

Rolle von NFATc2 in einem murinen Asthmamodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Roman Karwot

Geboren am 04. August 1975
in Rybnik

Mainz, 2007

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Tag der Promotion: 23.11.2007

Publikationen

1. Hausding, M., R. Karwot, P. Scholtes, H. A. Lehr, M. Wegmann, H. Renz, P. R. Galle, M. Birkenbach, M. F. Neurath, R. S. Blumberg, and S. Finotto. 2007. Lung CD11c⁺ cells from mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI-3) prevent airway hyper-responsiveness in experimental asthma. *Eur J Immunol* 37:1663-1677.
2. Finotto, S., T. Eigenbrod, R. Karwot, I. Boross, A. Doganci, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2007. Local blockade of IL-6R signaling induces lung CD4⁺ T cell apoptosis in a murine model of asthma via regulatory T cells. *Int Immunol* 19:685-693.
3. Sauer, K. A., P. Scholtes, R. Karwot, and S. Finotto. 2006. Isolation of CD4⁺ T cells from murine lungs: a method to analyze ongoing immune responses in the lung. *Nat Protoc* 1:2870-2875.
4. Maxeiner, J. H., R. Karwot, M. Hausding, K. A. Sauer, P. Scholtes, and S. Finotto. 2007. A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nat Protoc* 2:105-112.
5. Doganci, A., K. Sauer, R. Karwot, and S. Finotto. 2005. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol* 28:257-270.

Für meine Familie

"Der Kluge lernt nach dem ersten Fehler, der Dumme nach dem x-ten Fehler,
der Weise lernt nie aus."
(Chinesisches Sprichwort)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	<i>Grundlagen des Asthma bronchiale</i>	10
1.2	<i>Immunpathogenese des Asthma bronchiale</i>	12
1.3	<i>NFAT Proteine: Aktivierung und Regulation</i>	21
1.4	<i>Die Rolle von NFATc2 bei Asthma bronchiale</i>	26
1.5	<i>Zielsetzungen und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit</i>	28
2	Material und Methoden	29
2.1	<i>Material</i>	29
2.1.1	Antikörper	29
2.1.2	Beads	30
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien	30
2.1.4	Puffer	32
2.1.5	Konfektionierte Kits	34
2.1.6	Geräte	35
2.1.7	Gebrauchsmaterialien	36
2.2	<i>Methoden</i>	38
2.2.1	Versuchstiere	38
2.2.2	Behandlung der Mäuse	39
2.2.3	AHR Messung–Messung des Atemwegswiderstandes	41
2.2.4	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	43
2.2.5	Organentnahme und Organpräparation	43
2.2.6	Histologische Färbungen und Auswertungen	44
2.2.7	Immunhistologische Färbung der CD4+ T-Zellen	45
2.2.8	Zellisolierung	45
2.2.9	Zellkultivierung	47
2.2.10	FACS-Färbung der Zellen	48
2.2.11	Proliferationsmessung	49

2.2.12	ELISA.....	50
2.2.13	mRNA-Isolierung.....	51
2.2.14	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	51
2.2.15	PCR, Realtime PCR.....	52
2.2.16	Statistische Auswertung.....	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	<i>Bestimmung des Atemwegswiderstandes der NFATc2 defizienten Mäuse nach OVA-Sensibilisierung mit und ohne Allergendisposition</i>	55
3.2	<i>Histologische Untersuchungen der NFATc2 defizienten Mäuse</i>	57
3.2.1	NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Menge an intraepithelialen Lymphozyten in der Lunge	58
3.2.2	Bestimmung der Mukusproduktion in der Lunge	60
3.2.3	Erhöhte Kollageneinlagerung in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse	61
3.2.4	Quantifizierung der Eosinophilie in Lunge und BAL der NFATc2(-/-) und der NFATc2(+/-) Tiere	62
3.3	<i>Bestimmung der Th1, Th2 und Th17 Zytokinproduktion der CD4+ T-Zellen...</i>	63
3.3.1	CD4+ T-Zellen aus der Lunge NFATc2 defizienter Mäuse setzen vermehrt Th2 Zytokine frei.....	64
3.3.2	Vermehrte IL-17 Produktion in den CD4+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse	67
3.3.3	Vermehrte IFN- γ Produktion CD4+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse .	68
3.4	<i>Charakterisierung von CD4+ T- Zellen aus Lunge und Milz mittels Durchflusszytometrie.....</i>	69
3.4.1	Erhöhte aktivierte CD4+ CD44+ CD69+ Population in den NFATc2 KO Mäusen	69
3.4.2	Erhöhte CD4+ CD49b+ (VLA-2) Population in NFATc2 KO Mäusen	72
3.4.3	Die Anzahl T-regulatorischer Zellen in der Lunge von NFATc2 KO Mäusen ist erhöht.....	74
3.5	<i>Untersuchung der Hyperproliferation der aus Lunge und Milz isolierten CD4+T-Zellen</i>	77

3.5.1	CFSE markierte CD4+ T-Zellen aus NFATc2 KO Mäusen zeigen eine vermehrte Proliferation	78
3.5.2	NFATc2 KO CD4+ CD25- konventionelle T-Zellen lassen sich weder durch NFATc2 KO noch durch WT Treg supprimieren.....	79
3.6	<i>Adoptiver Transfer OVA-spezifischer CD4+ T- Zellen im SCID-Maus-System</i>	82
3.6.1	Bestimmung des Atemwegswiderstandes bei SCID Mäusen nach adoptivem Transfer von CD4+ T-Zellen aus Nfatc2 KO bzw. WT Mäusen.....	82
3.7	<i>Untersuchung der IFN-γ Produktion in der Lunge von NFATc2 KO Mäusen..</i>	85
3.7.1	NFATc2 KO Mäuse zeigen eine erniedrigte IFN- γ Produktion in den CD8+ T-Zellen	85
3.7.2	Charakterisierung CD8+ T-Zellen in NFATc2 defizienten Mäusen.....	87
3.7.3	Charakterisierung der CD8+ T-Zellen in IFN- γ defizienten Mäusen	91
3.7.4	Weitere Charakterisierung der CD8+ T-Zellen in NFATc2 defizienten Mäusen	94
3.8	<i>Adoptiver Transfer OVA-spezifischer CD4+ und CD8+ T- Zellen im SCID-Maus System</i>	96
3.8.1	Die CD8+ T-Zellpopulation ist ein wesentlicher Faktor für die erhöhte AHR bei den NFATc2 defizienten Mäusen.....	96
3.8.2	Für die Entwicklung der AHR in den NFATc2 Mäusen werden neben CD8+ T-Zellen auch CD4+ T-Zellen benötigt	99
3.8.3	Die CD8+ CD122+ doppelpositiven T-Zellen sind mitunter für den erhöhten Atemwegswiderstand verantwortlich.	101
3.8.4	Zusammenfassung.....	104
4	Diskussion	106
4.1	<i>Bronchiale Hyperreagibilität und allergische Th2 Immunantwort der NFATc2 defizienten Mäuse</i>	107
4.2	<i>Histologische Untersuchung NFATc2 defizienter Mäuse</i>	109
4.3	<i>Zytokin-Level in den Zellkulturüberständen CD4+ T-Zellen</i>	110
4.4	<i>Aktiverter Phänotyp der konventionellen CD4+ T-Lymphozyten</i>	112

4.5	<i>Erhöhte T-regulatorische Population in den Lungen NFATc2 defizienter Mäuse</i>	113
4.6	<i>Einfluss OVA-spezifischer CD4+ T-Zellen auf die Entwicklung der AHR nach adoptivem Transfer</i>	116
4.7	<i>Die Gesamtmenge an IFN-γ in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse ist niedriger als in den Wildtypen</i>	117
4.8	<i>Charakterisierung der CD8+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse</i>	118
4.9	<i>Effekt der CD8+ T-Zellen der NFATc2 KO Maus auf die AHR</i>	121
5	Zusammenfassung	123
6	Literaturverzeichnis	126
7	Danksagung	138
8	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9	Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antigenpräsentierung und Aktivierung der T-Lymphozyten (19).....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Th1 und Th2 Zelldifferenzierung (19)	15
Abbildung 3: die Differenzierung der Th17 Zellen.....	17
Abbildung 5: Kontrolle der allergischen Reaktion durch Tregs (33).....	18
Abbildung 6: Biologische Aktivität von IFN- γ (19)	19
Abbildung 7: Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren (51).....	21
Abbildung 8: Regulation der NFAT Aktivität (51)	23
Abbildung 9:NFAT und die Differenzierung der Th-Zellen (51).....	25
Abbildung 10: Interaktion von NFATc2 mit dem IL-4 Promotor (65)	26
Abbildung 11: Generierung der NFATc2 defizienten Maus.....	38
Abbildung 12: Protokoll zur Induzierung von Asthma	39
Abbildung 13: Protokoll der Behandlung von immundefizienten Mäusen	40
Abbildung 14 : Darstellung des invasiven Systems der Firma BUXCO®.....	42
Abbildung 15 : Schematischer Aufbau Zellisolation mit MACS® (http:// www.miltenyibiotec.com/)	47
Abbildung 16: Messung der AHR unter verschiedenen Konditionen.	55
Abbildung 17: Die NFATc2 defizienten Mäuse zeigen einen erhöhten Level an IgE im Vergleich zu naiven Tieren.	56
Abbildung 18: Erhöhte Mengen an Lymphozyten im intraepithelialen Raum bei den NFATc2 defizienten Mäusen.	58
Abbildung 19: Bestimmung der Mukusproduktion in den Lungenschnitten OVA/OVA-behandelter Mäuse	60
Abbildung 20: Bestimmung der Kollageneinlagerung in den Lungenschnitten	61
Abbildung 21: Quantifizierung der Eosinophilen	62
Abbildung 22: Th2 Zytokinfreisetzung der CD4+ T-Zellen der Lunge (KO vs. WT)	64
Abbildung 23: Erhöhte IL-10 Produktion der CD4+ T-Zellen in der Lunge (KO vs. WT)	65
Abbildung 24: Erhöhte TGF- β_1 Produktion in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse.....	66
Abbildung 25: Erhöhte IL-17 Produktion CD4+ T-Zellen der Lunge (KO vs. WT).....	67
Abbildung 26: Erhöhte IFN- γ Produktion CD4+ T-Zellen der Lunge (KO vs. WT).....	68

Abbildung 27: Schematische Darstellung der FACS-Analyse in den Gesamtzellen der Lunge 70

Abbildung 28: Darstellung von CD4+ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp in der Lunge und Milz 71

Abbildung 29: NFATc2 KO Mäuse zeigen eine Erhöhung der CD4+ CD49b+ Population sowohl in der Milz als auch in der Lunge..... 73

Abbildung 31: NFATc2 KO Mäuse zeigen eine erhöhte Zahl an Treg in der Lunge 75

Abbildung 32: NFATc2 KO CD4+ T-Zellen exprimieren erhöhte Mengen an FOXP3 mRNA..... 76

Abbildung 33: NFATc2 KO CD4+ T-Zellen zeigen eine erhöhte Proliferation..... 78

Abbildung 34: Messung der suppressorischen Eigenschaften der CD4+ CD25+ GITR+ Zellen..... 80

Abbildung 35: Messung der suppressorischen Eigenschaften der CD4+ CD25++ GITR++ Zellen 81

Abbildung 36: Bestimmung der AHR bei SCID Mäusen nach Allergendisposition. 82

Abbildung 37: Nachweis von CD4+ T-Zellen aus der BAL nach adoptivem Transfer 83

Abbildung 39: Erhöhte Th1 und Th2 Zytokinproduktion im BALF der mit NFATc2KO CD4-T-Zellen immunisierten SCID Mäuse..... 84

Abbildung 40: Darstellung der IFN- γ Produktion in der Gesamtzellpopulation der Lunge. 85

Abbildung 41: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine geringere IFN- γ Produktion in den CD8+ T-Zellen 86

Abbildung 42: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte CD8+CD122+ regulatorische Population 87

Abbildung 43: CD8+ CD122+ doppelpositive T-Zellen produzieren kein IFN- γ 88

Abbildung 44: CD8+ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse sezernieren vermehrte Mengen an IL-10. 89

Abbildung 45: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion in den CD8+CD122+ als auch in den CD8+CD122- T-Zellen 90

Abbildung 46: IFN- γ defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte CD8+CD122+ regulatorische Population..... 91

Abbildung 47: CD8+ T-Zellen der IFN- γ defizienten Mäuse zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion	92
Abbildung 48: IFN- γ defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion in den CD8+ CD122+ T-Zellen	93
Abbildung 49: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erniedrigte Anzahl an CD25+ CD8+ T-Zellen in der Lunge nach OVA-Sensibilisierung	94
Abbildung 50: Erhöhte „long lived memory“ CD8+ T-Zellpopulation in den NFATc2 defizienten Mäusen	95
Abbildung 51: CD8+ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse sind u.a. für die erhöhte AHR verantwortlich	97
Abbildung 52: IL-17 und IFN- γ Produktion in der BALF sowie in den Überständen kultivierter Milzzellen	98
Abbildung 53: Proliferation von CD4+ CFSE markierten T-Zellen mit und ohne CD8+ Population.....	99
Abbildung 55: Einfluss der CD8+ T-Zellen auf die AHR ohne die CD4+ Population....	100
Abbildung 56: Isolation der CD8+ CD122+ T-Zellen aus der Peripherie von NFATc2 KO Mäusen.....	101
Abbildung 58: NFATc2 KO CD8+ CD122+ T-Zellen sind für die AHR-Entwicklung verantwortlich	102
Abbildung 59: Die mit CD8+ CD122+ T-Zellen immunisierten SCID Mäuse zeigen eine vermehrte IFN- γ und eine erniedrigte Eotaxin Produktion in der BALF.....	103
Abbildung 60: Schematische Darstellung der Zell-Regulierung, die eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Asthma bronchiale spielen.....	123
Abbildung 61: Übersicht über die unterschiedlichen CD8+ Subpopulationen und deren Wirkung auf CD4+ T-Zellen	125

Abkürzungsverzeichnis

α :	anti
AHR :	Atemwegs-Hyperreagibilität
AK :	Antikörper
Alum :	Aluminiumpotassiumsulfat
APC :	Antigen Presenting Cell
Aqua dest. :	Aqua destillata
BAL :	Broncho-alveoläre Lavage
BALF:	Broncho-alveoläre Lavage Fluid
BSA :	Bovines Serum Albumin
CD4 ⁺ CD25 ⁺ :	regulatorische T-Zelle
cDNA:	complementary DNA
CFDASE/CFSE:	Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DC :	Dendritic Cells
EF-1a:	Elongations-Faktor-1alpha
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay
Eos:	Eosinophilen
et al. :	et alteri
FACS :	Fluorescence Activated Cell Scan/Sorting
FCS :	Fetal Calf Serum
FoxP3:	Forkhead box protein 3
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related Protein
i.p. :	intraperitoneal
i.v. :	intravenös
IFN :	Interferon
Ig :	Immunglobulin
IL :	Interleukin
KO, (-/-) :	Knock out

MACS :	Magnetic Activated Cell Sorting
MCh :	Methacholin
MHC :	Major Histocompatibility Complex
mRNA:	messenger RNA
n.s. :	nicht signifikant
OVA :	Ovalbumin
p :	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS:	phosphate buffered saline
resp. :	respektive
RT :	Raumtemperatur
RNA:	Ribonukleinsäure
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
Th :	T-Helferzelle
Treg:	regulatorische T-Zelle
TGF- β :	transforming growth factor- β
TZR:	T-Zellrezeptor
qRT-PCR	quantitativ reverse transcription PCR
vs. :	versus
WT; (+/+):	Wildtyp
Z :	Zellen

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen der Welt und ist damit neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine weitere häufige Volkskrankheit. Es wird geschätzt, dass gegenwärtig etwa 300 Millionen Menschen auf der Welt an Asthma leiden (1). Zu wesentlich höheren Schätzungen kann man gelangen, wenn weniger strenge Kriterien für die Diagnose von klinischem Asthma angelegt werden. Die Asthmarate steigt, wenn Gemeinschaften den westlichen Lebensstil annehmen und urbanisiert werden. Der Prozentsatz der städtischen Weltbevölkerung wird bis 2025 voraussichtlich von 45 % auf 59 % steigen, sodass ein Ansteigen der Zahl der weltweiten Asthmatiker in den nächsten zwei Jahrzehnten sehr wahrscheinlich ist. In Deutschland leiden zur Zeit ca. 6-8% der erwachsenen Bevölkerung an Asthma, wobei bei Kindern die Häufigkeit mit über 10% eingeschätzt wird (1, 2). Obwohl Asthma nur einen kleinen Teil der Todesursache in Deutschland ausmacht (ca. 2100 Tote/Jahr) betragen die jährlichen Behandlungskosten über 2.5 Millionen Euro. Dadurch kommt der Erkrankung eine erhebliche gesundheitspolitische und folglich volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Asthma wird durch bronchiale Hyperreaktivität, überschießende Bronchokonstriktion, eine ödematöse Schwellung der Bronchialwand und Hypersekretion von Schleim mit einer zähen Konsistenz charakterisiert. Typische Symptome vom Asthma bronchiale sind anfallsweise Atemnot, pfeifende und giemende Geräusche sowie das Abhusten von glasig-zähem Schleim. Diese Symptome treten vor allem nachts und in den frühen Morgenstunden auf, was teilweise auf einen niedrigen Spiegel von Steroidhormonen im Körper zurückzuführen ist. Die Erkrankung wird nach Häufigkeit der Beschwerden in intermittierendes (leichtgradiges) und persistierendes (chronisches) Asthma unterteilt.

Man spricht vom persistierenden Asthma wenn die Symptome häufiger als einmal tagsüber und mindestens dreimal pro Monat nachts auftreten. Die Genese ist im Wesentlichen allergisch (extrinsisches Asthma) oder nicht-allergisch (intrinsisches Asthma). Der Schweregrad und der Verlauf werden durch das Ausmaß der Atemwegsentzündung, das Vorliegen einer allergischen Prädisposition und durch

genetische Faktoren bestimmt (2, 3). Die Therapie der Erkrankung richtet sich nach den Schweregraden und zielt auf die Minderung der Atemwegsentszündung und die Relaxation der Bronchialmuskulatur ab. Bei allen Schweregraden werden in der Hauptsache kurzwirksame Beta-2-Adenorezeptor-Agonisten (β 2-Sympathomimetika), wie z.B. Salbutamol oder Terbutalin, die eine antiobstruktive Basisedikation darstellen, eingenommen. Bei leichtgradigem Asthma werden zusätzlich schwach wirksame entzündungshemmende Mittel, wie z.B. Mastzellstabilisatoren (Cromoglicinsäure) und Leukotrien-Rezeptorantagonisten (Montelukast) eingenommen. Mittelgradiges Asthma wird mit Glukokortikoiden (z.B.: Budesonid, Beclometason) als auch mit langwirksamen Beta-2-Adrenorezeptor-Agonisten (z.B.: Formoterol) behandelt. Bei schwerem Asthma wird zusätzlich hoch dosiertes inhalatives oder systemisches Kortison (z.B.: Prednisolon) verabreicht (2, 4, 5). Bei akuten Atembeschwerden sind einige Pharmaka kontraindiziert. Hierzu gehören die überall erhältlichen nichtsteroiden Antirheumatika (NSAR), wie Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Naproxen aber auch Mittel zur Blutdrucksenkung wie betaadrenerge Antagonisten (Betablocker) (6).

1.2 Immunpathogenese des Asthma bronchiale

Die chronische Atemwegsentzündung ist ein Antikörper-vermittelter immunologischer und zellulärer Prozess, bei deren Entstehung es zu einer Aktivierung von Mastzellen, Granulozyten, Makrophagen und Lymphocyten kommt. Diese Zellen setzen Mediatoren wie Zytokine und Prostaglandine frei, die den Verlauf und das Ausmaß der Atemwegsentzündung grundlegend beeinflussen. Hierbei kommt es zu einer lokalen Wirkung auf glatte Muskel-, Atemwegsepithel-, als auch Endothelzellen, was zu einer weiteren Sekretion von Mediatoren führt. In der Frühphase der Pathogenese des Asthma bronchiale spielen genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren eine große Rolle und führen zur Produktion von IgE, welches zur Auslösung der Entzündungskaskade führt. (2, 3, 7) Das IgE, das in der Frühphase der allergischen Reaktion (5 bis 30 Minuten nach der Allergenexposition) an hoch- und niedrig-affine Rezeptoren (FC ϵ RI und FC ϵ RII) bindet, verursacht eine Degranulation der Mastzellen. Diese wiederum setzen unterschiedliche Mediatoren frei, wie z.B. Histamin und Serotonin, welche in präformierten Vesikeln gespeichert sind. Die Mastzellen setzen die Entzündungsmediatoren Prostaglandin D₂, E₂, Leukotriene B₄ und C₄, als auch eine Vielzahl an Zytokinen frei, wie IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF TNF- α als auch IL-9 und IL-13, welche den entzündlichen Prozess fördern (8-10). Obwohl die Mastzellen in der frühen Phase von Asthma bronchiale eine große Rolle spielen, wird die Spätphase und der weitere Verlauf der allergischen Entzündung vor allem durch Eosinophile, Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und T-Lymphocyten bestimmt.

Die Eosinophilen, deren Entwicklung unter anderem durch IL-3 und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) gefördert wird, produzieren zahlreiche Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene C₄, D₄, E₄ und Zytokine (u.a. IL-5) und steuern so direkt die Kontraktion von glatter Muskulatur, weiterhin verstärken sie die Schleimsekretion und Th2 Aktivierung. Durch eine hohe Sezernierung von IL-5, kommt es zu einem autokrinen Feedbackmechanismus und zur Verhinderung der Apoptose. Die Eosinophilen, deren Anzahl durch verringerte Apoptose erhöht ist setzen durch Degranulierung vermehrt MBP (major basic protein)

frei. Dies wiederum verursacht die Degranulierung von Mastzellen und Basophilen. Die Ausschüttung von Enzymen wie Metalloproteinasen und Kollagenasen hat auch zur Folge, dass die Bindegewebematrix umgebaut wird und somit die pulmonale Obstruktion verstärkt und der Gasaustausch behindert wird (3, 7).

Andere Zellpopulationen, die eine wichtige Rolle bei Asthma bronchiale spielen sind Makrophagen und Monozyten. Diese exprimieren verschiedene Oberflächenmarker wie CD23, CD14 und MHCII. In der Lunge produzieren die Alveolarmakrophagen im Rahmen der Entzündungsreaktion eine erhebliche Menge an IL-6, IL-1, IL-8, IL-12, TNF- α , GM-CSF und andere Chemokine wie z.B. Eotaxin (7, 11, 12). Weiterhin beeinflussen die Makrophagen auch die Proliferation der T-Zellen und sind an der Antigenpräsentation maßgeblich beteiligt (13).

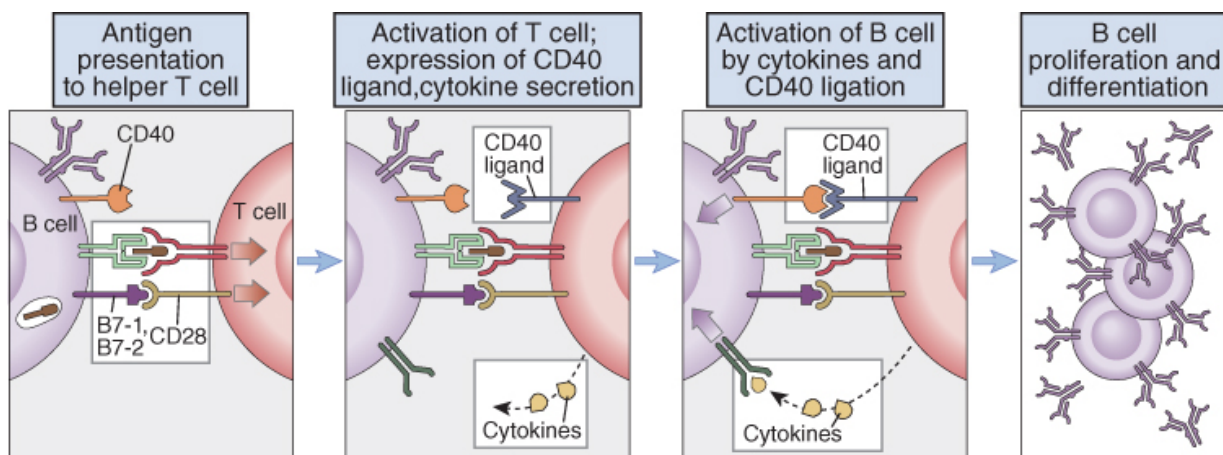
Die neutrophilen Granulozyten bilden mit 50 bis 80 Prozent im Blut die zahlenmäßig stärkste Population der Leukozyten. Sie sind die umfangreichsten und wichtigsten Funktionsträger der unspezifischen Immunabwehr (für Phagozytose und Exozytose verantwortlich). In der Lunge ist der neutrophile Granulozyt hauptsächlich im vaskulären Kompartiment lokalisiert. Seine durchschnittliche Lebensdauer beträgt dort 6-8 Stunden. Nach einem inflammatorischen Stimulus kommt es meist zu einem schnellen nicht selten massiven Einstrom der neutrophilen Granulozyten in das alveoläre Kompartiment. und zur Reduzierung der Partikel, welche die Entzündung fördern (14). Der Einstrom in das Lungengewebe wird unter anderem vom IL-8 und IL-17 beeinflusst (15).

