesenheit von IL-4 gebildet wird. Wie unter 1.1.2. beschrieben, sorgt IgE nach Antigenkontakt durch Kreuzvernetzung für die Degranulation von Mastzellen, was seinerseits zur AHR führt. Die IgE Spiegel wurden in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht untersucht. Die Rolle der Mastzellen konnte aus Zeitgründen nur sehr oberflächlich betrachtet werden: Anhand einiger weniger Schnitte konnten histologisch keine Unterschiede in Anzahl und Lokalisation von Mastzellen festgestellt werden; jedoch sollten weitere Versuche auch die Rolle dieser Zellen näher untersuchen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es wahrscheinlich verschiedene Suppressorzell-Populationen sind, die Einfluss auf Entzündung und AHR in der Pathogenese des Asthma nehmen. Es konnte hier gezeigt werden, dass die AHR durch TGF- β 1 und IL-10 produzierende Treg reguliert wird, während die Eosinophilie wahrscheinlich eher von natürlich vorkommenden Treg beeinflusst ist. Die vorliegenden Ergebnisse konnten weiterhin verdeutlichen, dass der Einfluss verschiedener Zytokine immer im Rahmen ihrer Mikroumgebung untersucht werden sollte und dass Aussagen, die aus Versuchen mit einer massiven Überproduktion einzelner Zytokine gewonnen wurden, nur bedingte Relevanz haben können. Im Hinblick auf eine mögliche Asthma Therapie könnten die hier untersuchten hCD2-

TGF- β 1 transgenen-Treg von Bedeutung für Frühphasereaktionen, insbesondere der AHR sein. Bezogen auf Spätphasereaktionen, hauptsächlich die Entzündung, müssen noch weitere Untersuchungen gemacht werden, da in dieser Arbeit kein Rückgang der Entzündung beobachtet werden konnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von TGF- β 1 und IL-10 durch CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) notwendig ist, um im Tiermodell vor einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) zu schützen. Wildtyp-Treg konnten keinen Schutz vor AHR vermitteln.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Schutz vor AHR durch TGF- β 1 über Effektor T-Zellen des Empfängers vermittelt wird. Dabei reichte die alleinige Anwesenheit von TGF- β 1 nicht aus, vielmehr musste das Zytokin von Treg exprimiert werden.

Ein Einfluss von TGF- β 1 überexprimierenden Treg auf die peribronchiale Entzündung konnte nicht festgestellt werden, wohingegen adoptiver Transfer von natürlichen Treg die Eosinophilen-Anzahl in der Bronchiallavage signifikant verringern konnte. Dabei korrelierte die Eosinophilie mit den IL-5 Spiegeln in der Bronchiallavage. In dieser Arbeit konnte also eine Entkopplung der Mechanismen von AHR und Entzündung festgestellt werden.

Die weitere Aufklärung der Mechanismen der Suppression der AHR durch TGF- β 1 und IL-10 überexprimierende Treg könnte daher die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei Atemwegserkrankungen ermöglichen.

5.1. Ausblick

Die hier gewonnenen Daten können die Grundlage bilden, um detailliertere Kenntnisse zur Pathogenese des Asthmas zu erlangen. Dabei sollte zunächst der unterschiedliche Einfluss von Treg auf AHR und Entzündung untersucht und der Mechanismus des Schutzes vor AHR durch TGF- β 1 überexprimierende Treg geklärt werden.

Als erstes sollten die Zielzellen sowohl von transgenen als auch nicht transgenen Treg näher untersucht werden, um zu sehen, ob es hier Unterschiede betreffend der Regulation von AHR und Entzündung gibt. Als mögliche Zielzellen kommen ASM, CD8⁺ und TH2-Zellen in Betracht, aber auch Makrophagen, DC, Eosinophile und NK Zellen könnten durch Treg beeinflusst werden.

Die Entzündung in den vor AHR geschützten transgenen Tieren sollte weiter charakterisiert werden, inklusive der Aktivierung der Eosinophilen sowie der NO-Produktion in der Lunge.