Einer der wichtigsten Zellpopulationen, die in der Spätphase des Asthma bronchiale ebenfalls eine große Rolle spielt, sind die T-Lymphozyten. Diese kommen vermehrt in den Lungen von Asthmatikern vor und sind für die Sezernierung zahlreicher Mediatoren und Zytokine verantwortlich (4, 16). Die T-Lymphozyten werden in drei Subpopulationen unterteilt:

1. antigenspezifische T-Helfer (TH)-Zellen (CD4+ Zellen)
2. antigenunspezifische natürliche T-Killer (Nk Zellen)
3. zytotoxische T(TC)-Zellen (CD8+ Zellen)

Die Aktivierung von Zellen wird durch Antigene und damit verbundene kostimulatorische Faktoren (z.B. oberflächliche Glycoproteine wie B7-1/B7-2--CD28/CTLA-4 und ICOS-

B7RP-1) reguliert. So hat man anfangs fälschlicherweise angenommen, dass die Blockade von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die an CD28 binden, eine Toleranz induziert. Man erkannte jedoch, dass erst die Bindung von B7-1 und B7-2 an die APC (antigenpräsentierende Zelle) und den CTLA-4 eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Anergie in vivo spielt (17, 18). Diese Feinabstimmung der Immunantwort ist für die Differenzierung wichtig und spielt eine folgenschwere Rolle bei der asthmatischen Reaktion. Dadurch wird die Vorstellung, dass Promotor- Polymorphismen eine Erklärung für genetische Prädisposition und die Entwicklung von allergischen Erkrankungen sind, nachvollziehbar (19, 20).



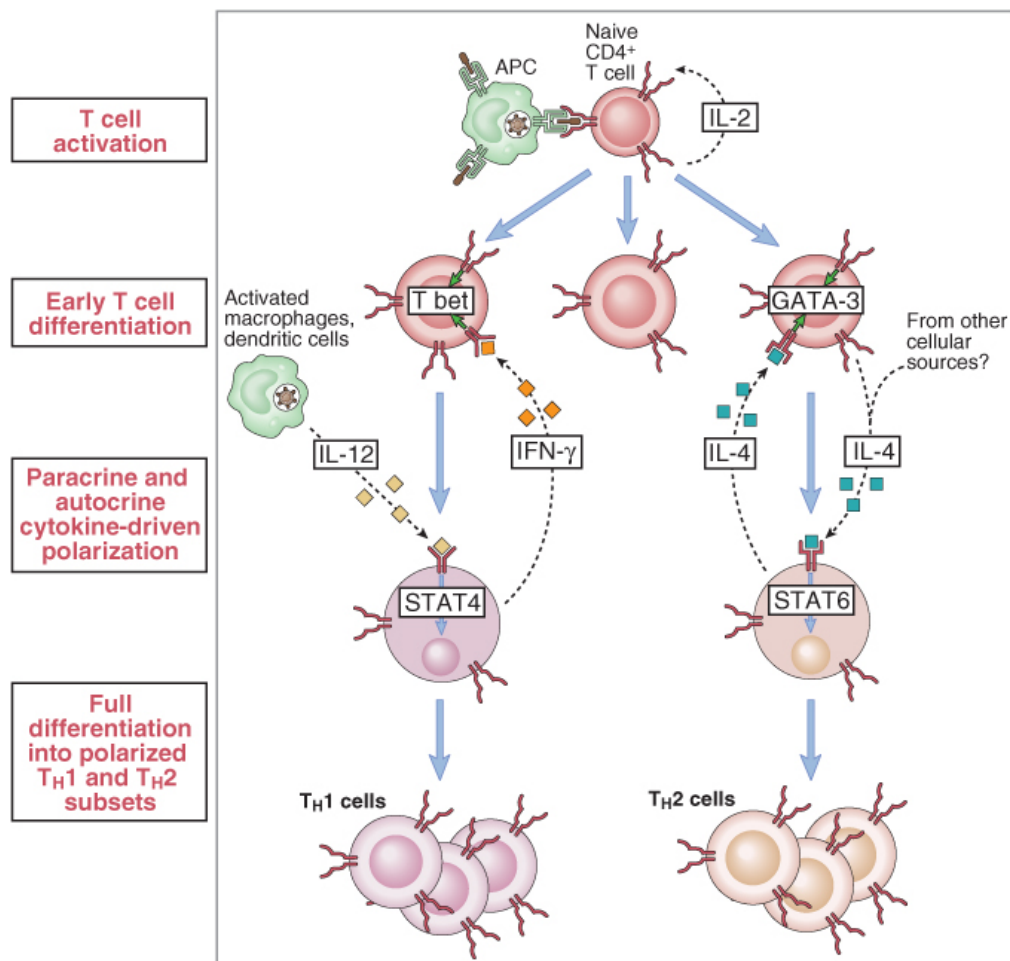
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Abbildung 1: Antigenpräsentation und Aktivierung der T-Lymphozyten (19)

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch die Präsentation eines durch Endozytose der B-Zellen gewonnenen Proteins und durch die gleichzeitige Expression der Kostimmulationsfaktoren B7-1 und B7-2. Dabei wird das Antigen durch die T-Zelle in Form eines Peptid-MHC Komplexes erkannt und bewirkt eine Expression des CD40 Ligands sowie die Sekretion von Zytokinen. Die Bindung des CD40L an das CD40 der B-Zelle, initiiert die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle. Die B-Zelle wird ebenfalls durch die von der T-Zelle produzierten Zytokine stimuliert.

Die nicht aktivierten, d.h. ruhenden T-Helfer-Zellen können sich nach Stimulation durch bestimmte Zytokine in unterschiedliche Subtypen differenzieren. Die Freisetzung der Zytokine ist vor allem durch die Aktivierung unterschiedlicher Gene gesteuert. Dabei spielen Gendefekte und Genisoformen, wie anhand von KO Mäusen des öfteren demonstriert wurde, eine entscheidende Rolle. So ist z.B. der T-box transcription factor (T-bet) entscheidend für die Th1 Zelldifferenzierung und somit auch unmittelbar für die

Entwicklung von spontanem Asthma mitverantwortlich (21). Im Gegensatz dazu spielt der Transkriptionsfaktor GATA-3 eine entscheidende Rolle bei der Th2 Differenzierung (19, 22, 23). Das Gleichgewicht der Th1 und Th2 Differenzierung wird weiterhin durch andere Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, c-maf, NIP45 und viele andere beeinflusst.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Abbildung 2: Schematische Darstellung von Th1 und Th2 Zelldifferenzierung (19)

Naive CD4⁺ T-Zellen können im Rahmen einer Immunantwort zu Th1 als auch zu Th2 Zellen differenzieren. Bei der Th1 Differenzierung spielt das IL-12, welches von aktivierten Makrophagen als auch von Dendritischen Zellen produziert wird, eine entscheidende Rolle. Die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Th1 Zellen wird durch den STAT-4 abhängigen „pathway“ induziert. Im Gegensatz dazu spielt das IL-4, das hauptsächlich von T-Zellen produziert wird, eine Rolle bei dem Th2 „pathway“, der STAT-6 abhängig ist.

Bei allergischem Asthma kommt es vermehrt zu Bildung von Th2-Zellen, welche eine humorale Immunantwort hervorrufen. Diese Zellen produzieren vor allem die

asthmaspezifischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-17, was zur Aktivierung von Eosinophilen, B-Zellen und T-Zellen, als auch zur Freisetzung weiterer Chemokine, wie z.B. Eotaxin führt. (3, 16, 24, 25). Das IL-4, welches im Serum und in der BAL von Asthmatikern vermehrt gefunden wird, ist hauptsächlich für die Th2 Differenzierung, Proliferation der Mast- und T-Zellen, als auch für die Makrophageninhibition verantwortlich. Die Aktivierung und Proliferation von Eosinophilen und der B-Zellen wird durch IL-5 gesteuert, das entscheidend zur Blut- und Gewebseosinophilie bei Asthma beiträgt. Ein weiterer Th2 Vertreter, der die Pathogenese von Asthma beeinflusst, ist das IL-13, das die Makrophagen inhibiert und zugleich für die Mucusproduktion in der Lunge unverzichtbar ist. Ferner wird die Produktion von IL-13 unter anderem durch die Sekretion von IL-9 bestimmt (24).

Die Rolle des IL-17 ist bei Asthma bronchiale bis dato umstritten. Zweifellos fördert das Zytokin IL-17A im Anfangsstadium die Entwicklung von Asthma durch Expansion der hämatopoetischen Progenitorzellen sowie der neutrophilen Granulozyten. Dadurch ist es ein wesentlicher Faktor während der Antigensensibilisierung und der Pathogenese von Asthma (26-28). Andererseits kann IL-17 auch eine protektive Funktion im chronischen Asthmodell aufweisen. Es verringert während der lokalen Antigensensibilisierung sowohl die Dysfunktion und Inflammation der Lunge, als auch die Hypersekretion der epithelialen Mukuszellen (29). Die Differenzierung der Th17 Zellen, welche IL-17A produzieren, kann auf mehreren Wegen initiiert werden. Dabei spielen die Zytokine IL-6, TGF- β aber auch das IL-21 und IL-23 eine große Rolle (Abbildung 3) (30).

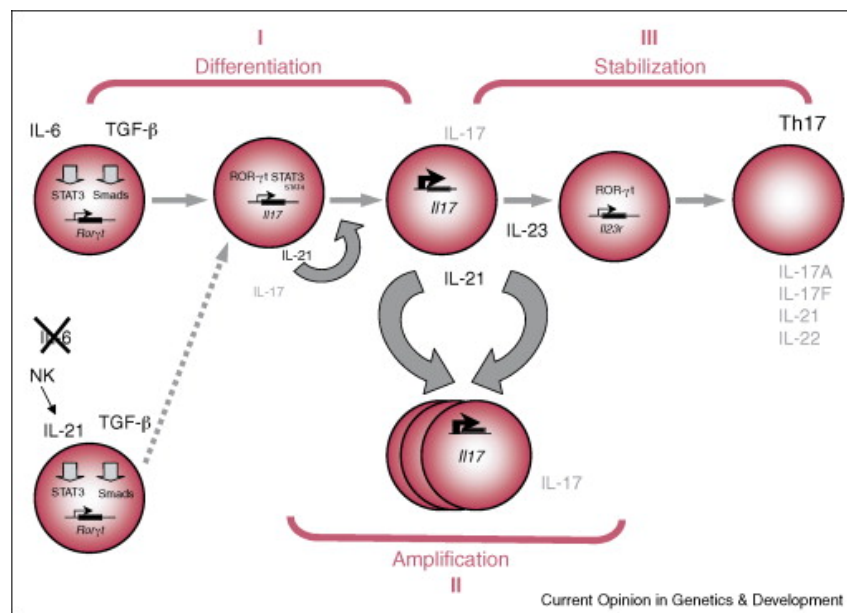


Abbildung 3: die Differenzierung der Th17 Zellen

Die Entwicklung der Th17 Zellen wird durch Aktivierung der naiven T-Zellen durch die Zytokine IL-6 und TGF- β induziert. Dies führt zur Expression von ROR- γ 1 und zur Produktion von IL-17. Alternativ kann die IL-17 Produktion durch das von den NK/NKT Zellen stammende IL-21 und TGF- β induziert werden. Obwohl das IL-23 für die Entstehung der Th17 Zellen nicht nötig ist, so hat es einen stabilisierenden Effekt und hat einen Einfluss sowohl auf die Expansion als auch auf das Fortbestehen der Th17 Zellen

IL-10 ist ein weiteres Th2-Zytokin, das von einer Vielzahl von Zellen produziert werden kann (z.B. CD4+/CD8+-T-Zellen, Makrophagen, Dendritische-, B- und NK Zellen). Es hat einen modulativen Effekt auf angeborene und adaptive Immunität. Lange nahm man an, dass dieses Zytokin nur von Th2-Zellen produziert wird, da man es bei Asthmatikern und anderen chronischen Erkrankungen in hohem Maße nachweisen konnte. Heute weiß man, dass IL-10 hauptsächlich von T-regulatorischen Zellen freigesetzt wird (7, 19, 31-34). Regulatorische T-Zellen der Maus, kann man in zwei grobe Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe sind die kontaktabhängigen CD4+ CD25+ FOXP3+ GITR+ CTLA4+ Tregs, welche IL-10 und TGF- β unabhängig sind. Die zweite Gruppe sind induzierbare Tregs, die wiederum in mehrere Populationen unterteilt werden (35). Unter der Vielzahl induzierbarer Tregs, die in den letzten Jahren beschrieben wurden, sind nur zwei Populationen eindeutig definiert und identifiziert worden. Diese sind T regulatory type 1 (Tr1-) und Th3-Zellen, die beide ihre suppressiven Eigenschaften primär über lösliche Faktoren wie IL-10 oder TGF- β vermitteln. Tr1-Zellen produzieren nach Aktivierung über

ihren T-Zellrezeptor IL-10, während Th3-Zellen ihre suppressiven Eigenschaften über das Zytokin transforming growth factor- β (TGF- β) vermitteln (33). Die Funktion von IL-10 liegt in der Inhibition der Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und vor allem der T-Zellen, die für das chronische Asthma von größter Bedeutung sind.

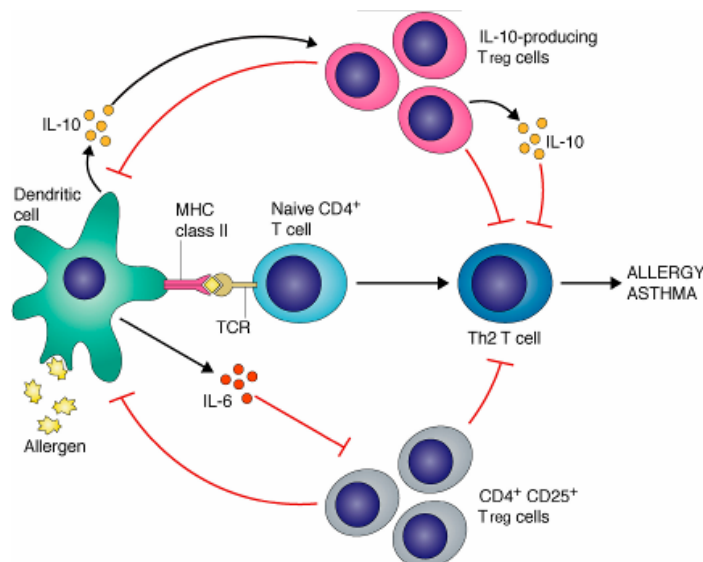
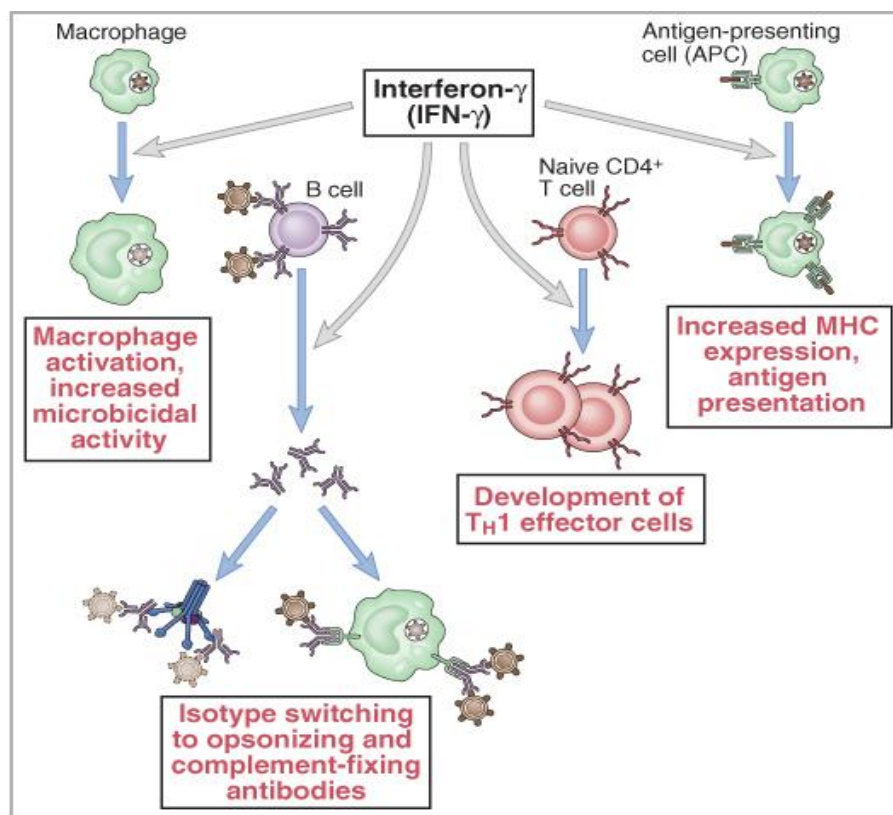


Abbildung 4: Kontrolle der allergischen Reaktion durch Tregs (33)

Die für die asthmatische Reaktion wichtige Th2 T-Zellen, werden sowohl von den kontaktabhängigen, als auch von den IL-10, TGF- β produzierenden T-regulatorischen Zellen suprimiert. Zusätzlich werden ebenso andere Zellpopulationen wie z.B: Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, als auch unterschiedliche Subtypen der T-Zellen direkt oder indirekt durch die T-regulatorischen Zellen gehemmt.

Obwohl man die Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th2 oder Th1 genauestens untersucht hat, ist es immer noch unklar warum eine proliferierende Zelle zu einer Th1- oder Th2-Zelle wird. Eine bedeutende Rolle bei der Th1-Differenzierung spielt IL-12, welches von dendritischen Zellen und Makrophagen freigesetzt wird. Differenziert sich eine Th1-Zelle aus, so kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort. Die Th1-Zellen sezernieren ihrerseits IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Tumor-Nekrose-Faktor-beta (TNF- β) und Interferon-Gamma (IFN- γ) und sind wesentlich für die Infektabwehr, Fremdgewebeerkennung und bestimmte andere Komponenten der Immunabwehr (z.B. Tumorzellvernichtung) verantwortlich.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Abbildung 5: Biologische Aktivität von IFN- γ (19)

Die Rolle des IFN- γ ist vielseitig. Neben der Aktivierung der Makrophagen und der APC's (Antigenpräsentierende Zellen), ist es auch für die Aktivierung der B-Zellen verantwortlich. Dabei kommt es zu einer Änderung des Isotyps (vorwiegend IgG2a) und einer Blockade der IL-4 abhängigen Isotypen IgE und IgG1. Die Wirkung des IFN- γ auf naive Zellen besteht darin, die Th1 Entwicklung zu fördern und damit die Proliferation der Th2 Zellen zu hemmen.

Bei der asthmatischen Reaktion gehört IFN- γ zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen. Man hat bei asthmatischen Patienten beobachtet, dass der IFN- γ Level signifikant erniedrigt ist (21, 36). Im Gegensatz dazu führt die IFN- γ Gabe zu Reduzierung der Th2-Zelldifferenzierung und damit zum Rückgang von IL-4 und IL-5. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, dass die Gabe von IFN- γ nach Allergenexposition einen signifikanten Rückgang an Eosinophilie und eine Zunahme der IL-10 Produktion zur Folge hat (37). Auf der anderen Seite ist IFN- γ bei der Prozessierung von MHCII Molekülen auf dendritischen Zellen und Makrophagen beteiligt. Damit wird die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf Epithel- und

Endothelzellen eingeleitet, so dass IFN- γ für die Entwicklung der chronischen Inflammation unabkömmlich wird. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im Anfangsstadium der Entzündung ein erhöhter Level an IFN- γ bei Asthmapatienten gefunden wurde (38). Obwohl IFN- γ im Anfangsstadium einer Entzündung benötigt wird, ist es für die weitere Th1-Differenzierung unabkömmlich. Die Th1-Zellen können dann zu einem späteren Zeitpunkt große Mengen von diesem „antiinflammatorischen“ Zytokin produzieren. Eine Initialmenge an IFN- γ muss daher auch von anderen IFN- γ produzierenden Zellen stammen. Zu diesen gehören die zweite und dritte T-Lymphozyten-Population, nämlich die NK und CD8+ Zellen (39, 40).

Die Rolle der NK-Zellen bei Asthma bronchiale ist jedoch immer noch umstritten. Obwohl die Zahl von NK-Zellen in der BAL und im Lungenparenchym bei einer asthmatischen Reaktion ansteigt, ist der Anstieg mit dem der CD4+ und CD8+ T-Zellen vergleichbar (40, 41). Man vermutet, dass NK-Zellen eine Rolle bei der Frühaktivierung spielen, da man nach Depletion der NK- und NKT-Zellen vor Immunisierung eine erniedrigte Eosinophilie und eine geringere T-Lymphozyten-Infiltration beobachtet hat (42). Die Depletion der beiden NK-Sorten führt jedoch während der Allergenexposition zu keiner signifikanten Erniedrigung des IgE-Spiegels bzw. des Th2-Zytokin-Levels (43). Die Rolle der CD8+ T-Zellen bei Asthma bronchiale, die ähnlich wie die NK-Zellen eine Initialmenge an IFN- γ für die TH1-Zelldifferenzierung liefert, ist immer noch unzureichend geklärt (39, 44). Es wurde in Versuchen gezeigt, dass CD8+ defiziente Mäuse eine erniedrigte AHR, eine reduzierte Eosinophilie und einen erniedrigten IL-13 Spiegel aufweisen (45). Weiterhin wurde bei Asthmatikern beobachtet, dass der INF- γ Level sowohl in den CD4+ als auch in der CD8+ T-Lymphozyten erniedrigt war (46). Neuste Ergebnisse weisen darauf hin, dass allergenspezifische CD8+ T-Zellen eine erhöhte Infiltration vorweisen und eine Erniedrigung des IgE-Spiegels nach sich ziehen (47). Darüber hinaus können antigenspezifische CD8+ Zellen die Freisetzung von IL-4 aus CD4+ Zellen inhibieren (48, 49).

1.3 NFAT Proteine: Aktivierung und Regulation

NFATc2 (nuclear factor of activated T cells c2) gehört zur Familie der nuclear factor of activated T cells (NFAT) Transkriptionsfaktoren. Ursprünglich wurde NFAT als induzierbarer Transkriptionsfaktor beschrieben, der in der aktivierten Zelle an den IL-2 Promotor bindet. Heute kennt man fünf NFAT Mitglieder: nämlich NFATc1 (NFAT2, NFATc), NFATc2 (NFAT1, NFATp), NFATc3 (NFAT4, NFATx), NFATc4 (NFAT3) und NFAT5 (TonEBP), die bis auf NFAT5 alle verschiedene Isoformen besitzen. Alle NFAT Proteine haben eine sehr hohe konservierte DNA-bindende Domäne, die strukturell den REL-Transkriptionsfaktoren ähnelt (RHR)(50-52).

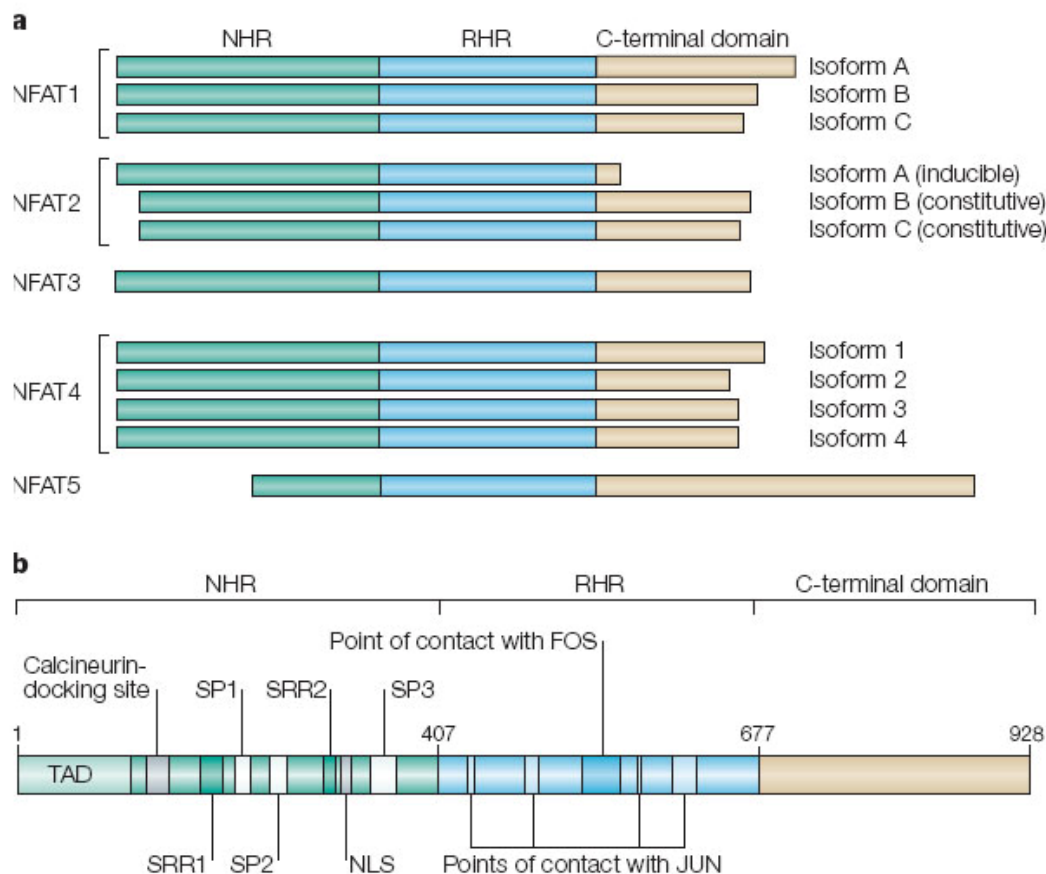


Abbildung 6: Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren (51)

Die NFAT Familie besteht aus 5 Mitgliedern, die bis auf NFAT5 alle mehrere Isoformen besitzen. NFAT-Transkriptionsfaktoren zeigen eine stark konservierte DNA-bindende Domäne (RHR), die strukturell eine Verwandtschaft zur DNA-bindenden Domäne der Familie der REL-Transkriptionsfaktoren aufweist. Neben dieser DNA-bindenden Domäne zeigen zumindest alle NFATc-Formen eine Regulationsdomäne

Neben der RHR Domäne, besitzen die Proteine eine Regulationsdomäne, die auch als NFAT-homologe Region (NHR) bekannt ist. Diese beinhaltet eine Transaktivierungsdomäne, einen Abschnitt mit mehreren Serin-Resten (diese sind in der nicht aktivierten Zelle phosphoryliert) und eine Calcineurin-Bindungsstelle, welche an der Regulation maßgeblich beteiligt ist (51). Die ersten vier NFAT Mitglieder werden durch Calcium und Calcineurin aktiviert, das fünfte Mitglied durch osmotischen Stress. Wie in dem Schaubild dargestellt, führt die Stimulation des TZR zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten-Tyrosinkinase, die wiederum die Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktiviert. Die PLC- γ hydrolysiert das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃). Letzteres verursacht durch die Bindung an den InsP₃-Rezeptor die Freisetzung von Calcium. Das Calcium bindet seinerseits an Calmodulin, welches die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Hierdurch kommt es zur Dephosphorylierung von NFAT, das in den Nukleus wandert.

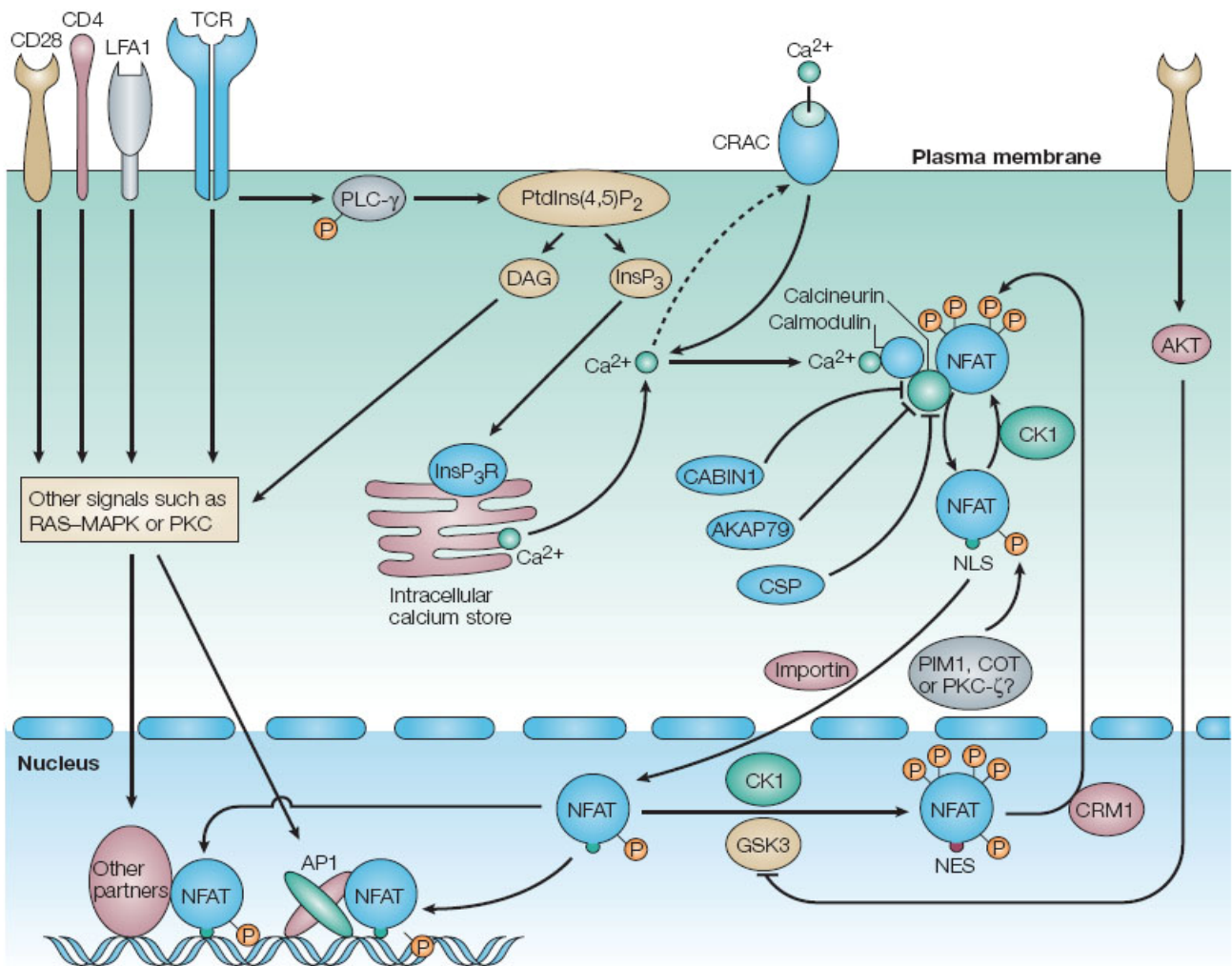


Abbildung 7: Regulation der NFAT Aktivität (51)

Schematische Darstellung der NFAT Aktivierung mittels Dephosphorylierung. Im Nucleus kann NFAT mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren interagieren (siehe Tabelle 1) Diese Interaktionen zeigen, indem sie verschiedenste Signaltransduktionswege miteinander verbinden die Komplexität der Genregulation in den Zellen des Immunsystems.

Im Zellkern angekommen erfolgt eine Aktivierung unterschiedlicher NFAT abhängiger Gene. Die Anzahl an identifizierten Transkriptionsfaktoren, die mit NFAT interagieren ist auf über zehn angestiegen (51, 53-56) und wird in der unteren Tabelle dargestellt.

Transkriptionspartner	Promoter	Auswirkung
AP1 (FOS,JUN)	Unterschiedliche Zytokin-Promotoren	Transaktivierung
C/EBP	PPAR- γ Promotor	Transaktivierung
MAF	IL-4 Promotor	Transaktivierung
ERG1 und ERG4	TNF Promotor	Transaktivierung
GATA3	IL-4 3'-Enhancer	Transaktivierung
ICER	Unterschiedliche Zytokin-Promotoren	Inhibition von NFAT
IRF4	IL-4 Promotor	Transaktivierung
MEF2	NUR77 Promotor	Transaktivierung
OCT	IL-3 Enhancer	Transaktivierung
p21 ^{SNFT}	IL-2 Promotor	Inhibition von NFAT
PPAR- γ	IL-2 Promotor	Inhibition von NFAT
T-bet	IFN- γ 5'-Enhancer	Transaktivierung

Tabelle 1: Transkriptionspartner der NFAT Familie

Unter anderem wurde auch bereits demonstriert, dass NFAT nicht nur bei der Zellaktivierung eine Rolle spielt, sondern auch bei der Auto-Antigen-Entwicklung und bei der Lymphozytenproliferation (57, 58). Man hat weiterhin gefunden, dass ein Heterodimär, welches aus NFAT und FOXP3 besteht, an die NFAT/AP-1 Bindungsstelle bindet (52, 59) und die Treg Population aktiv beeinflusst.

Obwohl die Funktion von NFAT größtenteils an verschiedenen Zelllinien untersucht wurde, kennt man die Funktion einzelner Transkriptionsfaktoren der NFAT Familie bei der Th-Zelldifferenzierung unzureichend. Bis auf NFATc4 werden alle Mitglieder der NFAT Familie in Zellen des Immunsystems exprimiert und spielen daher auch bei Asthma bronchiale eine große Rolle. Ein gutes Beispiel für die Bedeutung der NFAT Transkriptionsfaktoren bei der Zelldifferenzierung, ist der Th1 und Th2 „Pathway“ (60). Hierbei bindet NFAT während der Frühphase der T-Zelldifferenzierung sowohl an den IFN- γ als auch an den IL-4 Promotor (61), im späteren Verlauf kommt es jedoch zu einer

punktuellen Aktivierung der entsprechenden Gene und einer selektiven Zytokinfreisetzung der Zelle (62, 63).

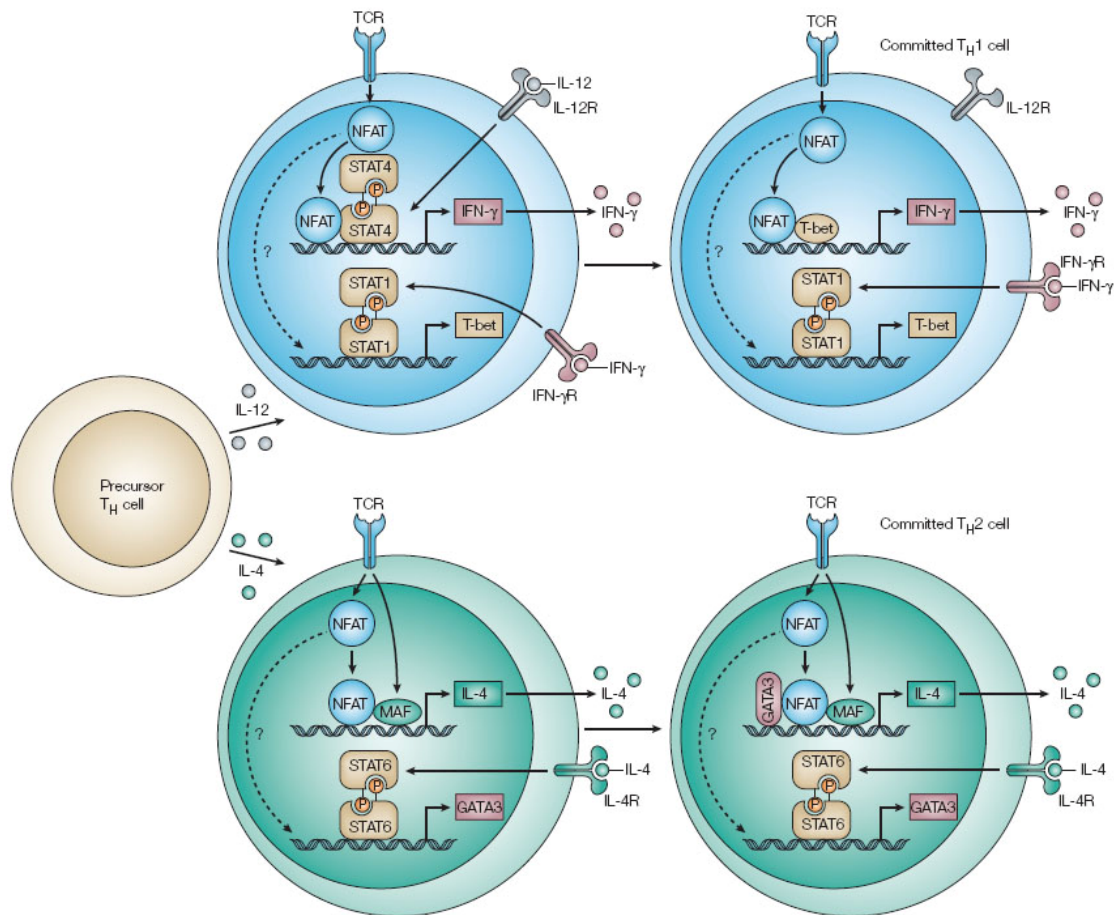


Abbildung 8: NFAT und die Differenzierung der Th-Zellen (51)

NFAT spielt sowohl eine Rolle bei der Th1 als auch bei der Th2 Differenzierung naiver T-Zellen. Die Differenzierung kann in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird die Zytokinproduktion durch Transkriptionsfaktoren, welche durch den TZR aktiviert wurden, induziert. Dabei kann NFAT in den Th1 T-Zellen mit dem STAT-4 oder in den Th2 T-Zellen mit MAF interagieren und damit eine IL-12 bzw. IL-4 Produktion induzieren. Im zweiten Schritt interagiert NFAT mit T-bet (Th1 Zellen) bzw mit GATA3 (Th2 Zellen) und führt somit zu einer Autoregulation und zu einem „positiven feedback“ der Th-Zell-Differenzierung

Diese selektive Zytokinfreisetzung wird durch die verschiedenen Mitglieder der NFAT Familie gesichert und wurde unter anderem mit Hilfe von Knockout Mäusen untersucht (53). Um jedoch den Rahmen dieser Einleitung nicht zu sprengen, wird hier nur auf NFATc2 (NFATp bzw. NFAT1) eingegangen.

1.4 Die Rolle von NFATc2 bei Asthma bronchiale

NFATc2 gehört neben NFATc1 zu den am besten untersuchten NFAT Mitgliedern. Bereits vor 10 Jahren wurde NFATc2 mit der Regulation von IL-4 und IL-5 bei Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht (58, 64). In NFATc2 defizienten Mäusen wurden vermehrte Mengen an IgE und proinflammatorischen Zytokinen, die der Th2 Gruppe angehören (IL-4, IL-5 und IL-13) gefunden. Hierbei wurde mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt, dass NFATc2 sowohl an den IL-4 Promotor, als auch an den distalen Enhancer in den Th2-Zellen jedoch nicht an den IL-4 Promotor in den Th1-Zellen bindet. Andererseits bindet NFATc2 auch an den IFN- γ Promotor der Th1-Zellen, jedoch nicht an den der Th2-Zellen (53, 62). Dies erklärt auch weshalb NFATc2 defiziente Mäuse unter bestimmten Konditionen eine vermehrte IL-4 als auch IFN- γ Produktion in den CD4⁺ T-Zellen vorweisen.

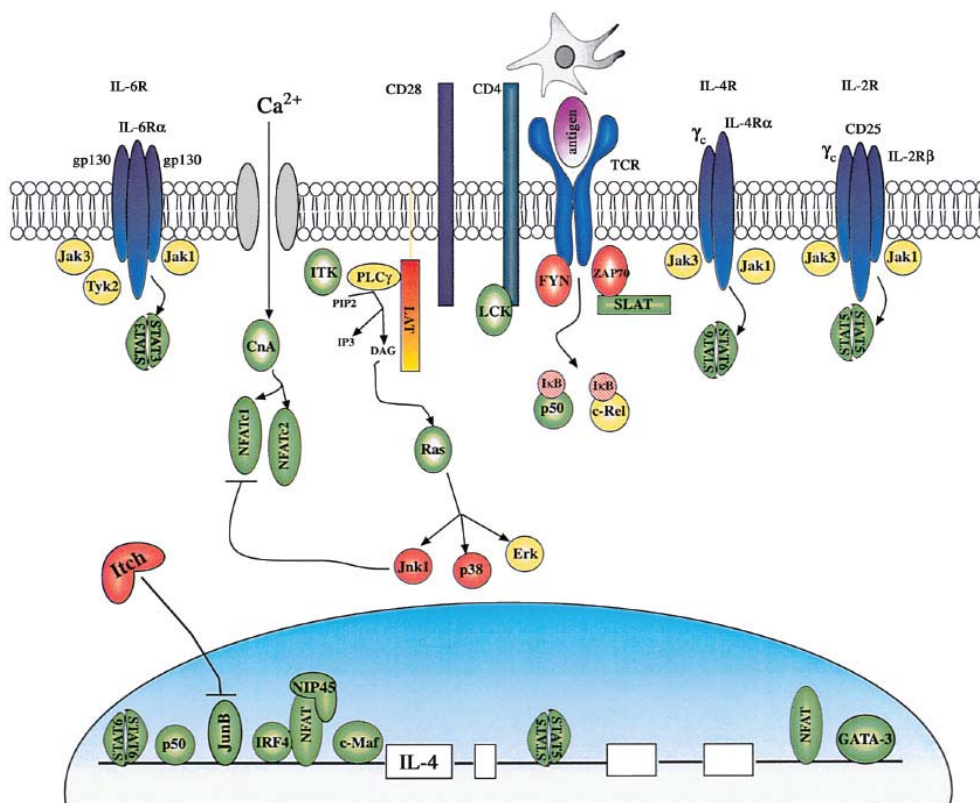


Abbildung 9: Interaktion von NFATc2 mit dem IL-4 Promotor (65)

Darstellung von unterschiedlichen Faktoren, die eine positive Rolle in der Th2 Differenzierung spielen (grün). Die Rot dargestellten Faktoren wirken der Th2 Differenzierung entgegen.

Wie bereits erwähnt, spielt IFN- γ ebenso eine wichtige Rolle bei Asthma bronchiale wie die Th2-Zytokine. Untersuchungen der BAL- und der Lungenzellen zeigen jedoch, dass nicht CD4+ T-Zellen, sondern CD8+ T-Zellen das meiste IFN- γ freisetzen. NFATc2 hat auch hier eine große Bedeutung. NFATc2 defiziente Mäuse weisen eine geringere IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den Wildtypen auf. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die CD8+ Population aktiv die IL-4 Produktion der CD4+ T-Zellen und die Eosinophile beeinflusst (66).

Die Balance zwischen den verschiedenen NFAT Familienmitgliedern hat auch einen Einfluss auf die Mastzellen. So wurde NFATc2 als ein essenzieller Transkriptionsfaktor für die IL-13, als auch für die TNF- α Produktion der Mastzellen identifiziert (9, 67).

1.5 Zielsetzungen und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von NFATc2 bei Asthma bronchiale und die Mechanismen dieses Gens in den Immunzellen der Lunge zu untersuchen. Derzeit sind die Messung des Atemwegswiderstandes bei den NFATc2 Knockout Mäusen sowie die immunologischen Mechanismen in der Lunge nur unzureichend untersucht.

Folgende Fragestellungen sollen daher bearbeitet werden:

1. Wie hoch ist die Differenz des Atemwegswiderstandes zwischen den NFATc2 defizienten und Wildtyp Mäusen mit und ohne Sensibilisierung durch OV-Albumin (OVA)?
2. Welche Zytokinfreisetzung findet man vermehrt in den Immunzellen der NFATc2 defizienten Mäuse. Welchen Aktivierungsstatus zeigen diese Immunzellen? Können sie mit den bisher publizierten Daten in Einklang gebracht werden?
3. Welche Zellpopulationen spielen eine Rolle bei der Entwicklung des Atemwegswiderstandes und wodurch werden sie reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Antikörper

anti-mouse CD28:	BD Biosciences Pharmingen
anti-mouse CD3ε:	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (H129.9):	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) PE:	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) APC:	BD Biosciences Pharmingen
CD8 α (Ly-2) PE:	BD Biosciences Pharmingen
CD8 α (Ly-2) APC:	BD Biosciences Pharmingen
CD25 PE-Cy5.5:	Caltag Invitrogen GmbH
CD44 (Pgp-1, Ly-24) PE-Cy5:	BD Biosciences Pharmingen
CD49b (DX5) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
CD69 (H1.2F3) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
CD69 (H1.2F3) PE:	BD Biosciences Pharmingen
CD122 (TB b1) PE:	BD Biosciences Pharmingen
FOXP3 (FJK-16a) APC:	eBioscience
H-2Db MHC1 PE:	Caltag Invitrogen GmbH
ISO IgG2a (KLH) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2a (KLH) PE:	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) PE:	BD Biosciences Pharmingen
IFN γ (XMG1.2) FITC:	BD Biosciences Pharmingen
IL10 (JES5-16E3) APC:	BD Biosciences Pharmingen

2.1.2 Beads

CD4 (L3T4) Microbeads:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD8 (Ly-2) Microbeads:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD11c (N418) Microbeads:	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

2,2,2-Tribromethanol:	Fluka, Buchs, Schweiz
3,3,5,5-Tetramethylbenzidin:	Fluka, Buchs, Schweiz
Aceton:	Roth, Karlsruhe
Albumin bovine Fraction V pH7.0:	SERVA Electrophoresis GmbH
Albumin, chicken egg, 5 x crystalline:	Calbiochem, Bad Soden
Aluminium potassium sulfate:	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl:	Riedel-de Haen, Seelze
Ammoniumperoxidsulfat:	Roth, Karlsruhe
Aprotinin from bovine lung:	Sigma, Taufkirchen
Aqua dest.:	Braun, Melsungen
Assay Diluent für Elisa:	BD Biosciences Pharmingen
BSA Albumine, bovine:	Sigma, Taufkirchen
Casy Ton:	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy clean:	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Citronensäure-Monohydrat:	Merck, Darmstadt
Collagenase Type II:	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
Disodium-EDTA:	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Di-Natriumhydrogenphosphat:	Merck, Darmstadt
DNase I:	Quiagen, Hilden
Ethanol absolut:	Merck, Darmstadt
FCS (Fetal Calf Serum):	Biochrom, Berlin
Glycerin wasserfrei:	Merck, Darmstadt

Glycin:	Roth, Karlsruhe
HRP Streptavidin:	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3 :	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydroxid KOH:	Merck, Darmstadt
Methacholinchlorid:	Sigma, Taufkirchen
Methanol:	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat:	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid:	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat:	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat:	Merck, Darmstadt
Natronlauge:	Merck, Darmstadt
Nonidet P 40:	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyde:	SERVA Electrophoresis GmbH
PBS:	Dulbecco Biochrom KG, Berlin
PBS Dulbecco:	Biochrom AG, Berlin
PBS EDTA pH7,5 BioWhittaker:	Cambrex Bio Science, Verviers
Penicillin/ Streptomycin:	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island,NY
Pentobarbital (Narcoren)	Merial, Rohrdorf
Pufferlösung pH 7,00:	Merck, Darmstadt
Pufferlösung pH 4,00:	Merck, Darmstadt
RPMI 1640 Medium:	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island,NY
Salzsäure 25%:	Merck, Darmstadt
Saponin:	Sigma, Taufkirchen
Schwefelsäure:	Merck, Darmstadt
SDS:	Roth, Karlsruhe
Sodium Azide:	Sigma, Taufkirchen
TEMED:	Roth, Karlsruhe
Tricin:	Roth, Karlsruhe
TRI REAGENT™:	Sigma, München
Tris:	Sigma, Taufkirchen
Trypan blue stain 0,4%:	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island,NY
Trypsin-Inhibitor:	Sigma, Taufkirchen

Tween 20:	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid:	Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer

ELISA Lösungen und Puffer

Carbonat Coating Buffer:	0,356g Na ₂ CO ₃ + 0,84g NaHCO ₃ ad 100ml Aqua dest. auf pH 9,5 einstellen
Phosphat Coating Buffer:	1,18 g Na ₂ HPO ₄ + 1,61 g NaH ₂ PO ₄ ad 100ml Aqua dest. auf pH 6,5 einstellen
TMB-Lösung:	120mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 2,5ml Aceton gelöst 22,5ml Ethanol abs. +150µl H ₂ O ₂ 30%
Substratpuffer:	6,3g Citronensäure-Monohydrat ad 1000ml Aqua dest, pH 4,1 mit 4N KOH einstellen
Abstopplösung:	28ml H ₂ SO ₄ (97%) ad 500ml Aqua dest.
Waschpuffer:	0,005% Tween 20 in PBS

FACS Lösungen und Puffer

FACS-Puffer:	1x PBS, 5% FCS, 0,1% NaN ₃
Saponin-Puffer:	0,5% Saponin, 0,5% FCS 0,1% NaN ₃ in PBS
PFA 4%:	40 g Paraformaldehyd ad 800 ml PBS, pH 7,0-7,4 einstellen über Nacht bei 60°C lösen, auf RT abkühlen lassen und ad 1l PBS auffüllen

Weitere Puffer und Lösungen

ACK-Lyse Puffer	8,29g NH ₄ Cl, 1,0g KHCO ₃ , 0,367g Na ₂ EDTA an 1l H ₂ O, einstellen mit NaOH auf 7 pH 2-7,4
Coating Buffer:	NaHCO ₃ , pH 8,2
MACS-Puffer:	2% FCS in PBS 4mM EDTA entgasen
Zellkulturmedium:	5% bzw. 10 % FCS in RPMI-Medium, 1% Penicillin/Streptomycin
OVA/Alum:	500 µg/ml OVA in 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1 mischen mit 10% Aluminiumkaliumsulfat (Alum) mit NaOH auf pH 6,5 einstellen, 1h bei RT unter Lichtausschluss inkubieren, für 5 Minuten

	bei RT zentrifugieren (1500 rpm). Pellet ad 10 ml 0,9% NaCl resuspendieren
Saline/Alum:	0,9% NaCl zu gleichen Teilen mit 10% Aluminiumkaliumsulfat mischen, weitere Vorgehensweise wie unter OVA/Alum beschrieben
TAE Puffer (50X):	eine Lösung von 2 M Tris-Base und 0,05M EDTA wird mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt
Willi Puffer (Ohrbiopsie):	100mM Tris pH 8,5; 200mM NaCl; 10mM EDTA, 0,2% SDS