Im Mittelpunkt zukünftiger Forschung sollte die Möglichkeit einer *in vivo* Immuntherapie des Asthmas stehen. Dazu könnten Versuche direkt an der

Atemwegsmuskulatur, wie bei Grunstein et al. beschrieben, interessante Aufschlüsse geben [Grunstein, et al., 2001]. Das hier verwendete Mausmodell erscheint geeignet, um die oben genannten pathophysiologischen Zusammenhänge weiter zu analysieren.

6. Literatur

1. Adams, D.H., Hathaway, M., Shaw, J., Burnett, D., Elias, E., Strain, A. J., Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J. Immunol.*, 1991. 147(2): 609-612.
2. Agarwal, R., Gupta, D., Eosinophilic bronchitis and asthma with sputum eosinophilia are different entities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006. 118(4): 969-970.
3. Akbari, O., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.*, 2001. 2: 725-731.
4. Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., Greenfield, E.A., Chang, T.T., Sharpe, A.H., Berry, G., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.*, 2002. 8(9): 1024-1032.
5. Akdis, C.A., Blaser, K., Akdis, M., T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005a. 116(5): 961-968.
6. Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., et al., Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 2005b. 102: 98-106.
7. Alkan, S.S., Akdis, A.C., Feuerlein, D., Gruninger, M., Direct measurement of cytokines (IFN-gamma, IL-4, -5, and -6) from organs after antigenic challenge. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996. 31(796): 82-90.
8. Ameredes, B.T., Sethi, J.M., Liu, H.L., Choi, A.M.K., Calhoun, W.J., Enhanced nitric oxide production associated with airway hyporesponsiveness in the absence of IL-10. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2005. 288(5): L868-873.
9. Apostolou, I., von Boehmer, H., In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.*, 2004. 199: 1401-1408.
10. Asano, M., Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.*, 1996. 184: 387-396.
11. Bacharier, L.B., Jabara, H., Geha, R.S., Molecular mechanisms of Immunoglobulin E regulation. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 1998. 115: 257-269.
12. Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., Laufer, T.M., Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med*, 2001. 194(4): 427-438.
13. Bentley, A.M., Meng, Q., Robinson, D.S., Hamid, Q., Kay A.B., Durham, S.R., Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA

- expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993. 8(1): 35-42.
14. Berry, M.A., Hargadon, B., McKenna, S., Shaw, D., Green, R.H., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., Observational study of the natural history of eosinophilic bronchitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 2005. 35(5): 598-601.
 15. Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., Vignola, A.M., Asthma . From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000. 161(5): 1720-1745.
 16. Brandes, M.E., Mai, U.E., Ohura, K., Wahl, S.M., Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *J. Immunol.*, 1991. 147(5): 1600-1606.
 17. Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B.C., Lisa, B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J., Erby, Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, 2001. 27(1): 68-73.
 18. Busse, et al., Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998. 157(6): 210S-213.
 19. Calhoun, W.J., Reed, H.E., Moest, D.R., Stevens, C.A., Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992. 145: 317-325.
 20. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *Journal of Immunology*, 2007a. 178: 179-185.
 21. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF- β -transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *Journal of Immunology*, 2007b. 178: 172-178.
 22. Chen, et al., Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003. 198(12): 1875–1886.
 23. Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., Khazaie, K., Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *PNAS*, 2005. 102(2): 419-424.
 24. Chung, K.F., Patel, H.J., Fadlon, E.J., Rousell, J., Haddad, E.B., Jose, P.J., Mitchell, J., Belvisi, M., Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br. J. Pharmacol.*, 1999. 127(5): 1145-1150.