2.1.5 Konfektionierte Kits

CD25 Microbeads Kit:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
GolgiStop Protein Transport Inhibitor Kit:	BD Biosciences Pharmingen
IL-13 Elisa mouse Kit (DuoSet®):	R&D Systems, Wiesbaden
IL-15 Elisa mouse Kit (DuoSet®):	R&D Systems, Wiesbaden
IL-17 Elisa mouse Kit (DuoSet®):	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IgE Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-4 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-5 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-10 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IFN- γ Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Rnasy Micro Kit (50)	Qiagen

2.1.6 Geräte

Biometra DOC Analyzer:	Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank 1, Binder CB210:	Binder GmbH, Tuttingen
Brutschrank 2, Cellstar:	Nunc, Wiesbaden
BUXCO:	BUXCO Electronics, Sharon, CT
Beta-Szintillationszähler:	LKB, Freiburg
Cell Harvester 1295-001:	LKB, Freiburg
Cytospin:	Shandon, Pittsburgh, PA
Dispergiergerät Micra D1:	ART Labortechnik, Müllheim
ELISA-Reader:	Dynex Technologies, Chantilly, VA
FACS Calibur:	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Vantage:	BD Pharmingen, Heidelberg
Gelkammer Mini-Protean:	Biorad, München
Glasgefäße:	Schott, Mainz
Kompaktschüttler KS 15A:	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Kühlschränke:	Liebherr, Bosch
Magnetrührer MR 3001:	Heidolph, Schwabach
Mikroskop IX 70:	Olympus, Hamburg
Mikroskop Nikon TMS S3:	Cambridge Scientific Products
Mikroskop Axioskop 2 mot plus:	Carl Zeiss GmbH, Jena
Neubauer-Kammer:	Roth, Karlsruhe
OctoMACS Separation Unit:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
pH-Meter:	InoLab, Weilheim
Photometer:	Biochrom, Berlin
Pipetten Eppendorf Reference:	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus:	Hirschmann Laborgeräte
QuadroMACS Separation Unit:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Sterilbank 1 Holten Laminair 1.5:	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank 2 Topsafe 1.5:	Nunc GmbH Wiesbaden
Schweißgerät Futura Jr.:	Audion Elektro, Weesp, NL
Thermomixer:	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge, gekühlt Biofuge fresco:	Heraeus Instruments, Hanau
Transferkammer Trans Blot Cell:	Biorad, München
Ultraschallbad Sonorex RK 510S:	Bandelin Electronic, Berlin
Vaccumpumpe MINI VAC E1:	PEQLAB Biotech. GmbH, Erlangen
Vortexer Reax Control:	Heidolph, Schwabach
Waagen AE50, PM300:	Mettler, Basel
Wasserbad:	Köttermann, Uetze/Hänsingen
Zellzählgerät CASY TT:	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Minifuge:	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0R Sorvall:	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.7 **Gebrauchsmaterialien**

Cellstar PP-Röhrchen 50ml, 15ml:	Greiner, Frickenhausen
Cryotubes:	Nunc, Wiesbaden
Deckgläser:	Menzel Gläser, Braunschweig
ELISA-Platte PS Microplatte 96 wells:	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen:	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Filme Biomax ML :	Kodak, Rochester, NY
Filterpapiere für Cytospin:	Shandon, Pittsburgh, PA
Glasplatten für Mini-Protean:	Biorad, München
Kamm:	Biorad, München
Kanülen, Sterican 0,45x12mm:	Braun, Melsungen
Kapillarspitzen 200µl:	Biozym, Oldendorf
MACS Separationssäule:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Magnetstäbchen:	Roth, Karlsruhe
Microküvette Nr.1201:	Ratiolab, Dreieich
Nitrocellulosemembran Protran :	Schleicher+Schuell, Dassel
Parafilm:	American National Can, Chicago, IL
Petrischale:	Nunc, Wiesbaden

pH Indikatorstäbchen 4,5-10,0:	Machery-Nagel, Düren
Pinzette:	FST, Heidelberg
Pipetten mit Spitze, steril:	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Standardtips:	Eppendorf, Hamburg
Polysine-Objektträger:	Menzel, Braunschweig
Reaktionsgefäße:	Eppendorf, Hamburg
Röntgenkassette:	Röntgen Bender, Baden-Baden
Scheren:	FST, Heidelberg
Sieb Cell strainer 40 µm Nylon:	BD Falcon, Bedford, MA
Skalpelle, steril:	Feather Safety Razor Co, Köln
Spatel:	Merck, Darmstadt
Spritze:	Injekta F 1ml
Sterilisationsfilter 22 µm:	Millipore, Bedford, MA
Whatman Filterpapier:	Whatman, Maidstone, GB
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 24 wells:	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 48 wells:	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 96 wells:	Nunc, Wiesbaden

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche werden fünf unterschiedliche Tierstämme verwendet, die im Alter von 7 bis 9 Wochen untersucht werden. Die NFATc2(-/-) Mäuse sind von Professor Laurie Glimcher (Harvard Medical School), die IFN- γ (-/-) Mäuse von Prof. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bereitgestellt worden, die dazugehörigen Vergleichstiere Balb/c J bzw. C57BL/6 kommen aus der universitären Zucht. Tiere, die für Zelltransferversuche gebraucht werden (SCID Mäuse), sind ebenfalls von der universitären Zucht bereitgestellt.

Der Genotyp der NFATc2 (-/-) Mäuse wird mit Hilfe der PCR bestimmt. Die Ohrbiopsien werden mit Willipuffer über 5h bei 55°C verdaut und anschließend 10 min lang bei 90°C erhitzt, um die Proteinkinase K zu deaktivieren. Die Typisierung der Mäuse erfolgt aus einem Mix von drei Primern (NpIn1: 5'-GCA AGC CTC AGT GAC AAA GTA TCC ACT TCA- 3'; NpEX1: 5'- CCA CGA GCT GCC CAT GGT GGA GAG ACA AGA-3'; Neo PCRr1: 5'- AGC GTT GGC TAC CCG TGA TAT TGC TGA AGA-3').

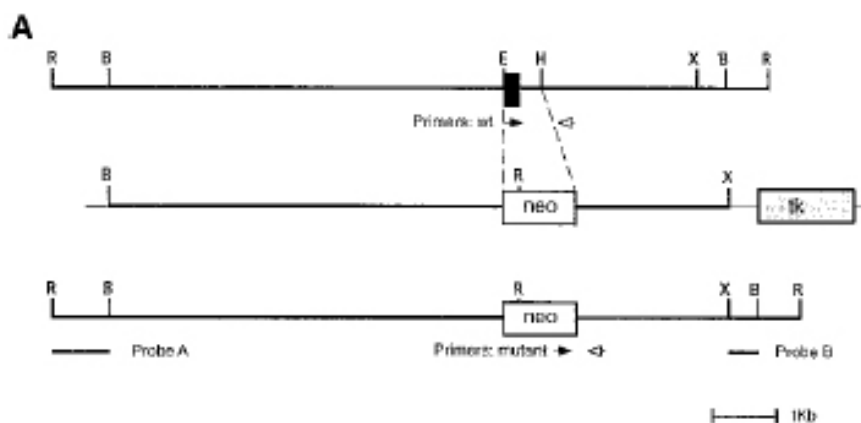


Abbildung 10: Generierung der NFATc2 defizienten Maus

Um die NFATc2 defiziente Maus zu generieren, wurde die REL Homologe (Exon 47 aa) durch eine neo Kasette ersetzt. Die neo Kasette beinhaltet ein Neomycin-Resistenzgen, welches in das durch die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII entstandene „Lücke“ reinkloniert wurde.

2.2.2 Behandlung der Mäuse

Induzierung von Asthma

Um eine asthmatische Reaktion in den Mäusen zu induzieren, wird ein Protokoll verwendet, das sich über 17 Tage erstreckt. Am Tag 0 und 7 werden die Mäuse intraperitoneal mit 200µl OVA/Alum Komplex gespritzt, das einer Menge von 100µg OVA entspricht. In Abhängigkeit von der Versuchsanordnung werden die Mäuse am Tag 14-16 mit einer 1%igen OVA- bzw. mit einer PBS-Lösung für 30 Minuten in einer Aerosol-Kammer behandelt. Die Bestimmung des Atemwegswiderstandes erfolgt am Tag 18.

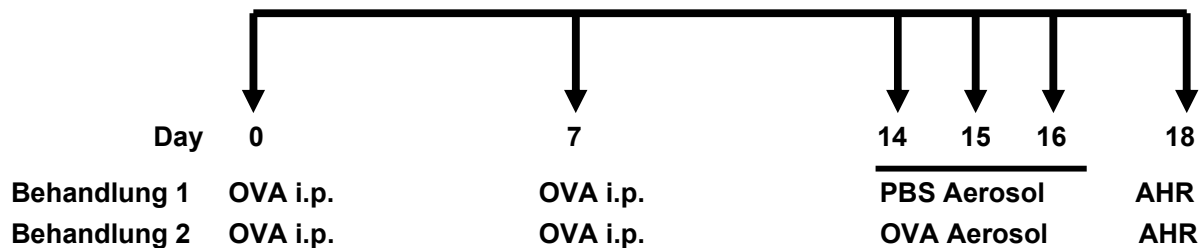


Abbildung 11: Protokoll zur Induzierung von Asthma

Zelltransfer

Um die Bedeutung der einzelnen Zellpopulationen herauszufinden, werden verschiedene Zellarten in immundefiziente (SCID) Mäuse gespritzt. An Tag 15 und zwischen Tag 18-20 werden die Mäuse mit einer 1%igen OVA-Lösung in einer Aerosol-Kammer behandelt. Die T-Zellen werden interperitoneal (i.p.) am Tag 17 in die SCID-Mäuse gespritzt und die Messung des Atemwegswiderstandes erfolgt am Tag 22.

Unterschiedliche Konditionen der Zelltransferversuche:

- 2×10^6 CD4⁺ Balb/c J Zellen
- 2×10^6 CD4⁺ NFATc2 KO Zellen
- 2×10^6 CD4⁺ NFATc2 KO + $1,5 \times 10^6$ CD8⁺ Balb/c J Zellen
- 2×10^6 CD4⁺ NFATc2 KO + $1,5 \times 10^6$ CD8⁺ NFATc2 KO Zellen
- 2×10^6 CD4⁺ NFATc2KO + $1,5 \times 10^6$ CD8⁺ CD122⁺ NFATc2KO Zellen
- 2×10^6 CD4⁺ NFATc2KO + $1,5 \times 10^6$ CD8⁺ CD122⁻ NFATc2KO Zellen

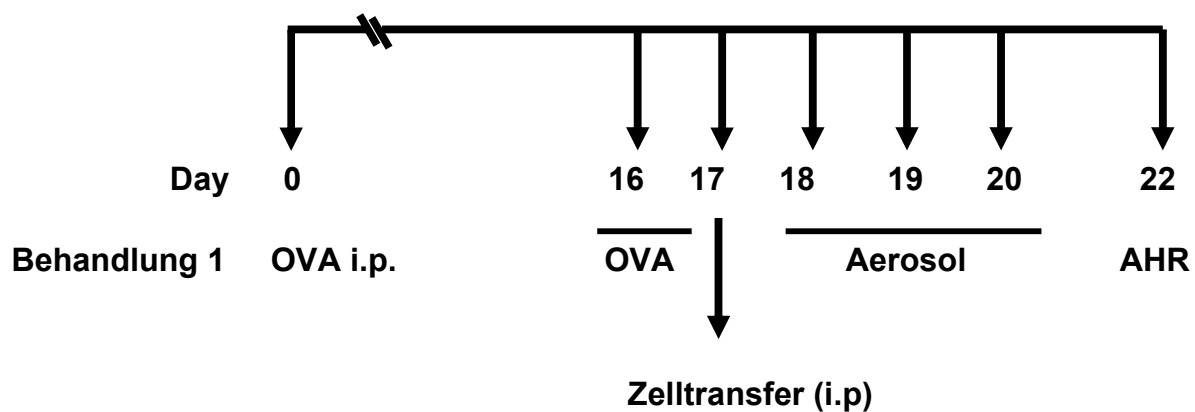


Abbildung 12: Protokoll der Behandlung von immundefizienten Mäusen

2.2.3 AHR Messung–Messung des Atemwegswiderstandes

Der Atemwegswiderstand wird mit dem invasiven System der Firma BUXCO® gemessen. Dazu werden die Tiere mit Phenobarbital betäubt und mit einem Oesophagus-Schlauch, der mit dem Druck Transducer und einer Wassersäule gekoppelt ist, intubiert. Die spontan atmenden Mäuse werden mit Hilfe einer justierbaren Pumpe beatmet. Die Druckdifferenz zwischen Oesophagus und Trachea wird mit Hilfe von „pressure transducers“ im Vergleich zu einer Wassersäule bestimmt. Der Atemwegswiderstand wird mechanisch gemessen, wobei die Parameter mit Hilfe eines isovolumetrischen Analysators (Buxco Electronics, Inc) unter der Verwendung einer speziellen Software (BioSystem XA) bestimmt werden. Dieser Analysator zeichnet den Druck- und Flow-Input auf. Die isovolumetrische Methode zur Bestimmung der Atemwegsresistenz berechnet die Veränderung des Ein- und Ausatemdrucks bezogen auf ein Volumen. Der „Flow“ wird analog bestimmt und wird mit Hilfe einer Amplitude von „expiration“ und „inspiration“ Phase (berechnet).

Der Airflow wird mit der Int-Zero-Methode kalibriert durch Injektion von 1 ml Luft in die Messkammer. Der Druck wird anhand einer „two point reading“ Methode mittels eines Wassermanometers bestimmt. Beide Kalibrierungsmethoden werden gemäß den Herstellerangaben vorgenommen. Unterschiedliche Methacholin-Dosen werden mit Hilfe eines Nebulizers, der mit der Tracheakanüle verbunden ist, verabreicht. Dieses gewährleistet eine direkte Wirkung des Methacholins. Während der Messung, welche ca. 25 Minuten dauert, werden jeweils 10 µl einer Methacholinlösung (0.3, 1, 3, 10, 30 mg/ml) pro Tier appliziert. Die über ein T-Stück mit der Tracheakanüle verbundene Ventilationseinheit sorgt für einen gleichmäßigen Luftstrom, der das vernebelte Methacholin in die Lunge befördert. Der Atemwegswiderstand, angegeben als Resistance (RI (cm H₂O x sek/ml), wird in den fünf Minuten bestimmt, wobei die Daten als Mittelwerte (MW ± SEM) angegeben werden.

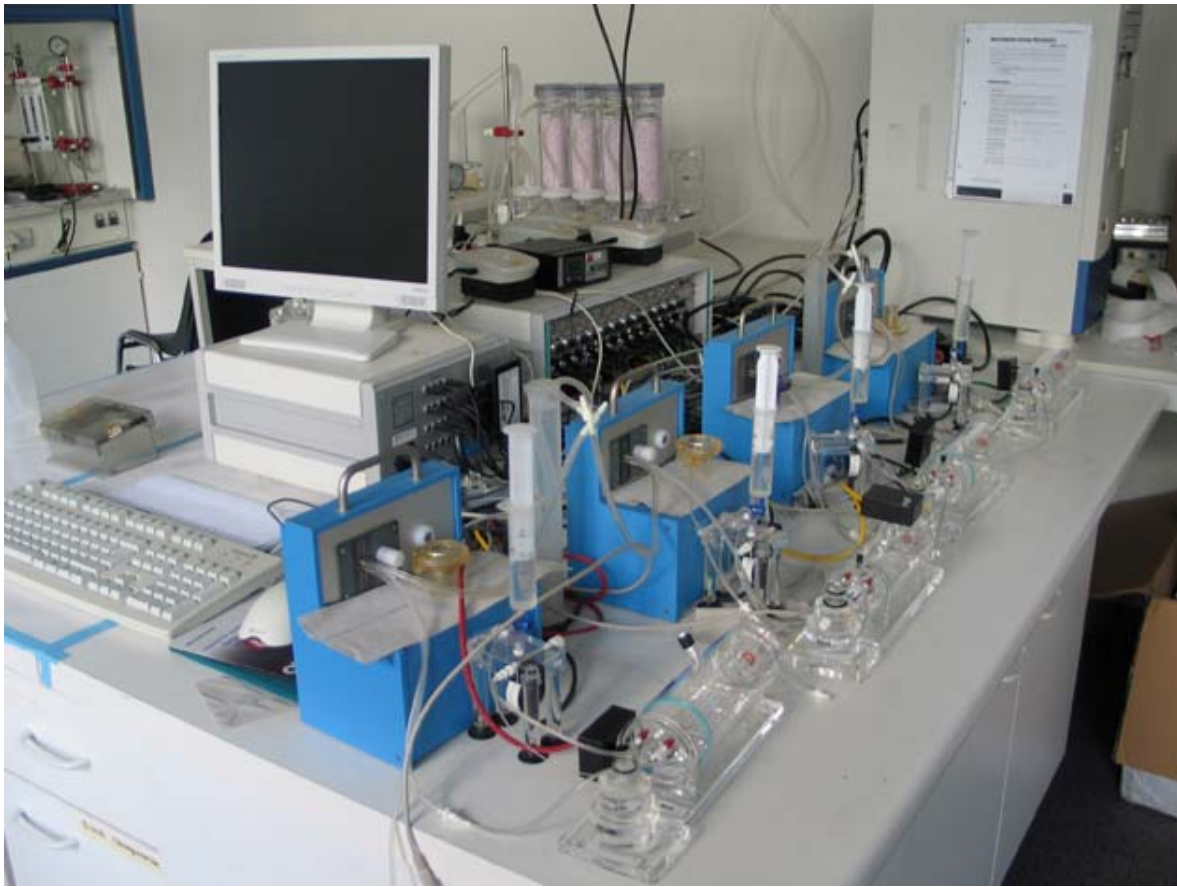


Abbildung 13 : Darstellung des invasiven Systems der Firma BUXCO®

2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Entnahme der Lavage wird direkt nach der AHR-Messung durchgeführt. Dabei werden die Tiere durch den Oesophagus mit Hilfe eines Schlauchs mit einer gepufferten Lösung (Sterofundin) lavagiert. Für die Lungenspülung werden jeweils dreimal 1ml Lösung benutzt. Die Lösung wird anschließend bei 1500 rpm. 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Überstände abgenommen und bei -80°C weggefroren werden. Diese können später für den Zytokinnachweis verwendet werden. Das Zellpellet wird in 1ml PBS resuspendiert und im Cytospingerät bei 500 rpm. (22,86g) 5 Minuten zentrifugiert und gegebenenfalls auf Vitalität der Zellen überprüft. Die Vitalitätsprüfung der Zellen erfolgt durch Zugabe einer 0,4%iger Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1. Trypanblau kann ausschließlich tote Zellen färben, da es durch intakte Zellmembranen nicht diffundieren kann. Die Objektträger werden getrocknet und bei -20°C eingelagert, bzw. mit einer Haematoxylin-Eosinfärbung (Difquick) gefärbt. Mit Hilfe dieser Färbung können Aussagen über die Anzahl und Beschaffenheit der BAL-Zellen getroffen werden.

2.2.5 Organentnahme und Organpräparation

Für die Entnahme von Lunge und Milz werden die Mäuse durch zervikale Dislokation oder durch eine Überdosis von Phenobarbital getötet. Nach Eröffnung der Bauchdecke und des Thorax der Mäuse erfolgt die Organentnahme unter sterilen Bedingungen. Anschließend werden die Lungenteile unterschiedlich aufbereitet, wobei ein Teil dieser in 3-5%iger Formalinlösung, ein weiterer in OCT eingelegt wird. Hiervon können histologische und immunohistologische Schnitte angefertigt werden. Die übrigen Teile werden sowohl in flüssigem Stickstoff gelagert als auch für die Gewinnung von Gesamt- und T-Zellen im Medium aufbewahrt. Die Milz, die durch einen Schnitt an der Flanke herauspräpariert wird, wird größtenteils zur Gewinnung von Gesamtzellen bzw. zur Gewinnung von T-Zellen entnommen.

2.2.6 Histologische Färbungen und Auswertungen

Die Aufbereitung der Lungenproben, die in 3-5%iger Formalinlösung fixiert werden, erfolgte mit der freundlichen Kooperation mit Prof. Dr. Lehr.

Die in 3-5%igem Formalin fixierten Lungenstücke werden in Paraffin eingebettet und in ca. 5 µm dicke Scheiben mit Hilfe eines Mikrotomes geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Diese werden anschließend im Standardverfahren unterschiedlich gefärbt.

Histologische Färbungen

- Hämatoxylin–Eosin-Färbung (HE-Färbung): Übersichtsfärbung für basophile Zell- und Gewebestrukturen, um Entzündungen und Zellschädigungen sichtbar zu machen
- Alzianblau (2,5)-PAS-Färbung: Spezialfärbung für Schleimsubstanzen
- Trichromfärbung nach Masson-Goldner: Färbung für Kollagen-Bindegewebsfasern

Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgt durch Dritte, indem eine Auszählung von intraepithelialen Lymphozyten stattfindet. Bei der PAS-Färbung wird die Anzahl der Mukusproduzierenden Zellen in WT Mäusen mit denen der NFATc2 KO Maus verglichen. Diese Zellen sind an ihrer Rosafärbung gut zu erkennen. Hierbei wird der prozentuelle Anteil der mukusproduzierenden Zellen bezogen auf die Gesamtanzahl der Epithelzellen, welche das Lumen auskleiden, berechnet. Die Auszählung erfolgt aus mehreren Bronchien und mehreren Tieren pro Gruppe.

Die Kollageneinlagerung bei der Masson-Goldner-Färbung wird mit der Software des Mikroskops Olympus bestimmt. Hierbei wird der Mittelwert der durchschnittlichen Kollagendicke der einzelnen Bronchien bestimmt (8-14 Messungen pro Bronchus). Die Quantifizierung der Kollagendicke erfolgte ähnlich der Quantifizierung der mukusproduzierenden Zellen aus mehreren Bronchien mehrerer Tiere. Die zu untersuchenden Bronchien werden in drei Gruppen mit unterschiedlichem Durchmesser unterteilt: 50-100µm, 100-200µm und 200-350µm.

2.2.7 Immunhistologische Färbung der CD4+ T-Zellen

Für die immunhistologische Färbung der CD4+ T-Zellen dienen am Kryostat geschnittene 5µm dicke Lungengewebsproben. Zunächst werden sie für 20 Minuten mit 4%igem PFA fixiert und schließlich mit einem 0,05 M TBS-Puffer (Tris hydrochloride) gewaschen. Anschließend werden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Avidin- und Biotin-Block Vektor inkubiert und danach mit Blocking-Puffer (2% BSA, 0,05% TBST) gewaschen, um die unspezifischen Bindungen zu minimieren. Die Inkubation des primären anti-CD4 Antikörpers (Anti-CD4: Klone: H129.9) erfolgt über Nacht bei 4°C in einer Konzentration von 10 µg /ml. Als Sekundärantikörper dient ein biotinierter Ziege-anti-Ratte Antikörper (Vektor: BA-4000) welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur 1:1000 in TBST verdünnt. Schließlich werden die Schnitte mit einem streptavidingekoppelten Cy-Antikörper (1:500 in TBS jackson lab) für 30 Minuten behandelt und anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Die Objektträger werden mit einem Invert-Floureszenzmikroskop der Firma Olympus bei einer Vergrößerung von 200 und 400 photographiert

2.2.8 Zellisolierung

Gesamtzellisolierung

Bei der Gesamtzellisolierung unterscheidet man zwischen der Isolierung aus der Lunge und der Milz. Da die Zellen in der Lunge im Gewebe unter anderem durch Kollagenfasern fixiert sind, erweist sich die Isolierung aus dieser als schwierig. Im ersten Schritt wird die Lunge in einer Petrischale mit RPMI-Medium mit einem Skalpell sorgfältig zerkleinert und anschließend in 5ml einer Verdauungslösung eine Stunde bei 37°C unter horizontalem Schütteln verdaut. Die Verdauungslösung besteht aus 30U/ml Kollagenase Typ2 und 150 µl DNase I (10 mg/ml, 0,01 (w/v) %) in 10 ml PBS. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Zellsuspension mit einer Pipette auf ein Sieb (Porengröße 40µm), welches auf ein 50ml Falconröhrchen aufgesetzt ist, transferiert und mit einem Stempel einer 1 ml Spritze durch das Sieb gedrückt. Hierbei wird das Sieb mehrmals mit RPMI-Medium gespült, um die Zellen vollständig vom Sieb zu

lösen. Anschließend wird die Zellsuspension 10 Minuten bei 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einer ACK-Lyse-Lösung resuspendiert und 5 Minuten bei RT inkubiert um die Erythrozyten aufzulösen. In den nächsten Schritten werden die Zellen durch wiederholtes Abzentrifugieren und durch Aufnahme in PBS gewaschen. Hierbei werden die Zellen resuspendiert und durch langsames „Runterpipettieren“ von großen Schwebeteilchen befreit.

Die so gewonnenen Zellen werden in MACS-Puffer aufgenommen und mit einer Neubauer-Zählkammer oder mit einem Casy-Zellzählgerät gezählt. Die Isolation der Gesamtzellen der Milz wird ähnlich durchgeführt, wobei auf den Verdau verzichtet wird. Hierbei wird die Milz direkt durch ein 40µm Sieb durchgedrückt, analog zur Lunge weiter gewaschen und in MACS-Puffer aufgenommen. Die Gesamtzellen der Lunge als auch der Milz kann man anschließend für FACS-Messungen oder zur Zellisolation nutzen.

Isolierung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mittels MACS

Die Isolation der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erfolgt mittels magnetischer Zellseparierung der Firma Miltenyi. Hierbei werden die Zellen in MACS-Puffer in einer Konzentration von 10⁷ Zellen pro 900 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Beads werden in der Konzentration von 10 µl pro 1x10⁷ Zellen zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 15 Minuten bei 4°C, und wird mit 10-facher Menge an MACS-Puffer abgestoppt. In der Zwischenzeit werden die MACS-Säulen mit 500 µl MACS-Puffer in einem MACS-Separator (Magnetständer) äquilibriert. Nach dem Abzentrifugieren der mit Beads beladenen Zellen (10min bei 1200 rpm), werden diese in entsprechender Menge in MACS Puffer resuspendiert und auf die Säulen pipettiert. Anschließend werden sie dreimal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und nach Entnahme aus dem Magneten mit 1 ml MACS-Puffer durch schnelles und kraftvolles Herunterdrücken des Kolbens herausgespült. Das hier entstandene Eluat beinhaltet die Positivfraktion.

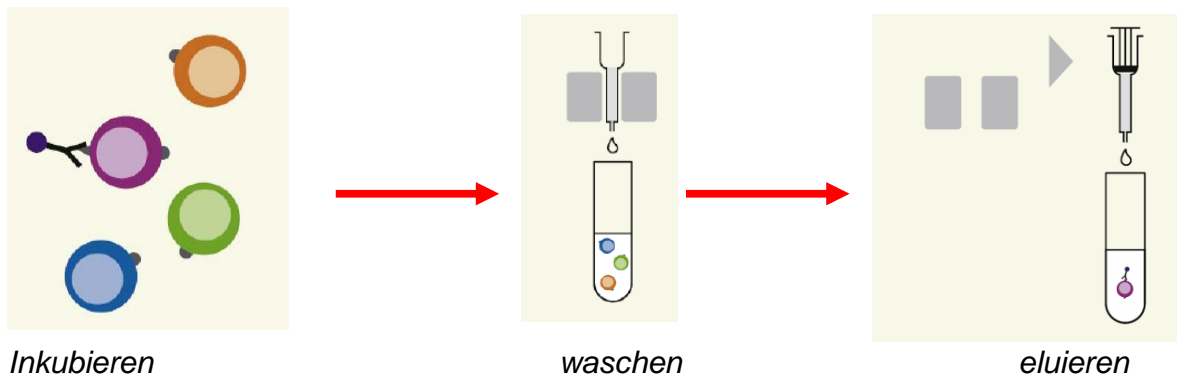


Abbildung 14 : Schematischer Aufbau Zellisolation mit MACS® ([http:// www.miltenyibiotec.com/](http://www.miltenyibiotec.com/))

Die isolierten Zellen werden mit magnetischen Beads inkubiert und mit Hilfe eines MACS-Separators in der mit Eisenpartikel beladenen Säule zurückgehalten. Nach wiederholtem waschen der gebundenen Zellen, werden diese durch kraftvolles Herausspülen mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule eluiert.

2.2.9 Zellkultivierung

Die isolierten Zellen werden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml RPMI Medium (1% PenStrep + 5% FCS) aufgenommen. Für die Zytokinmessung werden die Zellen in 96- bzw. 48-well-Platten ausplattiert und 24h bei 37°C und einer CO_2 -Konzentration von 5% kultiviert. Da fast keine T-Zelle spontan *ex vivo* Zytokine sezerniert, müssen die Zellen zuvor stimuliert werden. Dies erfolgt durch „coaten“ der Zellkulturplatten mit anti-CD3 Antikörper für eine Stunde bei 37°C ($5 \mu\text{g/ml}$, verdünnt in Coating Buffer). Durch die Zugabe des anti-CD3 Antikörpers kommt es zu einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und dadurch zu einer vermehrten Synthese und Sekretion des spezifischen Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) und die Hochregulation seiner Rezeptoren (CD25). Zur Erzielung einer verbesserten Aktivierung der T-Zellen werden diese zusätzlich mit anti-CD28 in Kultur in einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ stimuliert. Hierbei handelt es sich um einen Ersatz für die oberflächlichen Glycoproteine B7-1/B7-2, die in der Einleitung bereits beschrieben worden sind. Für den Nachweis intrazellulärer Zytokine werden die Zellen über Nacht mit anti-CD3 und anti-CD28 inkubiert und für 5 Stunden mit 5 ng/ml Phorbol-myristat-Azetat (PMA) und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Zusätzlich wird bei der intrazellulären Zytokinbestimmung ein Golgi-Apparat-Hemmer eingesetzt. Bei der $\text{IFN-}\gamma$ Färbung werden $10 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin A

Reagenz verwendet. Brefeldin A zerstört das Netzwerk des cis-Golgi-Apparates und verhindert so den Export von neu synthetisierten Klasse-I-Molekülen. Bei der IL-10 Färbung wird Monensin (GolgiStop) verwendet, das ebenso den Golgi-Apparat hemmt. Die Bestimmung der IL-17 Produktion wird aus den Zellüberständen der Th17 differenzierten CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen durchgeführt. Dafür werden die naiven Milzzellen am Tag 1 mit 2 µg/ml anti-CD3 antibody, 3 ng/ml human TGF-β1 (R&D 240-B) , 20 ng/ml IL-6 (R&D 406-ML), 10 µg/ml anti-IL4 Antikörper und 10 µg/ml anti-IFN_γ Antikörper behandelt. An Tag 3 werden die Zellen gesplittet und unter Einsatz von 25 Units IL-2 und 1µg anti-CD28 für weitere zwei Tage kultiviert.

2.2.10 FACS-Färbung der Zellen

Oberflächenfärbung

Die Oberflächenfärbung der Zellen verläuft in vier Schritten. Zuerst werden 5×10^5 Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und mit einem oder mehreren Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Sollten die Zellen nicht sofort gemessen werden, kann man die Proben mit PFA (Paraformaldehyd) fixieren. Alternativ können die Zellen im MACS-Puffer bzw. in PBS 0,5%iger BSA-Lösung aufgenommen werden. Bei den Färbungen werden die entsprechenden Isotypkontrollen als auch Kompensationskontrollen mitgeführt.

Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre Färbung spielt eine große Rolle bei der Zytokin- und FOXP3-Messung. Hierbei muss jedoch gewährleistet werden, dass die Zellen für die Antikörper durchlässig sind. Da die intrazelluläre Färbung mit der Oberflächenfärbung kombiniert wird, müssen die Zellen im ersten Schritt mit Oberflächenmarkern bestückt werden (s.o.) Nachdem die Zellen gewaschen wurden, werden diese mit 2%iger PFA-Lösung fixiert und die Zellmembran mit einem 0,5%igem Saponin-Puffer permeabilisiert. Alternativ kann eine fertige FixPerm-Lösung (eBioscience) benutzt werden. Der Antikörper für die intrazelluläre Färbung wird in einer 0,1%igen Saponinlösung aufgenommen, wobei auch

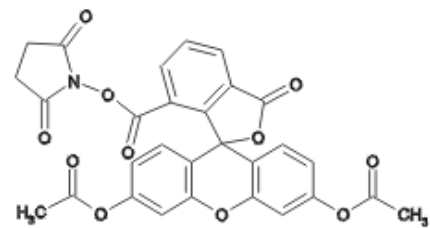
hier eine Färbezeit von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln eingehalten wird. Nach zweimaligem Waschen mit der 0,1%igen Saponinlösung werden die Zellen in PBS oder gegebenenfalls in 2%iger PFA-Lösung aufgenommen. Es ist zu beachten, dass die Proben zum Einstellen des Gerätes auch alle Prozedurschritte durchlaufen müssen, um eine einwandfreie Einstellung durchführen zu können.

2.2.11 Proliferationsmessung

Messung der Proliferation durch CFSE-Markierung der Zellen

Für die Proliferationsmessung werden isolierte T-Zellen mit CFDASE-Farbstoff (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) behandelt, welcher als Diacetat die Zellmembran passiert und in der Zelle durch Abspaltung der zwei Acetatgruppen zu Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE)

umgewandelt wird. CFSE bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe an Lysin- und Argininreste cytoplasmatischer Proteine. Die Carboxyfluorescein-markierten Proteine werden bei der Teilung einer Zelle zu gleichen Teilen an ihre Tochterzellen weitergegeben. Die Zahl der Zellteilungen lässt sich daher anhand der Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen. Wenn sich die Zellen teilen, dann nimmt die CFSE-Konzentration in der Zelle ab und die Fluoreszenz wird dadurch weniger intensiv. CFSE wird bei 488 nm durch einen Neon-Argon-Laser im FACS angeregt und die Fluoreszenz bei 515 nm gemessen. Die Färbung der Zellen erfolgt durch Inkubation in einer 5 µM CFDASE-PBS-Lösung für 5 Minuten bei 37°C. Anschließend wird der Färbeprozess mit RPMI-Medium abgestoppt. Um überschüssiges CFSE zu entfernen, werden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die so markierten Zellen werden in einer 96-well-Platte über vier Tage mit anti-CD3 und mit Mytomycin/c behandelten A20-Tumorzellen inkubiert. Um eine OVA-spezifische Proliferation zu erhalten werden die Zellen in einem Medium kultiviert, welches 0,25 µg/ml OVA-Peptid beinhaltet. Zwanzig Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen, wird die Intensität der Fluoreszenzfärbung



Darstellung des CFSE Farbstoffes

analysiert. Dieser Wert dient der Messung, die an Tag 4 durchgeführt wird als Ausgangspunkt.

Thymidin-Messung

Eine andere Methode die Proliferation der Zellen zu messen, ist der Einbau an [³H]-markiertem Thymidin in die DNA sich teilender Zellen. Die Zellen werden drei bis vier Tage in einer 96-well-Rundboden-Platte inkubiert und für 16 bis 18 Stunden mit 0,2 µCi [³H]-markiertem Thymidin pro well versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Platten eingefroren, um einen weiteren Einbau von radioaktivem Thymidin zu verhindern. Um die Proliferationsrate zu bestimmen, werden die Platten aufgetaut und deren Inhalt auf spezielle Glasfilter mit Hilfe des Cell Harvester 1295-001 eingesaugt. Dabei setzt sich die nun radioaktiv markierte DNA in dem Glasfilter fest. Anschließend wird die Platte getrocknet (Mikrowelle) und in einem Plastikbeutel mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und eingeschweißt. Die Auswertung erfolgt mit einem Beta-Szintillationszähler. Die von dem [³H]-markiertem Thymidin ausgesandte β-Strahlung regt die Lösungsmoleküle der Szintillationsflüssigkeit an und wird auf den primären Szintillator übertragen, der wiederum die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung freigibt. Diese werden dann wiederum über eine Photozelle im Szintillationszähler aufgenommen und als Impulse pro Minute (cpm) vom Gerät dargestellt.

2.2.12 ELISA

Der Nachweis von IgE, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN-γ, TGF-β und Eotaxin wird mit Hilfe des **Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)** durchgeführt. Es handelt sich hier um einen indirekten Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen und anderen Flüssigkeiten. Zunächst wird die ELISA-Platte über Nacht bei 4°C mit dem 1.AK, welcher sich gegen das nachzuweisende Protein richtet, „gecoated“. Anschließend werden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit einer 0,05%iger PBS-Tween 20 Lösung entfernt. Das Absättigen der unspezifischen

Bindungsmöglichkeiten erfolgt durch Inkubation mit „Assay Diluent“ für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Platte wird diese mit den Zellüberständen bzw. der BAL Flüssigkeit (200µl pro well) beladen. Die Inkubationszeit beträgt bei den meisten Zytokinen zwei Stunden, kann jedoch von Zytokin zu Zytokin variieren. Auf jeder Platte wird mit den Proben auch gleichzeitig eine Standardverdünnungsreihe aufgetragen, die für die Kalibrierung des Auslesegerätes notwendig ist. Diese wird von Zytokin zu Zytokin und von Charge zu Charge unterschiedlich angesetzt. Nach der Inkubation wird die Platte wiederholt gewaschen und mit dem 2.AK + Avidin-HRP (Horseradish peroxidase) belegt. Die durch den 1.Antikörper gebundenen Zytokine werden vom 2.AK erkannt. Die Detektion erfolgt durch Bindung der Avidin-HRP an den 2.AK. Nach wiederholtem Waschen kann die Detektionslösung, welche aus der Substratlösung (19 ml) und 1ml TMB-Lösung (Tetramethylbenzidin) besteht, in die „wells“ pipettiert werden. Der Avidin-HRP wird Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das vorher fast farblose TMB zu einem blauen Produkt. Durch Zugabe von 50 µl/well Stop-Lösung (30% H₂SO₄) wird die instabile blaue Lösung zu einen stabilen gelben Farbkomplex umgewandelt. Die nun „fixierte“ Platte kann mit dem entsprechenden Programm am ELISA-Reader bei 450nm ausgelesen werden.

2.2.13 mRNA-Isolierung

Die Isolierung der mRNA aus T-Zellen und anderen Zellen wird teils mit TRI-REAGENT™ der Firma Sigma und teils mit dem Rnasy Micro Kit (50) der Firma Quiagen durchgeführt. Hierbei entspricht die Isolierung den Vorgaben der Hersteller.

2.2.14 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Bei der Reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Hierbei werden 5-7 µg RNA eingesetzt, die ad 11 µl mit Wasser aufgefüllt werden. Zur Probe wird anschließend 1 µl Oligo(dT)-Primer zugegeben und 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Hierbei lagert sich der Primer an den Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls an und

gewährleistet so einen Startpunkt für das Umschreiben der mRNA. Anschließend gibt man 4 µl 5x Reaction-Buffer, 1 µl RNaseInhibitor und 2 µl 10 mM dNTPmix dazu, vortext das alles und inkubiert es weitere 5 Minuten bei 37°C. Im nächsten Schritt gibt man dem Reaktionsansatz 1 µl RevertAidMMuLVRT zu, die für das Umschreiben von mRNA in cDNA verantwortlich ist. Nach 60-minütiger Inkubation bei 42°C wird die Probe für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um eine Denaturierung der RevertAid hervorzurufen. Die so entstandene cDNA wird bei -20°C gelagert.

2.2.15 PCR, Realtime PCR

Die Idee DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen wurde Anfang der 70er Jahre von dem norwegischen Postdoc Kjell Kleppe entwickelt. Sie geriet jedoch zunächst in Vergessenheit, bis sie 1986 von dem Amerikaner Kary Mullis wiederentdeckt wurde. Mit der von Dr. Mullis entwickelten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Hierfür setzt man Oligonukleotide [Primer] ein, die in dieser Reaktion als Startermoleküle dienen. Der Abschnitt, den die Primer beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Ein Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen. Durch Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 92–94°C wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten, so dass die Primer durch Anlagerung ("Annealing") an die DNA-Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur an diese binden können. Anschließend kommt es zu einer Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase von 72-75°C. Am Ende der PCR wird eine 5- bis 10-minütige Extensionsphase angehängt, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können. Die Wahl der richtigen Annealingtemperatur ist dabei für das Ergebnis der PCR entscheidend.

Mit Hilfe der PCR wird die Identität der NFATc2 KO Mäuse überprüft. Das dazu benötigte DNA-Material wird aus dem Verdau von Ohr- bzw. Schwanzbiopsien gewonnen (Willi Puffer). Ein anderer Bereich für die Anwendung der PCR ist die semiquantitative Bestimmung vom FOXP3 aus CD4+ T-Zellen der Lunge (mFoxP3.for 5'-CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G-3'; mFoxP3.rev 5'-CAT TTG CCA GCA GTG

GGT AG-3'). Um eine genaue Quantifizierung zu gewährleisten werden Realtime-PCRs durchgeführt, bei der in Triplikaten FoxP3 unter Verwendung von IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) auf einem iCycler (Bio-Rad) quantifiziert werden. Die Expression des hier benutzten Housekeeping-Gens (Gen für die Berechnung des relativen Expressionslevels) EF1 α (EF1a.for 5'-GAT TAC AGG GAC ATC TCA GGC TG-3' EF1a.rev 5'-TAT CTC TTC TGG CTG TAG GGT GG-3') wird ebenfalls durch Triplikate ermittelt. Alle Primer (Oligonukleotide) werden so ausgewählt, dass sie zumindest ein Intron auf Ebene genomischer DNA umspannen, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Weiterhin besitzen beide Primer eine Annealingtemperatur von 57°C um in einem Ansatz (96-well-Platte) gemessen zu werden.

2.2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Office) durchgeführt. Mit den Analysetools für Zwei-Stichproben t-Tests wird ein Test auf Gleichheit der jeder Stichprobe zugrunde liegenden Erwartungswerte der Zufallsvariablen durchgeführt. Das Tool basiert auf der Annahme, dass die Varianzen der Grundgesamtheiten gleich sind. Bei dem hier benutzten Tool wird ein t-Statistik-Wert t berechnet und als t-Statistik in den Ausgabetafeln angezeigt. Abhängig von den Daten kann dieser Wert t negativ oder nicht negativ sein. Unter der Voraussetzung gleicher Erwartungswerte der Zufallsvariablen gibt bei $t < 0$ $P(T \leq t)$ einseitig die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Wert der t-Statistik beobachtet wird, der negativer als t ist. Wenn $t \geq 0$ ist, gibt $P(T \leq t)$ einseitig die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Wert der t-Statistik beobachtet wird, der positiver als t ist. Kritischer t-Wert bei einseitigem Test gibt den maximalen Wert an, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wert der t-Statistik größer oder gleich Kritischer t-Wert bei einseitigem Test ist, α entspricht. $P(T \leq t)$ zweiseitig gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Wert der t-Statistik beobachtet wird, der im Absolutwert größer als t ist. Kritischer P-Wert bei zweiseitigem t-Test gibt den maximalen Wert an, sodass die Wahrscheinlichkeit eines beobachteten Werts der t-Statistik, der im Absolutwert größer als Kritischer P-Wert bei zweiseitigem t-Test ist, α entspricht. Die Signifikanz der einzelnen Messung wird mit dem Zwei-Stichproben t-Test bei abhängigen Stichproben berechnet. Dieses Analysetool führt einen t-Test für

zwei Stichproben durch. Bei diesem Test wird davon ausgegangen, dass die beiden Datensätze aus Verteilungen mit gleichen Varianzen stammen. Er wird als homoskedastischer t-Test bezeichnet. Mithilfe dieses t-Tests kann man bestimmen, ob die beiden Stichproben wahrscheinlich aus Verteilungen mit gleichen Erwartungswerten der Zufallsvariablen stammen. Die Korrelationskoeffizienten werden ebenfalls mit Excel berechnet, wobei die Daten als Mittelwerte +/- SEM dargestellt werden

(Quelle: <http://office.microsoft.com/de-de/excel/>)

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Atemwegswiderstandes der NFATc2 defizienten Mäuse nach OVA-Sensibilisierung mit und ohne Allergendisposition

Es ist bereits bekannt, dass NFATc2 defiziente Mäuse eine gestörte T-Zell-Homöostase, die sich unter anderem in einer erhöhten Th2-Reaktion äußert, vorweisen. Um die Frage der bronchialen Hyperreagibilität zu beantworten, wird der Atemwegswiderstand unter verschiedenen Konditionen bei den NFATc2 defizienten und den zugehörigen Vergleichstieren (beide mit dem genetischen Hintergrund BALB/c) gemessen.

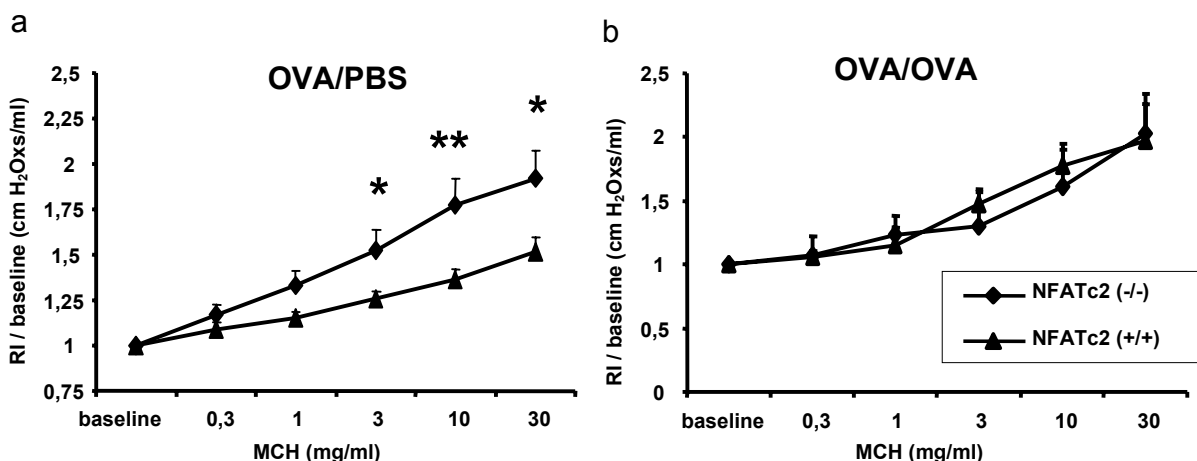


Abbildung 15: Messung der AHR unter verschiedenen Konditionen.

Um die Atemwegs-Hyperreagibilität zu messen, wird mit dem invasiven System der Firma BUXCO® die Atemwegswiderstand bestimmt. Verglichen mit den Wildtyp Mäusen, zeigen die OVA/PBS-behandelten KO Mäuse einen erhöhten Atemwegswiderstand bei einer Methacholindosis von 3, 10 und 30 mg/ml (a). Nach einer OVA-Allergendisposition ist eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes nicht feststellbar (b)

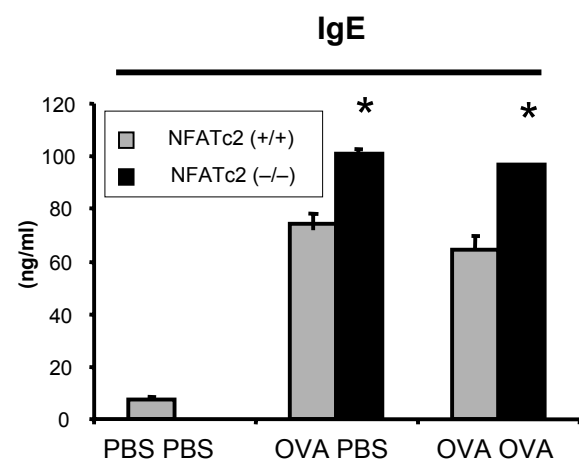
Werden gesunde NFATc2 KO bzw. Wildtyp Mäuse nach Protokoll intraperitoneal mit 200µl OVA/Alum-Komplex behandelt, welches einer Menge von 100µg OVA entspricht, so zeigen, wie in der Abbildung 14a erkennbar, die NFATc2 defizienten Mäuse eine signifikant erhöhte Atemwegs-Hyperreagibilität bei unterschiedlichen Methacholindosen

($p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**)). Dies ist jedoch nur der Fall, wenn keine OVA-Allergendisposition vorliegt. Werden die Tiere an drei Tagen vor der Messung der AHR für jeweils 30 Minuten dem OVA ausgesetzt, um ein Asthmodel zu induzieren, so gibt es überraschenderweise keinen Unterschied in dem Atemwegswiderstand zwischen den KO und den WT Mäusen. Daher stellt sich die Frage, wieso nach einer Allergendisposition der erwartete Unterschied ausbleibt.

Um sicher zu stellen, dass die OVA i.p. Sensibilisierung eine humorale Immunantwort mit einem Anstieg des IgE-Levels zu Folge hat, wird ein IgE-ELISA durchgeführt.

Abbildung 16: Die NFATc2 defizienten Mäuse zeigen einen erhöhten Level an IgE im Vergleich zu naiven Tieren.

Der IgE-Level steigt bei allen Gruppen nach intraperitonealer Gabe von OVA im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen an. In beiden Gruppen, also jeweils nach der OVA i.p. Gabe, zeigen die NFATc2 KO Mäuse einen höheren IgE-Level. Dieser Anstieg ist jedoch unabhängig von der Allergendisposition.



Der IgE-Level wurde aus dem Blut von naiven und behandelten Mäusen bestimmt. Die Abbildung 16 zeigt deutlich, dass nach intraperitonealer OVA-Gabe der IgE-Level sowohl bei den NFATc2 KO, als auch in den WT Mäusen ansteigt. Die NFATc2 defiziente Mäuse zeigen dabei einen signifikant erhöhten IgE-Level im Vergleich zu den WT Mäusen, der sowohl in der OVA/PBS als auch OVA/OVA Gruppe zu finden ist. Eine Differenz vor und nach Allergendisposition ist nicht feststellbar, so dass hier nur die Sensibilisierung nicht jedoch die Allergendisposition eine Rolle spielt.