25. Cohn, L., Elias, J.A., Chupp, G.L., Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Review of Immunology*, 2004. 22(1): 789-815.
26. de Lafaille, M.A.C., Muriglan, S., Sunshine, M.-J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G.C., Wensky, A.K., Olivares-Villagomez, D., Lafaille, J.J., Hyper Immunoglobulin E Response in Mice with Monoclonal Populations of B and T Lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 2001. 194(9): 1349-1360.
27. Del Prete, G.F., De Carli, M., D'Elisio, M.M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L., Romagnani, S., Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur. J. Immunol.*, 1993. 23(7): 1445-1449.
28. Dennis, P.A., Rifkin, D.B., Cellular activation of latent Transforming Growth Factor-beta requires binding to the cation-independent Mannose 6-Phosphate/ Insulin-like growth factor type II receptor. *PNAS*, 1991. 88(2): 580-584.
29. Derynck, R., Zhang, Y.E., Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003. 425(6958): 577-584.
30. Ebner, C., Schenk, S., Najafian, N., Siemann, U., Steiner, R., Fischer, G.W, et al., Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J. Immunol.*, 1995. 154: 1932-1940.
31. Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C., Townes, A.S., Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.*, 1991. 173(5): 1121-1132.
32. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003. 4(4): 330-336.
33. Francis, J.N., Till, S.J., Durham, S.R., Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. 111(6): 1255-1261.
34. Fu, C.L., Chuang, Y.H., Chau, L.Y., Chiang, B.L., Effects of adenovirus-expressing IL-10 in alleviating airway inflammation in asthma. *The Journal of Gene Medicine*, 2006a. 8(12): 1393-1399.
35. Fu, C.L., Ye, Y. L., Lee, Y. L., Chiang, B. L., Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respiratory Research*, 2006b. 7(1): 72.
36. Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fabel, H., Alarie, Y., Renz, H., Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2001. 280(3): L565-573.

37. Gomes, R.F., Shen, X., Ramchandani, R., Tepper, R.S., Bates, J.H., Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J. Appl. Physiol.*, 2000. 89(3): 908-916.
38. Gorelik, L., Constant, S., Flavell, R.A., Mechanism of Transforming Growth Factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.*, 2002. 195(11): 1499-1505.
39. Gorelik, L., Fields, P.E., Flavell, R.A., Cutting Edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J. Immunol.*, 2000. 165(9): 4773-4777.
40. Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., Flavell, R.A., CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *PNAS*, 2003. 100(19): 10878-10883.
41. Gruetter, C.A., Childers, C.E., Bosserman, M.K., Lemke, S.M., Ball, J.G., Valentovic, M.A., Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside in bovine airways. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989. 139(5): 1192-1197.
42. Grunstein, M.M., Hakonarson, H., Leiter, J., Chen, M., Whelan, R., Grunstein, J.S., Chuang, S., Autocrine signaling by IL-10 mediates altered responsiveness of atopic sensitized airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2001. 281(5): L1130-1137.
43. Hadeiba, H., Locksley, R. M., Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J. Immunol.*, 2003. 170(11): 5502-5510.
44. Hakonarson, H., Kim, C., Whelan, R., Campbell, D., Grunstein, M.M., Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness. *J. Immunol.*, 2001. 166(1): 293-303.
45. Hamelmann, E., et al., Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997a. 156: 766-775.
46. Hamelmann, E., Oshiba, A., Paluh, J., Bradley, K., Loader, J., Potter, T.A., Larsen, G.L., Gelfand, E.W., Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.*, 1996. 183(4): 1719-1729.
47. Hamelmann, E., Vella, A.T., Oshiba, A., Kappler, J.W., Marrack, P., Gelfand, E.W., Allergic airway sensitization induces T cell activation but not airway hyperresponsiveness in B cell-deficient mice. *PNAS*, 1997b. 94(4): 1350-1355.
48. Hansen, G., McIntire, J.J., Yeung, V.P., Berry, G., Thorbecke, G.J., Chen, L., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., CD4+ T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2000. 105(1): 61-70.