3.2 Histologische Untersuchungen der NFATc2 defizienten Mäuse

Bei der histologischen Begutachtung, die eine exakte Erfassung verschiedener auch gering erscheinender Veränderungen erfordert, werden folgende Färbungen der Lungenschnitte durchgeführt:

- Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung): Darstellung der Entzündungen und Zellschädigungen bei basophilen Zell- und Gewebestrukturen
- Alzianblau-(2,5)-PAS-Färbung: Spezialfärbung für Schleimsubstanzen
- Trichromfärbung nach Masson-Goldner: Färbung für Kollagen-Bindegewebsfasern

Da die Bestimmung der Eosinophilen in der Hämatoxilin-Eosin-Färbung nur unzureichend ist, erfolgt zusätzlich eine Auszählung der Eosinophilen in den Divquick gefärbten Cytospin-Präparaten.

3.2.1 NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Menge an intraepithelialen Lymphozyten in der Lunge

Die Hämatoxilin-Eosin gefärbten Lungenschnitte der OVA/PBS-behandelten Tiere werden quantitativ auf Lymphozyten-Migration und Epithelschädigung untersucht.

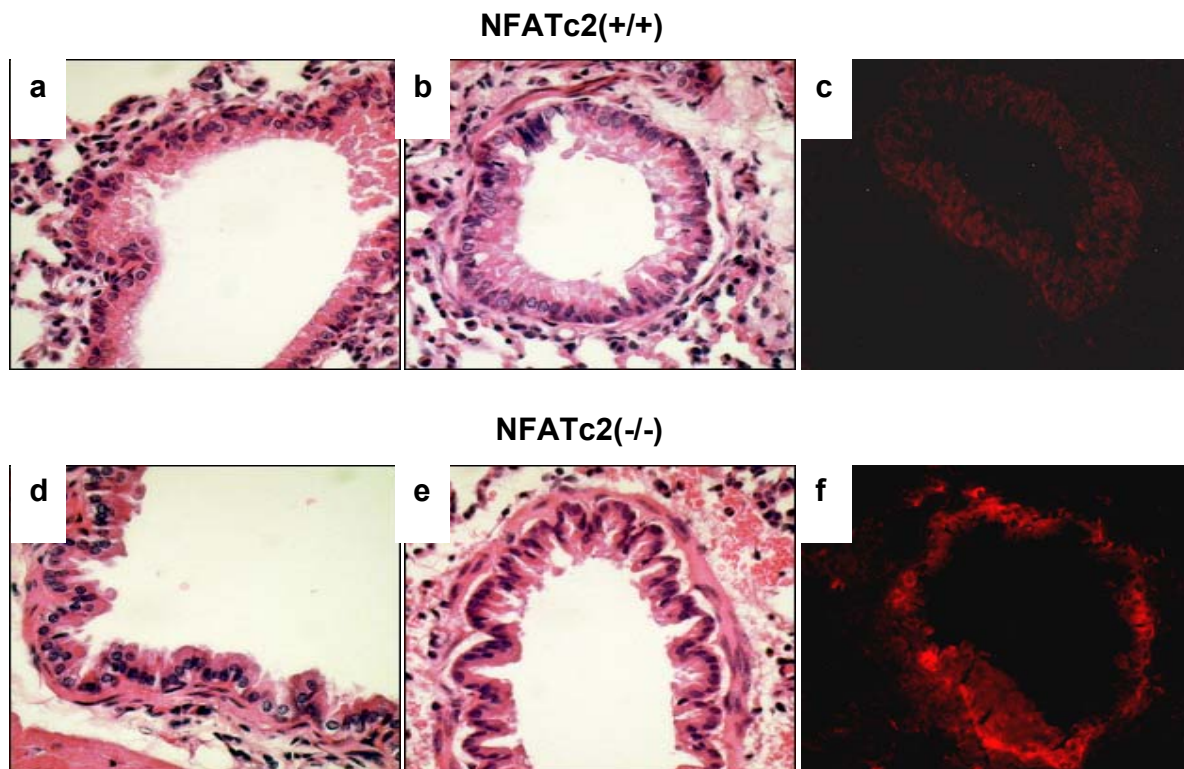


Abbildung 17: Erhöhte Mengen an Lymphozyten im intraepithelialen Raum bei den NFATc2 defizienten Mäusen.

Die Abbildungen a, b sowie d und e zeigen den Querschnitt eines NFATc2(+/-) bzw. NFATc2(-/-) Bronchus bei 200- und 400-facher Vergrößerung. Bei den NFATc2 KO Mäusen wird eine erhöhte Menge an T-Lymphozyten, die zwischen den Epithelzellen der Bronchien eingelagert sind, sichtbar. Hierbei handelt es sich größtenteils um CD4⁺ T-Zellen, die mit Hilfe von immunhistologischen Methoden angefärbt wurden (e und f).

Hierbei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den WT und KO Mäusen in der Schädigung der Epithelzellen zu sehen. Trotzdem liegt eine erhöhte Anzahl an intraepithelialen Lymphozyten (Abbildung 17 a, b, d und e) im Lungengewebe der NFATc2 defizienten Mäusen vor. Die Auszählung erfolgt semiquantitativ durch Dritte

und ist in der Tabelle 2 zusammengestellt. Um herauszufinden, um welche Zellart es sich bei den blau angefärbten Lymphozyten handelt, werden 5 µm dicke Cryoschnitte mit einer immunhistologischen Methode mit anti-CD4 Antikörper gefärbt und unter einem Invert-Floureszenzmikroskop fotografiert. Die CD4+ T-Zellen, die in Abbildung 17 c und f stellvertretend durch die rote Färbung dargestellt werden, lagern sich vermehrt rund um den Bronchus der KO Maus an und steuern so zu einer lokal erhöhten Immunantwort bei.

Bronchieninfiltration	NFATc2(+/+)	NFATc2(-/-)
-	42	23
-/+	13	26
+	6	26
++	2	8
+++	3	5
Gesamtanzahl (n)	66	68

Tabelle 2: Semiquantitative Bestimmung der intraepithelialen Lymphozyten-Infiltration

Die semiquantitative Bestimmung der Bronchieninfiltration erfolgte durch Dritte. Dabei wurde die Anzahl der in HE Schnitten sichtbaren Lymphozyten, welche in das Epithelgewebe der Bronchien eingewandert sind, bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Bronchien pro Maus war abhängig von der Größe und Qualität eines HE Präparates.

3.2.2 Bestimmung der Mukusproduktion in der Lunge

Die pulmonale Mukusproduktion ist ein weiteres Charakteristikum der asthmatischen Reaktion. Da diese jedoch hauptsächlich bei Tieren, die einer Allergendisposition ausgesetzt wurden, beobachtet werden kann, werden die Lungen der OVA/OVA-behandelten Mäuse für die Auswertung herangezogen.

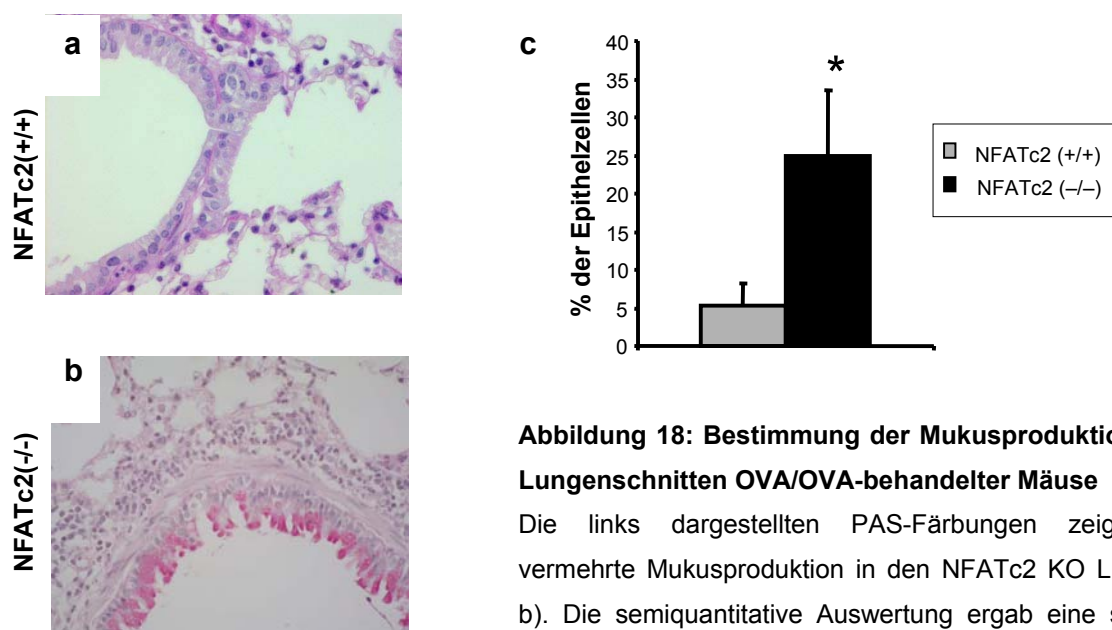


Abbildung 18: Bestimmung der Mukusproduktion in den Lungenschnitten OVA/OVA-behandelter Mäuse

Die links dargestellten PAS-Färbungen zeigen eine vermehrte Mukusproduktion in den NFATc2 KO Lungen (a, b). Die semiquantitative Auswertung ergab eine signifikant erhöhte Schleimsekretion in den NFATc2 defizienten Mäusen

Abbildung 18 a und b zeigt man die Alzianblau-(2,5)-PAS-Färbung, welche besonders zur Anfärbung von Schleimsubstanzen geeignet ist. Die hier gefärbten Lungenschnitte zeigen eine erhöhte Mukusproduktion der Bercherzellen in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse. Die semiquantitative Auswertung, die in Abbildung 18 c dargestellt ist, gibt den prozentualen Anteil der mukusproduzierenden Zellen im Vergleich zum Anteil der bronchialen Epithelzellen wieder. Eine Auswertung der PAS-Schnitte bei den OVA/PBS-behandelten Mäusen ist nicht möglich, da diese bei fehlender Allergendisposition nur eine geringe Mukusproduktion aufweisen.

3.2.3 Erhöhte Kollageneinlagerung in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse

Ein weiteres Charakteristikum des Asthma bronchiale ist die Einlagerung von Kollagen, einem Eiweißkörper, in das Lungengerüst. Hierbei kann es zu krankhaften Veränderungen des Gewebes und zu einer erniedrigten Elastizität der Bronchien kommen.

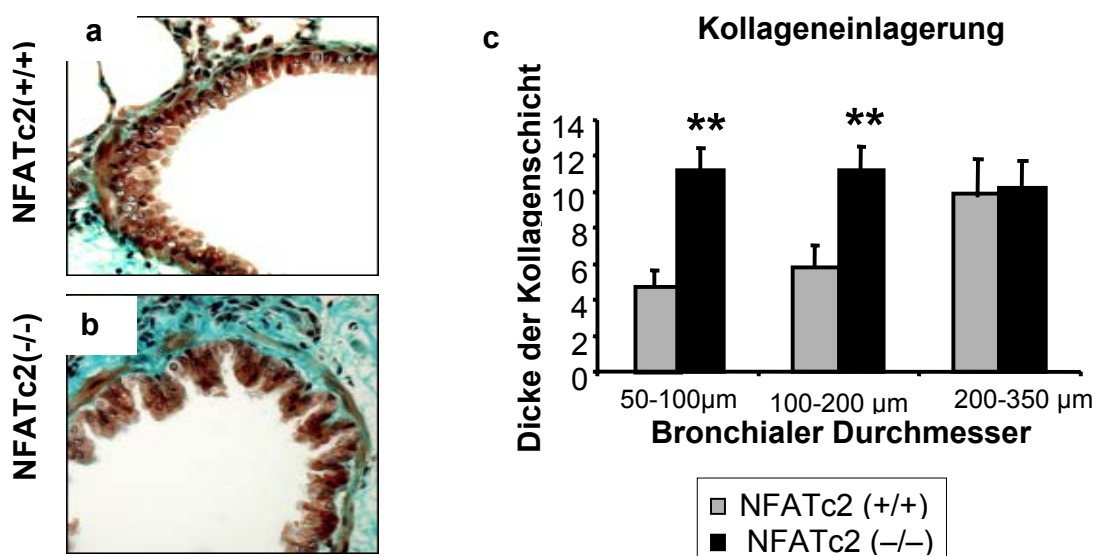


Abbildung 19: Bestimmung der Kollageneinlagerung in den Lungenschnitten

Die obige Abbildung zeigt die Quantifizierung der Kollageneinlagerung durch Trichromfärbung der Präparate nach Masson-Goldner. Die grün angefärbten Kollagenfasern kommen vermehrt in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse vor (a, b). Im Vergleich zu den WT zeigen die KO Mäuse lediglich eine vermehrte Kollagen-Deposition im Bereich der kleinen und mittelgroßen Bronchien (c).

Um eine bessere Auswertung zu ermöglichen, werden die Schnitte mit der Trichromfärbung nach Masson-Goldner, einer Färbemethode für Kollagenfasern, angefärbt. Kollagenreiche Areale erscheinen hier dunkelgrün, sodass eine Messung mit einem computergestütztem Mikroskop erleichtert wird. Dabei werden die Bronchien in drei Gruppen unterteilt, wobei von jeder Gruppe die durchschnittliche Kollagendicke bestimmt wird. Die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Bronchien wird durch deren Querschnitt definiert.

Bei der primär oberflächlich durchgeführten visuellen Analyse fällt auf, dass die NFATc2 defizienten Mäuse eine erhöhte Kollageneinlagerung in den Lungen vorweisen (Abbildung 19 a und b). Eine genauere Analyse ergibt, dass dies jedoch nur in den kleinen und mittelgroßen Bronchien der Fall ist. Eine signifikante Kollageneinlagerung in den Bronchien mit einem Durchmesser über 200 μm ist nicht festzustellen (Abbildung 19 c).

3.2.4 Quantifizierung der Eosinophilie in Lunge und BAL der NFATc2(-/-) und der NFATc2(+/+) Tiere

Die Eosinophilen gehören mit unter zu den wichtigsten inflammatorischen Zellen in der asthmatischen Reaktion. Sie lassen sich sowohl in HE-Schnitten, als auch in der BAL quantitativ bestimmen. Ähnlich der Mukusproduktion ist die Anzahl der pulmonalen Eosinophilen erst nach einer Allergendisposition gut zu erkennen.

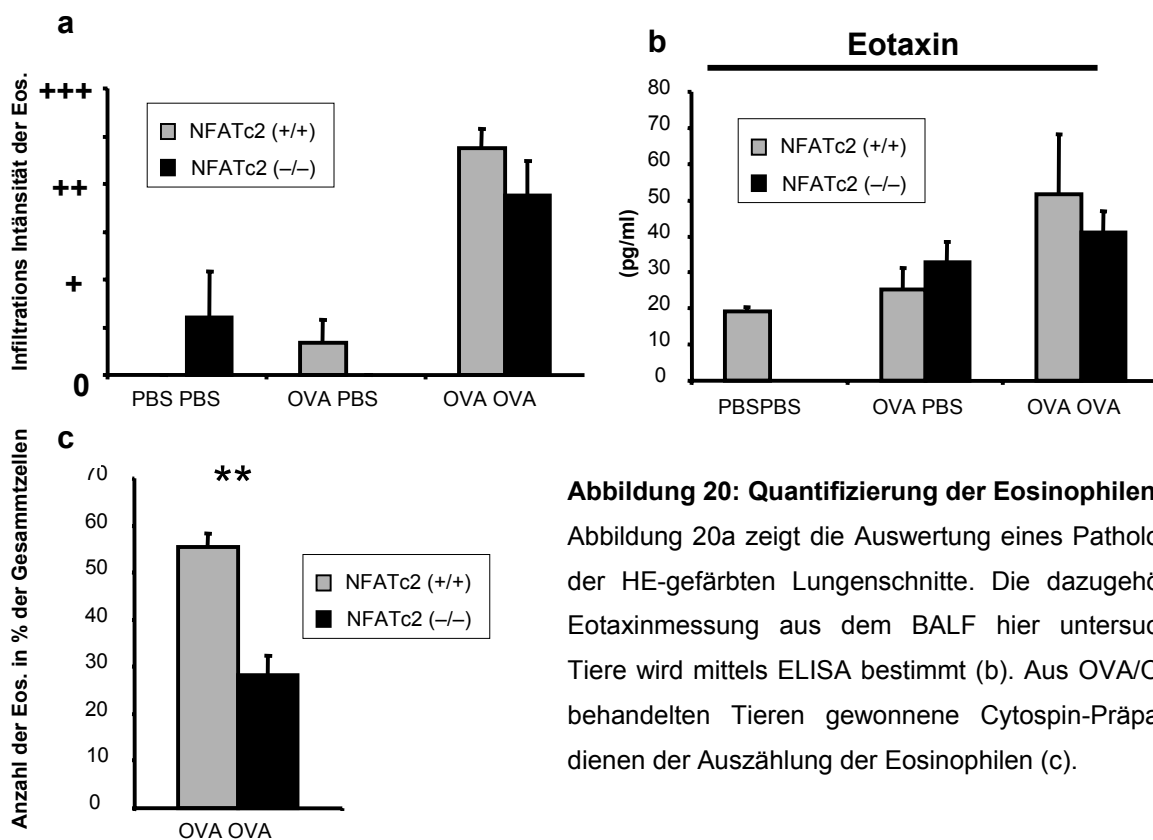


Abbildung 20: Quantifizierung der Eosinophilen

Abbildung 20a zeigt die Auswertung eines Pathologen der HE-gefärbten Lungenschnitte. Die dazugehörige Eotaxinmessung aus dem BALF hier untersuchter Tiere wird mittels ELISA bestimmt (b). Aus OVA/OVA-behandelten Tieren gewonnene Cytospin-Präparate dienen der Auszählung der Eosinophilen (c).

Trotz genaueren Untersuchungen kann keine Aussage über die Eosinophilie in den Hämatoxilin-Eosin gefärbten Lungenschnitten der untersuchten Mäuse getroffen werden. Sowohl unbehandelte, als auch OVA/PBS-behandelte Tiere weisen keine Migration von Eosinophilen in die Bronchien auf. Nur die OVA/OVA Gruppe zeigt eine hohe Menge an Eosinophilen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den KO und den Vergleichstieren festzustellen ist. Tendenziell zeigen jedoch die NFATc2 defizienten Mäuse eine erniedrigte Eosinophilenanzahl (Abbildung 20 a) in der OVA/OVA-Gruppe. Analog dazu wird der Level des Zytokins Eotaxin in der BALF der Tiere untersucht (Abbildung 20 b). Auch hier ist keinen signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen feststellbar. Eine ähnliche Tendenz wird jedoch in der OVA/OVA-Gruppe, wie in Abbildung 20a dargestellt beobachtet. Erst die Auswertung der BAL-Zellen mittels DifQuick-Färbung zeigt eine signifikante Reduzierung der Eosinophilenzahl in den NFATc2 KO Mäusen nach Allergendisposition (Abbildung 20 c). Eine Auszählung der Eosinophilen in der PBS/PBS sowie der OVA/PBS-Gruppe ist nach Durchsicht der Cytospin-Präparate nicht möglich.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Eosinophilen keine Rolle in dem Asthmamodell ohne Allergendisposition spielen. Außerdem kann angenommen werden, dass in diesem OVA/OVA-Modell die Eosinophilen-Entwicklung in der KO Maus teilweise gehemmt wird.

3.3 Bestimmung der Th1, Th2 und Th17 Zytokinproduktion der CD4+ T-Zellen

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, wird Asthma bronchiale durch die Th1- und Th2-Zytokinfreisetzung der CD4+ T-Zellen beeinflusst. Um sich ein genaues Bild von der Zytokinfreisetzung im Lungengewebe der NFATc2 defizienten Mäuse zu machen, werden im Folgenden die CD4+ T-Zellen aus den Lungen isoliert und bei verschiedenen Stimuli für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die dadurch gewonnenen Überstände werden mit Hilfe des ELISA auf Zytokinproduktion untersucht.

3.3.1 CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge NFATc2 defizienter Mäuse setzen vermehrt Th2 Zytokine frei

Für die experimentelle Untersuchung der Th2 Zytokin-Sekretion, werden die CD4⁺ T-Zellen der Lunge aus OVA/PBS- und OVA/OVA-behandelten Tieren isoliert. Anschließend werden die T-Zellen in der Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Medium über Nacht mit α CD3 bzw. α CD3 und α CD28 kultiviert.

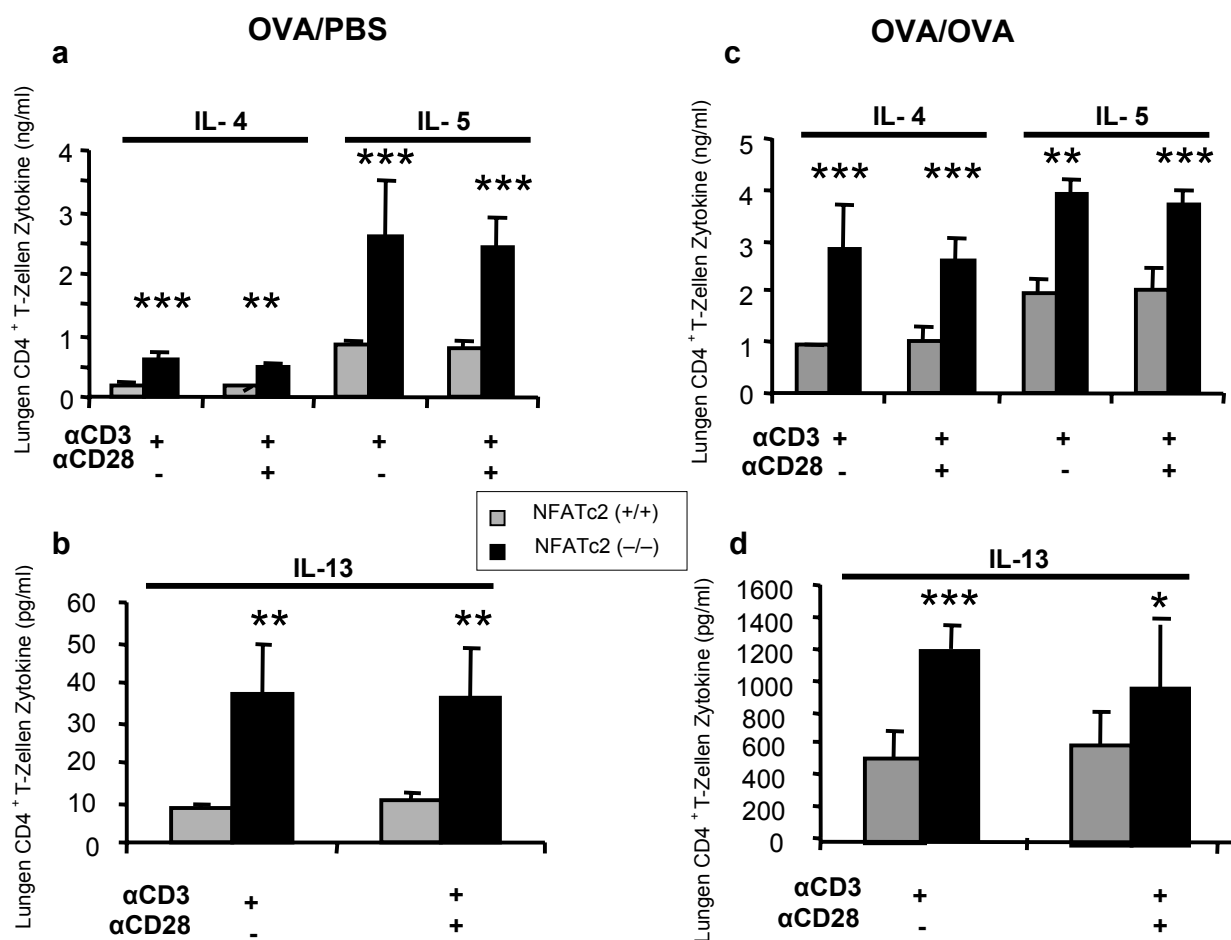


Abbildung 21: Th2 Zytokinfreisetzung der CD4⁺ T-Zellen der Lunge (KO vs. WT)

CD4⁺ T-Zellen aus NFATc2 KO bzw. WT werden mit α CD3 sowie α CD3+ α CD28 für 24 Stunden stimuliert und auf IL-4, IL-5 und IL-13 Zytokinproduktion untersucht. Sowohl die OVA/PBS- als auch die OVA/OVA-behandelten NFATc2 KO Mäuse zeigen eine signifikante Erhöhung der Th2 Zytokinfreisetzung (Abbildung 21 a-d). Hierbei korreliert die Menge an sezerniertem Zytokin mit der Behandlung der Mäuse, indem die OVA/OVA-behandelten Zellen eine größere Menge an dem jeweiligen Zytokin freisetzen.

Dabei ist nicht nur erkennenbar, dass die CD4⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse eine erhöhte Th2-Freisetzung gegenüber denen der Wildtyp Mäuse zeigen, sondern auch, dass die Zytokinfreisetzung der T-Lymphozyten sich in der Behandlung der Tiere und der Zellen widerspiegelt. Die Relevanz des NFATc2 Gens für die Zytokinexpression wurde bis dato nur in Zelllinien oder in Milz- bzw. Lymphknotenzellen untersucht. Beim direkten Vergleich von Milz- und Lungenzellen, zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Zytokinfreisetzung der Lungenzellen, die bei vergleichbarer Stimulierung um ein Vielfaches höher ist, als die der Zellen aus der Milz (Daten nicht gezeigt). Ähnliches kann beobachtet werden bei der Zytokinfreisetzung der OVA/PBS- und OVA/OVA-Tiere. Nach OVA-Allergendisposition steigt die IL-4 und IL-13 Produktion der CD4⁺ T-Zellen um ein Vielfaches an (Abbildung 21 a-d). Dies ist zweifelsfrei auf den kostimulatorischen Effekt des OVA-Antigens auf die T-Lymphozyten zurückzuführen. Überraschenderweise spiegelt sich dieser „post-OVA-Effekt“ nur in reduzierter Form bei der IL-5 Produktion nieder. Dies trifft besonders auf die NFATc2 defizienten Mäuse zu, deren IL-5 Produktion in geringerem Maße nach Allergendisposition im Vergleich zu der IL-5 Produktion der Wildtypen ansteigt (Abbildung 21 c).

Um die Th2-Antwort besser zu charakterisieren, wird das Th2-Zytokin IL-10, welches auch gleichzeitig zu den T-regulatorischen Zytokinen gehört, untersucht.

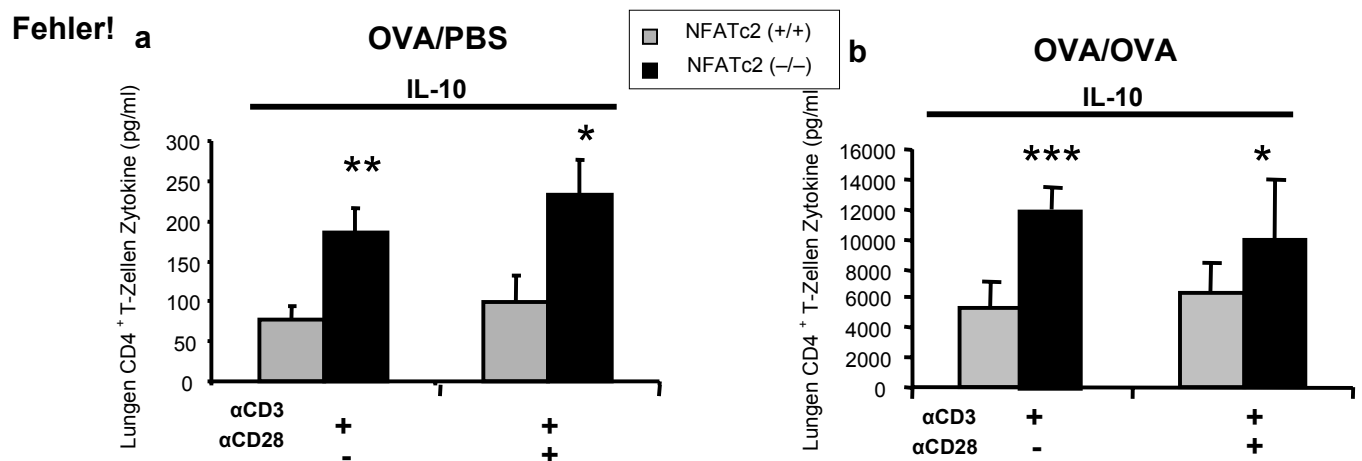


Abbildung 22: Erhöhte IL-10 Produktion der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge (KO vs. WT)

CD4⁺ T-Zellen werden ohne sowie nach Allergendisposition auf IL-10 Produktion untersucht. Die Untersuchung erfolgt nach α CD3 sowie nach α CD3+ α CD28 Stimulation für 24 Stunden. Unter beiden Bedingungen weisen NFATc2 defiziente CD4⁺ T-Zellen eine vermehrte Zytokinfreisetzung auf. (a und b).

Wie man an der Auswertung des ELISA in Abbildung 22 erkennbar ist, sezernieren die NFATc2 defizienten Mäuse vermehrte Mengen an IL-10. Dabei kann die Freisetzung ähnlich wie bei IL-4 und IL-13 durch OVA-Allergendisposition fast um das 100-fache gesteigert werden. Da eine erhöhte IL-10 Produktion oft Hand in Hand mit dem regulatorischem Zytokin TGF- β_1 (transforming growth factor- β) einhergeht, werden die Überstände mittels ELISA auf TGF- β Produktion untersucht.

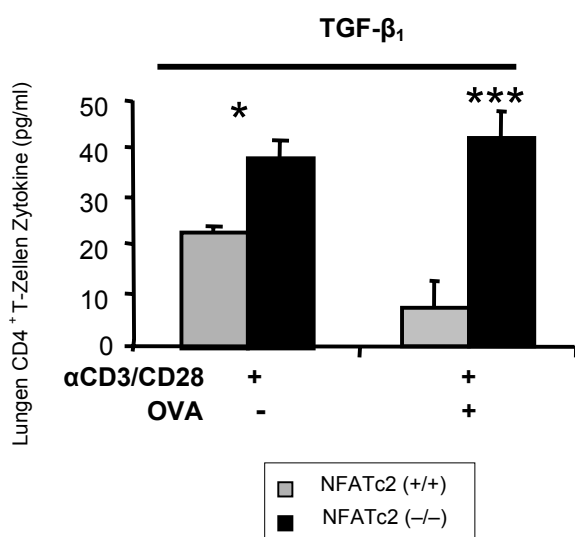


Abbildung 23: Erhöhte TGF- β_1 Produktion in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse

In dieser Abbildung wird der Zytokin-Level des TGF- β_1 dargestellt. Ähnlich wie bei den anderen Zytokinen, zeigen die NFATc2 defizienten Mäuse eine signifikante Erhöhung von TGF- β_1 nach 24 h. Die Messung erfolgt aus den Überständen unterschiedlich stimulierter CD4+ T-Zellen. Hierbei wurde das aktivierte TGF- β_1 gemessen

Wie aus Abbildung 23 zu erkennen ist, produzieren die aus der Lunge der NFATc2 KO Mäuse isolierten CD4+ T-Lymphozyten vermehrt TGF- β_1 . Dies lässt daher die berechnete Frage zu, ob die Anzahl der T-regulatorischen Zellen bei dieser genetisch veränderten Knockout Maus sich von der der Wildtyp Maus unterscheidet.

3.3.2 Vermehrte IL-17 Produktion in den CD4+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse

Neben der Bestimmung der Th2 Zytokine, wird die Freisetzung des bis dato wenig untersuchten IL-17 Zytokins in den aus der Lunge isolierten CD4+ T-Zellen bestimmt.

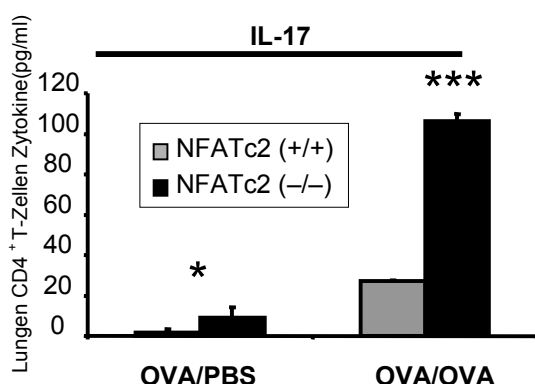


Abbildung 24: Erhöhte IL-17 Produktion CD4+

T-Zellen der Lunge (KO vs. WT)

Isolierte CD4+ T-Zellen werden für 24h mit anti-CD3 und anti-CD3 + anti-CD28 kultiviert. Die Bestimmung der IL-17 Produktion erfolgt mittels ELISA aus den Überständen der Zellen.

Ähnlich der Th2 Zytokine ist die Konzentration von IL-17 in der Abbildung 24 bei den NFATc2 defizienten Mäusen signifikant erhöht. Die Messung wird aus den Überständen von anti-CD3 und anti-CD3 + anti-CD28 behandelten CD4+ T-Zellen der Lunge mittels ELISA bestimmt. Auffallend ist, dass die IL-17 Produktion erst nach Allergendisposition einen sehr hohen Level aufweist. Um die Möglichkeit eines intrinsischen Fehlers der NFATc2 CD4+ T-Zellen abzuklären, wird die IL-17 Produktion naiver CD4+CD62L+ T-Zellen aus der Milz untersucht. Dabei werden die naiven T-Zellen 4 Tage in Gegenwart von anti-IFN- γ , anti-IL-4, TGF- β_1 , IL-6 und IL-2 kultiviert und anschließend auf IL-17 Produktion untersucht. Sowohl die intrazelluläre Färbung der Zellen mittels FACS-Analyse als auch die Untersuchung der Überstände mittels ELISA ergibt eine erhöhte IL-17 Produktion (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Vermehrte IFN- γ Produktion CD4+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse

Um sich einen Überblick über die Freisetzung der Th1 Zytokine zu verschaffen, werden die Überstände der CD4+ T-Zellen auf IFN- γ Produktion untersucht.

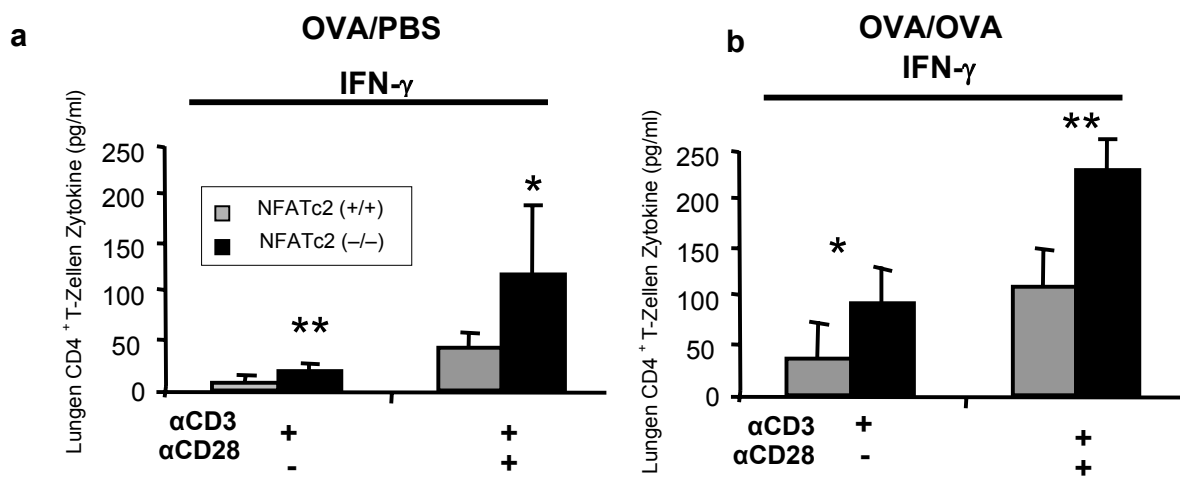


Abbildung 25: Erhöhte IFN- γ Produktion CD4+ T-Zellen der Lunge (KO vs. WT)

Die Abbildungen a und b zeigten die IFN- γ Produktion der CD4+ T-Zellen aus der Lunge unter verschiedenen Bedingungen. Sowohl die OVA/PBS- als auch die OVA/OVA-behandelten NFATc2 KO Tiere weisen eine erhöhte IFN- γ Produktion bei den α CD3 und α CD3+ α CD28 behandelten Versuchsgruppen auf (kultiviert für 24 Stunden).

Analog zu den bereits publizierten Daten, welche die Zytokinfreisetzung der CD4+ T-Zellen aus der Milz untersuchen, zeigen die CD4+ T-Zellen der Lunge ebenfalls eine signifikant erhöhte IFN- γ Produktion in den NFATc2 defizienten Mäusen. Abbildung 25 a und Abbildung 25 b zeigen ähnlich wie die Abbildung 21 einen Anstieg an IFN- γ nach OVA/OVA-Behandlung. Auch hier ist erkennbar, dass die Antigenaktivierung eine erhöhte T-Zellantwort und Zytokinfreisetzung zur Folge hat.

3.4 Charakterisierung von CD4+ T- Zellen aus Lunge und Milz mittels Durchflusszytometrie

Neben der Beurteilung der Zytokinfreisetzung der CD4+ T-Zellen im Lungengewebe wird weiterhin die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die *in vivo* stimulierten Zellen eindeutig zu identifizieren, als auch ihren Maturierungs- bzw. Differenzierungszustand besser bestimmen zu können. Hierbei wird die Frühaktivierung der CD4+ Zellen mittels der Oberflächenmarker CD44 und CD69 bestimmt. Weiterhin wird ebenfalls der Oberflächenmarker CD49b, besser bekannt als VLA-2 (ein Kollagenrezeptor), untersucht. Auf Grund der erhöhten IL-10 und TGF- β_1 Produktion, wird weiterhin die T-regulatorische Population näher untersucht. Ferner erfolgt die durchflusszytometrische Analyse dieser Oberflächenmarker am Tag der AHR-Messung, um eine *in vivo* nahe Aussage treffen zu können.

3.4.1 Erhöhte aktivierte CD4+ CD44+ CD69+ Population in den NFATc2 KO Mäusen

Obwohl die Aktivierungsmarker CD44 und CD69 vermehrt auf den Eosinophilen von Asthmatikern exprimiert werden, findet man diese auch vermehrt auf T-Lymphozyten. Dabei handelt es sich um konventionelle CD4+ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp (CD44+ CD69+). Die Messung der Zellen erfolgt aus den Gesamtzellpopulationen der Lunge und Milz. Hierbei werden zunächst die Gesamtzellen isoliert und 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln auf CD1d, CD4, CD44 und CD69 Expression gefärbt. Anschließend werden die Proben mit dem Durchflußzytometer gemessen und ausgewertet.

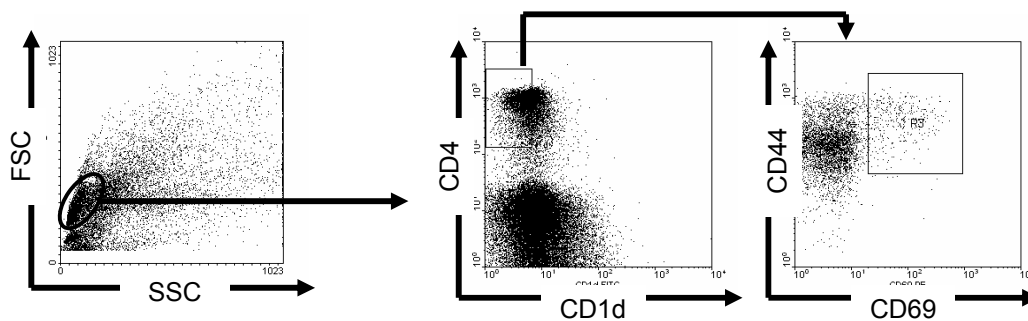


Abbildung 26: Schematische Darstellung der FACS-Analyse in den Gesamtzellen der Lunge

Damit die Lymphozytenpopulationen aus der Lunge untersucht werden kann, wird diese im ersten Schritt separat aus der Gesamtpopulation heraus „gated“, um tote und andere Zellen mit einer erhöhten Autofluoreszenz aus der Auswertung auszugrenzen (links). Anschließend wird die zu untersuchende Population ausgewählt und in einem dritten Dotplot gegen zwei andere Fluorochrome dargestellt. Die prozentuelle Auswertung bezieht sich auf die ausgewählte CD4+ CD1d- Population.

Die Auswertung einzelner Populationen aus den Gesamtzellen unterliegt einigen Regeln. Dies trifft besonders auf die Auswertung der Gesamtzellen der Lunge zu. Da in der Lunge mehrere Zellpopulationen mit unterschiedlicher Größe und Granularität vorkommen, muss die zu untersuchende Population von den restlichen Zellpopulationen abgegrenzt werden. Hierzu wertet das FACS-Gerät die Daten der Streuung von ausgesendetem Laserlicht aus, wobei die Vorwärtsstreuung (Größe = FSC) und Seitwärtsstreuung (Granularität = SSC) gemessen wird. Somit kann die Lymphozytenpopulation durch ihre Lage im Dotplot identifiziert werden. Damit entspricht die in Abbildung 26 (links) eingegrenzte Population der Größe und der Beschaffenheit der Lymphozyten. Um sicherstellen zu können, dass bei der Untersuchung keine NKT Zellen, die ebenso CD44+ CD69+ sein können, mit in die Auswertung einfließen, werden nur die CD4+ jedoch nicht CD1d+ (NKT Marker) Zellen „gated“ (Mitte) und gegen CD44 und CD69 dargestellt. Aus dem rechten Dotplot kann dann der prozentuelle Anteil der CD44 CD69 doppelpositiven CD4+ CD1d- T-Zellen bestimmt werden.

Diese Auswertungsmethode wird ebenfalls auf die aus der Milz isolierten Zellen angewendet, wobei die Unterschiede in der Granularität der Milzzellen nicht so ausgeprägt sind wie in der Lunge.

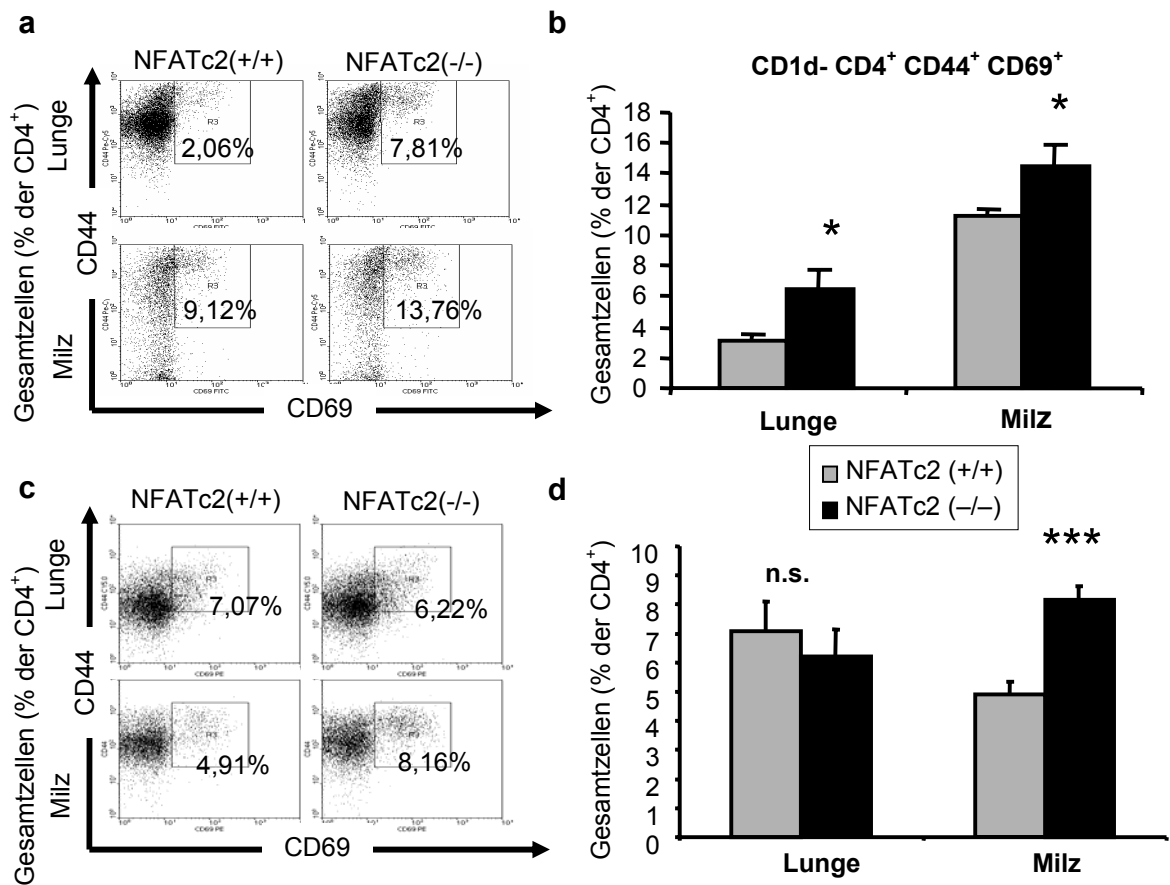


Abbildung 27: Darstellung von CD4+ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp in der Lunge und Milz

Um die Aktivierung der T-Zellen zu überprüfen, werden die Gesamtzellen der Lunge bzw. der Milz isoliert und mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD1d, CD4, CD44 und CD69 gefärbt. Hierbei werden die Zellen aus OVA/PBS- oder OVA/OVA-behandelten Tieren isoliert. In der oberen Hälfte der Abbildung 27 erkennt man, dass die NFATc2 defizienten Mäuse nach intraperitonealer OVA-Gabe (i.p.) eine erhöhte Menge an CD4+ CD44+ CD69+ T-Zellen in Milz und Lunge vorweisen (a, b). Nach einer zusätzlichen Allergendisposition ist eine Erhöhung dieser Aktivierungsmarker nur in der Milz jedoch nicht in der Lunge zu verzeichnen (c, d).

Bei der Auswertung der gemessenen Proben konnte festgestellt werden, dass die NFATc2 defiziente Mäuse sowohl nach OVA/PBS-, als auch nach OVA/OVA-Behandlung eine erhöhte Anzahl an aktivierten CD4+ Zellen in der Milz vorweisen (Abbildung 27 a und b).

In den bisherigen Untersuchungen konnte immer demonstriert werden, dass die CD4⁺ T-Zellen in der Lunge von NFATc2 Mäusen einen Phänotyp vorweisen, der mit dem Phänotyp der aus der Milz gewonnenen T-Zellen übereinstimmt. Obwohl die CD4⁺ T-Zellen der Lunge in den OVA/PBS-behandelten KO Mäusen einen signifikanten Unterschied in der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zeigen, so ist dieser nach Allergendisposition nicht mehr erkennbar (Abbildung 27 und d). Da es sich hier um ein lungenspezifisches Phänomen handelt, muss angenommen werden, dass in der Lunge zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen, welche die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

3.4.2 Erhöhte CD4⁺ CD49b⁺ (VLA-2) Population in NFATc2 KO Mäusen

Bereits in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass die Kollagendeposition eine erhebliche Rolle bei Asthma bronchiale spielt. CD49b, besser bekannt als VLA-2 bzw. als $\alpha_2\beta_1$ Integrin, gehört neben den CD49a zu wichtigsten Oberflächenrezeptoren für Kollagen. Beide Vertreter binden vorwiegend an Kollagen Typ I, welches 90% der Gesamtkollagenmenge im Körper ausmacht (68).

Nach Färbung der T-Zellen aus Milz und Lunge mit CD49b, findet man eine kleine Population, die sowohl CD4 als auch CD49b exprimiert (Abbildung 28). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass der Oberflächenmarker CD49b vermehrt auf CD4⁺ jedoch nicht auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

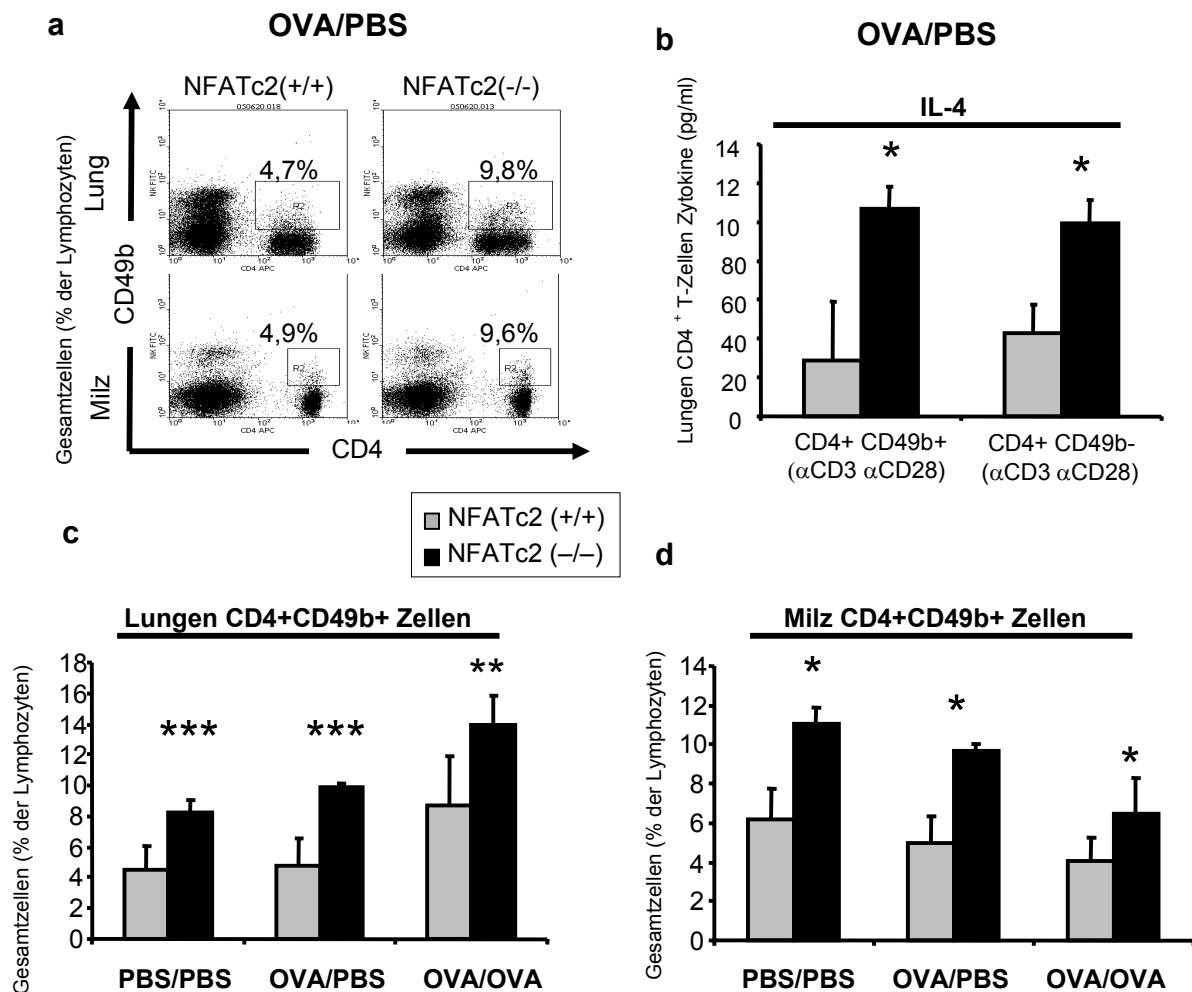


Abbildung 28: NFATc2 KO Mäuse zeigen eine Erhöhung der CD4+ CD49b+ Population sowohl in der Milz als auch in der Lunge.