49. Herz , U., Lump, U., Daser, A., Gelfand, E.W., Renz, H., Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996. 409: 25-32.
50. Hogan, S.T., Koskinen, A., Matthaei, K.I., Young, I.G., Foster, P.S., Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998. 157(1): 210-218.
51. Hogman, M., Frostell, C.G., Hedenstrom, H., Hedenstierna, G., Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993. 148: 1474-1478.
52. Holt, P., Oliver, J., Bilyk, N., McMEnamin, C., McMEnamin, P., Kraal, G., et al., Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.*, 1993. 177: 397-406.
53. Homer, R.J., Elias, J.A., Airway remodeling in asthma: Therapeutic implications of mechanisms. *Physiology*, 2005. 20(1): 28-35.
54. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. 299(5609): 1057-1061.
55. Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Gray, J.D, The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J. Leukoc. Biol.*, 2003. 74(4): 471-478.
56. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M., Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 1993. 23(260): 547-549.
57. Huber, S., Schramm, C., Lehr, H.A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., Blessing, M., Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.*, 2004. 173(11): 6526-6531.
58. Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J., Dijke, P., Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry*, 2000. 267(24): 6954-6967.
59. Jaffar, Z., Sivakuru, T., Roberts, K., CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J. Immunol.*, 2004. 172(6): 3842-3849.
60. Janssen, E.M., Wauben, M.H., Nijkamp, F.P., van Eden, W., van Oosterhout, A.J. , Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002. 2: 257-264.
61. Jarjour, N.N., Busse, W.W., Calhoun, W.J., Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992. 146(4): 905-911.

62. Jarnicki, A.G., Lysaght, J., Todryk, S., Mills, K.H.G., Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: Influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2006. 177(2): 896-904.
63. Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., Gelfand, E.W., Naturally occurring lung CD4+CD25+ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J. Immunol.*, 2007. 178(3): 1433-1442.
64. John, M., Hirst, S.J., Jose, P.J., Robichaud, A., Berkman, N., Witt, C., Twort, C.H., Barnes, P.J., Chung, K.F., Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J. Immunol.*, 1997. 158(4): 1841-1847.
65. Jordan, M.S., et al., Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunol.*, 2001. 2: 301-306.
66. Jungsuwadee, P., Dekan, G., Stingl, G., Epstein, M.M., Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin. Immunol.*, 2004. 110(1): 13-21.
67. Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., Akdis, A.C., IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 2003. 33(5): 1205-1214.
68. Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., Lloyd, C.M., Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.*, 2005. 202(11): 1539-1547.
69. Kim, S.J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K.Y., Sporn, M. B., Karin, M., Roberts, A.B., Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.*, 1990. 10(4): 1492-1497.
70. Kobayashi, T., Iijima, K., Kita, H., Marked airway eosinophilia prevents development of airway hyperresponsiveness during an allergic response in IL-5 transgenic mice. *J. Immunol.*, 2003. 170(11): 5756-5763.
71. Kokturk, N., Tatlicioglu, T., Memis, L., Akyurek, N., Akyol, G., Expression of transforming growth factor beta1 in bronchial biopsies in asthma and COPD. *J. Asthma*, 2003. 40(8): 887-893.
72. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W., Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993. 75(2): 263-274.
73. Kulkarni, A.B., Huh, C., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., Karlsson, S., Transforming Growth Factor beta1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *PNAS*, 1993. 90(2): 770-774.

74. Kumar, R.K., Herbert, C., Webb, D.C., Li, L., Foster, P.S., Effects of anticytokine therapy in a mouse model of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004. 170(10): 1043-1048.
75. Kuruvilla, A.P., Shah, R., Hochwald, G.M., Liggitt, H.D., Palladino, M.A., Thorbecke, G.J., Protective effect of Transforming Growth Factor beta1 on experimental autoimmune diseases in mice. *PNAS*, 1991. 88(7): 2918-2921.
76. Lambrecht, B.N., Pauwels, R.A., Fazekas De St Groth, B., Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J. Immunol.*, 2000. 164(6): 2937-2946.
77. Leckie, M.J., Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, A.K., Cowley, H.C., Chung, K.F., Djukanovic, R., Hansel, T.T., Holgate, S.T., Sterk, P.J., Barnes, P.J., Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 2000. 356(9248): 2144-2148.
78. Lee, J.J., McGarry, M.P., Farmer, S.C., Denzler, K.L., Larson, K.A., Carrigan, P.E., Brenneise, I.E., Horton, M.A., Haczk, A., Gelfand, E.W., Leikauf, G.D., Lee, N.A., Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J. Exp. Med.*, 1997. 185(12): 2143-2156.
79. Letterio, J.J., Roberts, A.B., Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998. 16: 137.
80. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K.L., Flavell, R.A., Transforming growthfactor beta; regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2006. 24(1): 99-146.
81. Luster, A.D., Chemokines -- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 1998. 338(7): 436-445.
82. Luttmann, et al., Effects of TGF- β on eosinophil chemotaxis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1998. 47(2): 127-130.
83. Makela, M.J., Kanehiro, A., Borish, L., Dakhama, A., Loader, J., Joetham, A., Xing, Z., Jordana, M., Larsen, G.L., Gelfand, E.W., IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *PNAS*, 2000. 97(11): 6007-6012.
84. Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., Rudensky, A.Y., TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2005. 201(7): 1061-1067.
85. Maziak, W., Behrens, T., Brasky, T.M., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, S.K., Keil, U., Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. *Allergy*, 2003. 58(7): 572-579.
86. Minshall, E.M., Leung, D.Y., Martin, R.J., Song, Y.L., Cameron, L., Ernst, P., Hamid, Q., Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways

- fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997. 17(3): 326-333.
87. Nakagome, K., Dohi, M., Okunishi, K., Komagata, Y., Nagatani, K., Tanaka, R., Miyazaki, J., Yamamoto, K., In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J. Immunol.*, 2005. 174(11): 6955-6966.
 88. O'Garra, A., Vieira, P.L., Vieira, P., Goldfeld, A.E., IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest.*, 2004. 114(10): 1372-1378.
 89. Oh, J.W., Seroogy, C.M., Meyer, E.H., Akbari, O., Berry, G., Fathman, C.G., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J. All. Clin. Immunol.*, 2002. 110(3): 460-468.
 90. Olsson, N., Piek, E., Sundstrom, M., Peter, D., Nilsson, G., Transforming growth factor-beta-mediated mast cell migration depends on mitogen-activated protein kinase activity. *Cellular Signalling*, 2001. 13(7): 483-490.
 91. Powell, B.R., Buist, N.R., Stenzel, P., An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.*, 1982. 100(5): 731-737.
 92. Romanet-Manent, S., Charpin, D., Magnan, A., Lanteaume, A., Vervloet, D., Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy*, 2002. 57(7): 607-613.
 93. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995. 155(3): 1151-1164.
 94. Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Luscinskas, F.W., Gimbrone, M.A., McIntyre, B.W., IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*, 1992. 148(4): 1086-1092.
 95. Schramm, C., Herz, U., Podlech, J., Protschka, M., Finotto, S., Reddehase, M.J., Kohler, H., Galle, P.R., Lohse, A.W., Blessing, M., TGF-beta regulates airway responses via T cells. *J Immunol*, 2003. 170(3): 1313-1319.
 96. Schramm, C., Huber, S., Protschka, M., Czochra, P., Burg, J., Schmitt, E., Lohse, A.W., Galle, P.R., Blessing, M., TGFbeta regulates the CD4⁺CD25⁺ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol*, 2004. 16(9): 1241-1249.
 97. Scott, K.A., Wardlaw, A.J., Eosinophilic airway disorders. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2006. 27(2): 128-133.

98. Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., Fazekas de St. Groth, B., The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 1992. 176(4): 1091-1098.
99. Sedgwick, J.D., Holt, P.G., Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology*, 1985. 56(4): 635-642.
100. Shevach, E.M., CD4+CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002. 2: 389-400.
101. Shi, H.Z., Qin, X.J., CD4CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy*, 2005. 60(8): 986-995.
102. Shinagawa, K., Kojima, M., Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003. 168(8): 959-967.
103. Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-[beta]1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 1992. 359(6397): 693-699.
104. Street, N.E., Mosmann, T.R., Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.*, 1991. 5(2): 171-177.
105. Sukkar, M.B., Issa, R., Xie, S., Oltmanns, U., Newton, R., Chung, K.F., Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004. 287(6): L1230-1240.
106. Sung, K.L.P., Yang, L., Kim, J., Ko, D., Stachnick, G., Castaneda, D., Nayar, J., Broide, D.H., Eotaxin induces a sustained reduction in the functional adhesive state of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000. 106(5): 933-940.
107. Suri-Payer, E., Cantor, H., Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4+CD25+ T cells. *J Autoimmun*, 2001. 16: 115-123.
108. Takeda, K., Hamelmann, E., Joetham, A., Shultz, L.D., Larsen, G.L., Irvin, C.G., Gelfand, E.W., Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1997. 186(3): 449-454.
109. Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., Akdis, C.A., Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. *Immunology*, 2006. 117(4): 433-442.
110. Thepen, T., Kraal, G., Holt, P.G., The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1994. 725: 200-206.

111. Thornton, A.M., Shevach, E.M., CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T-cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production. *J. Exp. Med.*, 1998. 188: 287–296.
112. Tonnel, A.B., Joseph, M., Gosset, P., Fournier, E., Capron, A., Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *The Lancet*, 1983. 25(1): 1406-1408.
113. Van Vyve, T., Chanez, P., Bernard, A., Bousquet, J., Godard, P., Lauwerijs, R., Sibille, Y., Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995. 95: 60-68.
114. Veler, H., Hu, A., Fatma, S., Grunstein, J.S., DeStephan, C.M., Campbell, D., Orange, J.S., Grunstein, M.M., Superantigen presentation by airway smooth muscle to CD4+ T lymphocytes elicits reciprocal proasthmatic changes in airway function. *J. Immunol.*, 2007. 178(6): 3627-3636.
115. Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F., Alarie, Y., Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch. Toxicol.*, 1993. 67(7): 478-490.
116. Wahl, S.M., Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: A cause and a cure. *Journal of Clinical Immunology*, 1992. 12(2): 61-74.
117. Wallick, S.C., Figari, I.S., Morris, R.E., Levinson, A.D., Palladino, M.A., Immunoregulatory role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF-beta 1. *J. Exp. Med.*, 1990. 172(6): 1777-1784.
118. Walter, D.M., McIntire, J.J., Berry, G., McKenzie, A.N.J., Donaldson, D.D., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J. Immunol.*, 2001. 167(8): 4668-4675.
119. Wan, Y.Y., Flavell, R.A., The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 2006. 212(1): 114-130.
120. Wardlaw, A.J., The role of air pollution in asthma. *Clin. Exp. Allergy.*, 1993. 23(2): 81-96.
121. Weiner, H.L., Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection*, 2001. 3(11): 947-954.
122. Welch, G.R., Wong, H.L., Wahl, S.M., Selective induction of Fc gamma RIII on human monocytes by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.*, 1990. 144(9): 3444-3448.
123. Wills-Karp, M., Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Review of Immunology*, 1999. 17(1): 255-281.

124. Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., Donaldson, D.D., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 1998. 282(5397): 2258-2261.
125. Wing, K., Sakaguchi, S., Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2006. 6: 482-488.
126. Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., Elias, J.A., Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.*, 1999. 103(6): 779-788.

7. Abkürzungen

AHR	Atemwegshyperreagibilität
ALUM (Al(OH) ₃)	Aluminiumhydroxyd
APC	Antigen präsentierende Zelle
ASM	Atemwegsmuskelzelle
BALF	Bronchiallavage Flüssigkeit
CD	Cluster of Differentiation
DC	dendritische Zelle
dTG	doppel transgen
EF ₅₀	halbmaximaler expiratorischer Atemfluss
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
H&E	Hämallaun und Eosin
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IFN-g	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	X-linked immunodeficiency syndrome
k. o.	knock out
kD	kilo Dalton
LAP	Latency-Associated Protein
MBP	Major Basic Protein
MCh	β-Methyl-Acetylcholin
MHC	Major Histocompatibility Complex
NO	Stickoxyd
OVA	Ovalbumin
PE	Phycoerythrin
P _{enh}	Enhanced Pause
RI	Lungenwiderstand
TG	Transgen
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helfer Zelle

Tr	T-regulatorisch
Treg	regulatorische T-Zelle
TβR	TGF-β Rezeptor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WT	Wildtyp