Die Abbildung 28 a zeigt eine Erhöhung der CD4 CD49b doppelpositiven Zellen der Lunge und Milz von NFATc2 defizienten Mäusen nach OVA/PBS-Behandlung. Um die Funktion dieser Population näher zu untersuchen, werden diese mit Hilfe eines Zellsorters (FACS Vantage) isoliert und auf IL-4 Produktion untersucht (b). Weiterhin wird überprüft, ob es sich hier um eine behandlungsspezifische Erhöhung handelt, oder ob die KO Mäuse diese doppelpositive Fraktion ebenfalls im naiven bzw. chronischem Model vorweisen (c, d).

Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, zeigen die OVA/PBS-behandelten NFATc2 defizienten Mäuse eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD49b auf CD4+ positiven T-Zellen. Diese Erhöhung ist im Vergleich zu den Wildtypen nicht nur auf die Lunge beschränkt, sondern ebenfalls in der Milz zu finden (Abbildung 28 a).

Um verifizieren zu können, dass es sich hier um ein behandlungsunabhängiges Phänomen handelt, wurde diese Population sowohl in naiven Zustand als auch nach einer Allergendisposition untersucht (c, d). Der Vergleich des prozentuellen Anteils dieser Subpopulation vor und nach Allergendisposition verdeutlicht die Bedeutung der OVA-Behandlung. Während die relative Anzahl dieser Zellen in der Lunge nach OVA/OVA-Behandlung ansteigt, so sinkt diese zugleich in der Milz.

Da sich bei dem Oberflächenprotein CD49b um einen Kollagenrezeptor handelt, liegt die Vermutung nahe, dass CD4⁺ T-Zellen, welche diesen vermehrt exprimieren, eine erhöhte Affinität zu kollagenreichen Bereichen in der Lunge haben. Damit lässt sich die vermehrte Migration der CD4⁺ T-Lymphocyten in den intraepithelialen Raum (Abbildung 17) in Einklang mit der vermehrten Kollagenexpression in der Lunge bringen (Abbildung 19). Zur Bearbeitung der Frage, ob die CD4⁺ CD49b⁺ T-Zellen gleiche Eigenschaften aufweisen wie CD4⁺ CD49b⁻ T-Zellen, ist diese Population mit Hilfe eines Sorters (FACS Vantage) aus den Wildtypen und den Knockout Mäusen isoliert und auf Zytokinexpression untersucht worden. Die CD4⁺ CD49b⁺ doppelpositiven Zellen der KO Mäuse zeigten eine erhöhte IFN- γ (Daten hier nicht gezeigt) und IL-4 Produktion (Abbildung 28 b) im Vergleich zu der WT Gruppe. Eine Differenz zwischen den CD4⁺ CD49b⁺ und den CD4⁺ CD49b⁻ T-Zellen ist jedoch nur in der IFN- γ Produktion erkennbar, so dass angenommen werden kann, dass VLA-2 die Migration der CD4⁺ T-Zellen beeinflusst und zugleich für die erhöhte IFN- γ Freisetzung der CD4⁺ Zellen aus NFATc2 KO Mäusen verantwortlich ist (Abbildung 25).

3.4.3 Die Anzahl T-regulatorischer Zellen in der Lunge von NFATc2 KO Mäusen ist erhöht.

Die T-regulatorische Population in einer gesunden Maus mit dem genetischen Hintergrund Balb/c umfasst etwa 2-5% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Die Charakterisierung und Isolierung dieser Population hat sich jedoch als sehr schwierig erwiesen, da die meist bis dato verwendete CD4⁺ CD25⁺ Definition dieser Zellen, auch eine große Anzahl an Effektorzellen beinhaltet. So exprimieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25). Soll nach der heutigen Definition eine

regulatorische T-Zelle charakterisiert werden, so kann die intrazelluläre FOXP3 FACS-Färbung genutzt werden, die jedoch nur bei fixierten und daher auch toten Zellen durchgeführt werden kann. Dies wiederum schließt eine Isolierung lebender Zellen aus.

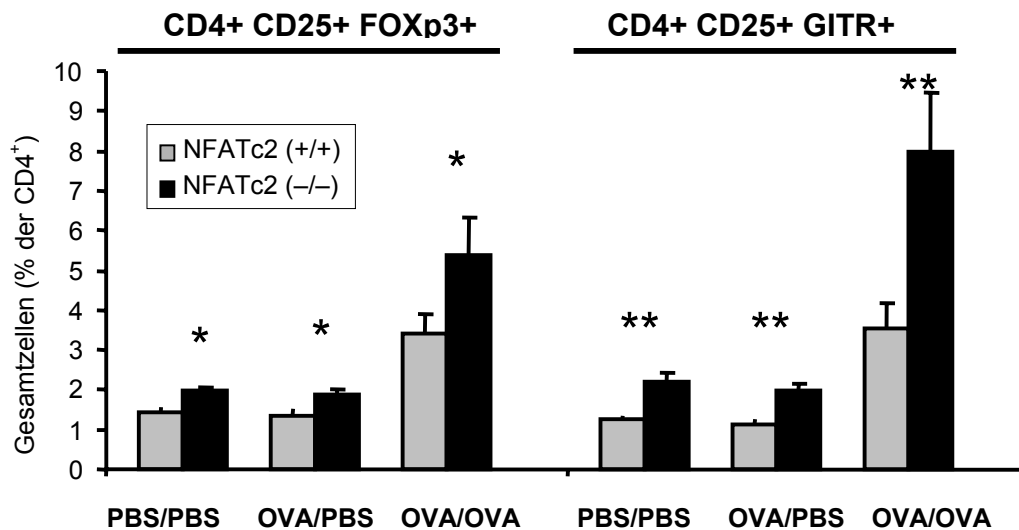


Abbildung 29: NFATc2 KO Mäuse zeigen eine erhöhte Zahl an Treg in der Lunge

Zur Bestimmung der T-regulatorischen Population in der Lunge werden die Gesamtzellen auf die Treg-Marker CD4, CD25, GITR und FOXP3 untersucht. Die durch die schwarzen Balken dargestellte Treg Population NFATc2 defizienter Mäuse zeigen in allen Konditionen eine Erhöhung, wobei nur bei den OVA/OVA-behandelten Mäusen diese zwischen 3-8% aller CD4+T-Zellen liegt.

Die Ergebnisse in Abbildung 22 (IL-10 Produktion) und Abbildung 23 (TGF- β_1 Produktion) werfen die Frage nach der T-regulatorischen Population in NFATc2 defizienten Mäusen auf. Um diese zu beantworten, werden die Zellen, wie in Abbildung 29 gezeigt, mit unterschiedlichen Markern gefärbt. Sowohl die nukleare FOXP3 als auch die Oberflächenfärbung mit GITR zeigt eine signifikante Erhöhung der Treg Populationen in der Lunge von NFATc2 defizienten Mäusen. Der prozentuelle Anteil der T-regulatorischen Population ist zwischen der PBS/PBS- und OVA/PBS-Behandlung vergleichbar. Obwohl die NFATc2 defizienten Mäuse eine signifikante Erhöhung dieser beiden Konditionen zeigen, so ist der absolute Unterschied verglichen zu der Gesamtpopulation der CD4+ T-Zellen sehr gering. Erst nach OVA-Allergendisposition steigt dieser auf über 5% an.

Ein weiteres Indiz für die Erhöhung der Treg Zellzahl, ist die vermehrte Expression von FOXP3 mRNA in den isolierten CD4⁺ T-Zellen der Lunge.

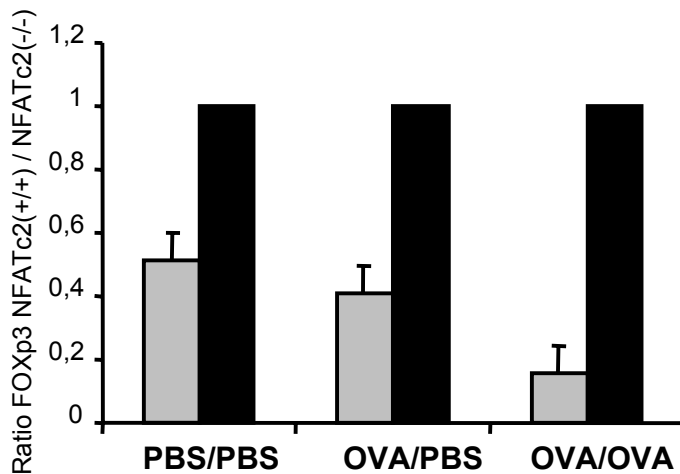


Abbildung 30: NFATc2 KO CD4⁺ T-Zellen exprimieren erhöhte Mengen an FOXP3 mRNA

Um die FOXP3 Expression in den Lungen der CD4⁺ T-Zellen zu bestätigen, wird die mRNA aus diesen isoliert und mit Hilfe der Realtime PCR auf Expression von FOXP3 mRNA bestimmt. Diese ist in allen Konditionen in den NFATc2 KO CD4⁺ T-Zellen erhöht.

Für die Bestimmung der mRNA Expression werden für 24h ausplattierte CD4⁺ T-Zellen verwendet, die einen Tag zuvor aus den Mäusen mittels MACS-Separation isoliert wurden. Da die durch die Isolation bedingte Gesamt-mRNA-Menge von Probe zu Probe unterschiedlich ist, wird diese in Tripletten mittels Realtime PCR auf die FOXP3 mRNA und das „housekeeping gene“ EF1 α (Elongationsfaktor-1 alpha) untersucht, um eine relative Expressionsmenge von FOXP3 berechnen zu können. Hierbei werden die gewonnenen FOXP3 Werte auf die Expression des „housekeeping gene“ EF1 α normalisiert. Da die für die mRNA Gewinnung verwendeten CD4⁺ T-Zellen aus unterschiedlichen Versuchen stammen, wird für jede Kondition der NFATc2 KO mRNA Level von FOXP3 gleich eins gesetzt und mit dem zugehörigen mRNA FOXP3-Level der Wildtyp Tiere in Relation gebracht.

Der in Abbildung 30 dargestellte mRNA FOXP3-Level spiegelt die Ergebnisse der FACS-Analyse wieder. Die Differenz zwischen der FOXP3-Menge in der Wildtyp Maus und der KO Maus steigt mit OVA Behandlung. Auch hier ist zu erkennen, dass in den ersten beiden Konditionen der mRNA-Level vergleichbar ist. Nach Allergendisposition steigt die NFATc2 KO vs. WT „ratio“ auf das Fünffache an, so dass man auch hier

davon ausgegangen werden kann, dass mehr FOXP3 in den OVA/OVA-behandelten Mäusen vorliegt als in den PBS/PBS bzw. OVA/PBS Mäusen.

3.5 Untersuchung der Hyperproliferation der aus Lunge und Milz isolierten CD4+T- Zellen

Um das suppressive Potential der T-regulatorischen Zellen in einem System zu untersuchen, kann einerseits die Proliferation der Gesamtpopulation der CD4+ T-Zellen bei bekanntem T-regulatorischem Anteil bestimmt werden, oder durch Veränderungen des Verhältnisses von regulatorischen T-Zellen zu konventionellen CD4+CD25- T-Zellen eine halbmaximale Suppression ermittelt werden. Im ersten Schritt wird die Proliferation der CD4+ T-Zellen von NFATc2 KO und Wildtyp Mäusen bestimmt. Nach Isolation der Zellen mittels MACS wird mit dem Vitalfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt, welcher im Wellenlängenbereich von 510 bis 550 nm grün fluoresziert und mit einem FACS-Gerät quantitativ erfasst werden kann. Die Proliferation wird am Tag 3 oder 4 gemessen, wobei 20 Stunden nach dem Proliferationsstart die Einstellungen des Gerätes vorgenommen werden. Da CFSE innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden von der Zelle aktiv ausgeschleust werden kann, bevor es stabil sich in die Zelle einlagert, ist die Festlegung der Ausgangsfluoreszenz erst nach 20 Stunden möglich.

3.5.1 CFSE markierte CD4+ T-Zellen aus NFATc2 KO Mäusen zeigen eine vermehrte Proliferation

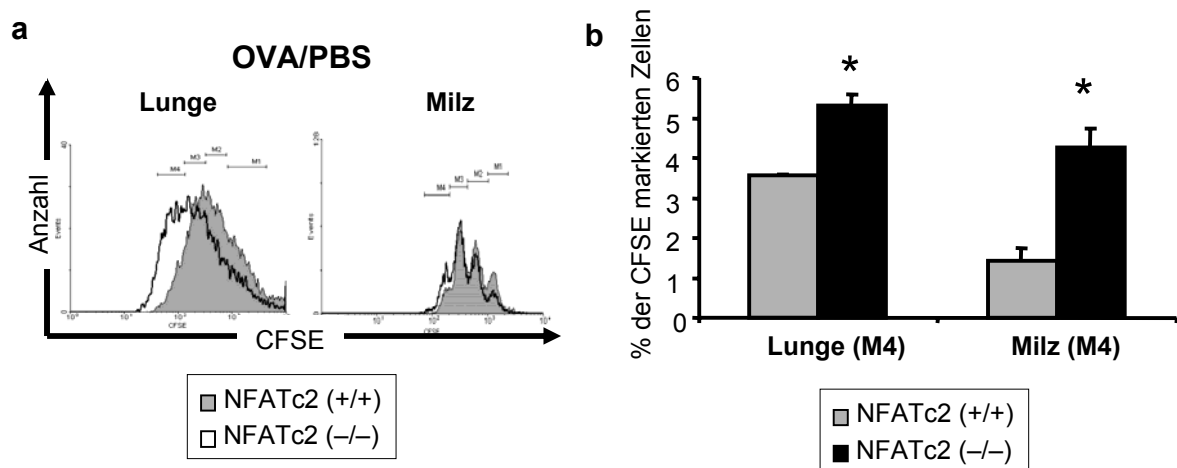


Abbildung 31: NFATc2 KO CD4+ T-Zellen zeigen eine erhöhte Proliferation

Für die Untersuchung der Proliferation werden die CD4+ Zellen aus der Milz und Lunge OVA/PBS-behandelter Mäuse isoliert und mit CFSE gefärbt. Vier Tage nach dem Ausplattieren der Zellen wird die Intensität und Anzahl der CFSE markierten Zellen mittels FACS bestimmt (a). Das Balkendiagramm der letzten Proliferationsstufe M4 zeigt eine signifikante Hyperproliferation der aus Lunge und Milz isolierten CD4+ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse (b).

Ein wesentliches Merkmal der isolierten NFATc2 CD4+ T-Zellen aus der Milz ist die in der Literatur beschriebene Hyperproliferation. In dieser Arbeit soll ebenfalls geklärt werden, ob die CD4+ T-Zellen aus der Lunge eine erhöhte Proliferation aufweisen. Um dem nachzugehen, werden die aus Lunge und Milz isolierten CD4+ T-Zellen mit dem Vitalfarbstoff CFSE gefärbt und über vier Tage mit anti-CD3 in mit 0,5mg/ml OVA versetzten RPMI-Medium kultiviert. Als antigenpräsentierende Zellen dienen mit Mitomycin/c behandelte A20-Tumorzellen (Maus B-Zell Lymphom). Wie in Abbildung 31a dargestellt, zeigen die CD4+ T-Zellen aus OVA/PBS-behandelten Mäusen sowohl in der Milz als auch in der Lunge eine höhere Teilungsrate. Wird jedoch nur das Teilungsstadium M4 betrachtet, so ist zu erkennen, dass die Proliferation der CD4+ NFATc2 KO Mäusen viel höher in der Milz als in der Lunge ist (Abbildung 31 b). Dieses Phänomen kann durch die erhöhte Treg Population verursacht werden, die in der Lunge

zu finden ist. Diese Daten erklären jedoch nicht, wieso grundsätzlich eine Hyperproliferation in den NFATc2 defizienten Mäusen zu verzeichnen ist.

3.5.2 NFATc2 KO CD4+ CD25- konventionelle T-Zellen lassen sich weder durch NFATc2 KO noch durch WT Treg supprimieren

Um die Problematik der Proliferation zu beantworten, haben wir einerseits die konventionellen CD4+ CD25- T-Zellen, andererseits die suppressiven Eigenschaften der NFATc2 regulatorischen T-Zellen untersucht. Die Beurteilung dieser Fragestellungen erfolgt in den unbehandelten NFATc2 KO bzw. in den unbehandelten Wildtypen. Für diese Versuche werden nur Milzzellen verwendet, da sich die Isolierung einer reinen „regulatorischen T-Zelle“ sich als sehr schwierig erwiesen hat. Um lebende T-regulatorische Zellen isolieren zu können, wird auf Oberflächenmarker zurückgegriffen, welche diese Population definieren. Wie bereits in Abbildung 29 dargestellt, zeigen die CD4+ CD25++ GITR++ Zellen annähernd den gleichen prozentualen Anteil wie CD4+ CD25+ FOXP3+ Zellen. Weiterhin kann mittels FACS beobachtet werden, dass annähernd alle CD4+ CD25++ GITR++ Zellen auch CD4+ CD25+ FOXP3+ exprimieren und somit als regulatorische T-Zellen definiert werden können (Daten hier nicht gezeigt). Da in diesem Versuch die konventionellen Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit den regulatorischen T-Zellen kokultiviert werden müssen, um sie auf Proliferation zu untersuchen, ist die Anzahl der zu untersuchenden Zellen entsprechend hoch. Aus diesem Grunde fällt die Wahl auf die ³H-Thymidin Proliferationsmessung, da bei dieser Methode die Anzahl der benötigten Zellen wesentlich niedriger ist als bei der CFSE-Methode (ca. 40.000 Pro Well). Weiterhin gehört die ³H-Thymidin Proliferationsmessung zu den genaueren und sensitivsten Methoden zur Analyse der T-Zellproliferation.

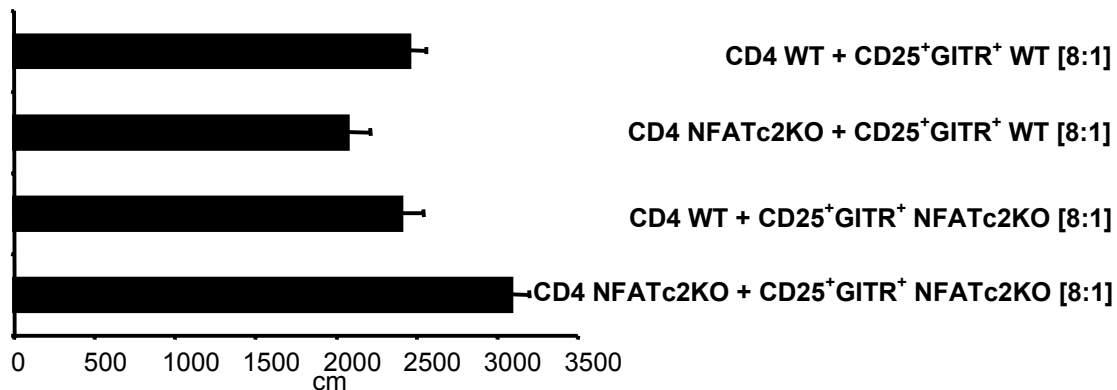


Abbildung 32: Messung der suppressorischen Eigenschaften der CD4⁺ CD25⁺ GITR⁺ Zellen

Aus sechs Wochen alten Mäusen werden die CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen mittels FASC-Sort isoliert und im Verhältnis 1:8 mit CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen kokultiviert. Nach vier Tagen Stimulation wird ³H-Thymidin für ca. 18 Stunden der Kultur zugegeben. Anschließend werden die Proben mit einem beta-Szintillationszähler gemessen und ausgewertet. Der Auswertung kann entnommen, dass die CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen keine suppressiven Eigenschaften aufweisen.

Aus sechs Wochen alten Mäusen werden die konventionellen T-Zellen in einem Verhältnis von 8:1 mit CD4⁺CD25⁺GITR⁺ Zellen kokultiviert und nach vier Tagen auf Proliferation untersucht (Abbildung 32) Unabhängig von der Versuchsgruppe sind keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zu verzeichnen. Der Auswertung kann lediglich entnommen werden, dass die NFATc2 KO konventionelle T-Zellen (dargestellt im untersten Balken) die höchste Proliferation aufweisen. Das Fehlen jeglicher Suppression, offenbarte eindeutig, dass die CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen sowohl in den NFATc2 defizienten Mäusen als auch in den Wildtyp Mäusen keinen suppressiven Effekt zeigen und damit nicht zu der T-regulatorischen Population gehören.

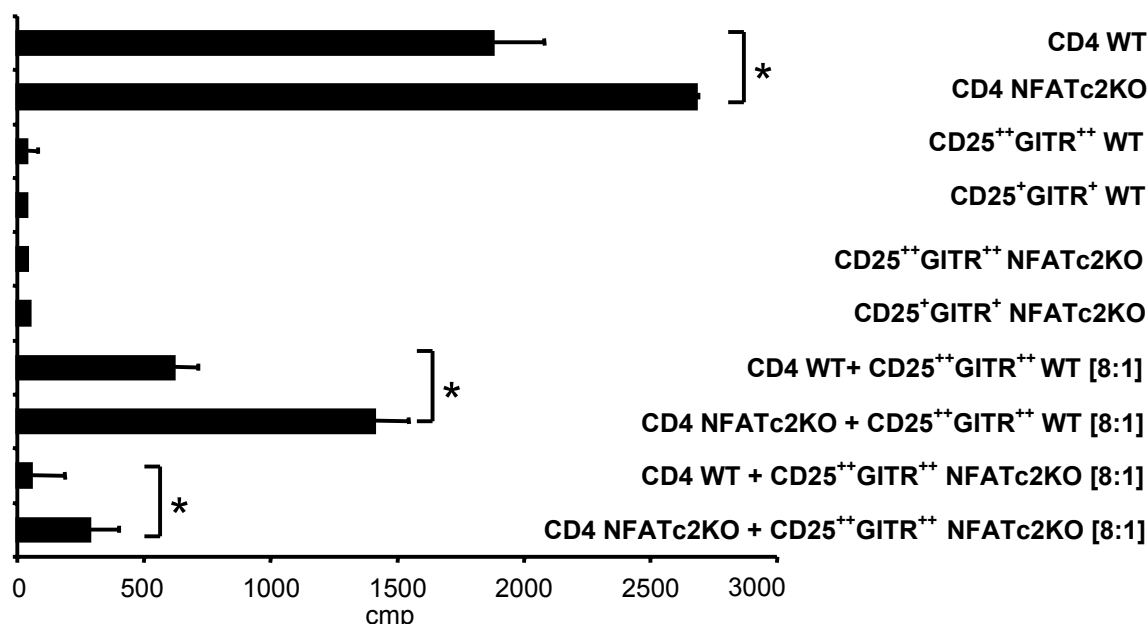


Abbildung 33: Messung der suppressorischen Eigenschaften der CD4+ CD25⁺⁺ GITR⁺⁺ Zellen

Um zu Testen, ob die CD4+ CD25⁺⁺ GITR⁺⁺ T-Zellen in der Lage sind die konventionellen CD4+ CD25- Zellen zu supprimieren, werden diese im Verhältnis 8:1 für vier Tage kokultiviert und 18 Stunden nach Zugabe von ³H-Thymidin durch beta-Scintillation gemessen. In allen Kokulturen ist die Proliferation der NFATc2 KO CD4+ CD25- Zellen im Vergleich zu den WT Zellen erhöht.

Wie in Abbildung 33 gezeigt, ist die Proliferation der konventionellen CD4+ CD25- T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erhöht (dargestellt in den ersten beiden Balken). Damit werden die in Abbildung 31 dargestellten CFSE-Daten der Gesamtpopulation der CD4+ T-Zellen bestätigt. Weiterhin kann in diesem Versuch gezeigt werden, dass alle CD4+ CD25+ GITR+ Zellen sowohl GITR+ als auch GITR^{hi} (GITR^{hi}) keine Proliferation vorweisen. Dies gilt sowohl für die Wildtyp, als auch für die NFATc2 defizienten Mäuse (Balken 3-6). Die untersten vier Balken zeigen eindeutig die suppressiven Eigenschaften der CD4+ CD25⁺⁺ GITR⁺⁺ Zellen, da der ³H-Thymidin-Einbau der vier Kokulturen wesentlich niedriger ist als derjenige der ersten beiden Einzelkulturen. Werden die letzten vier Messungen in zwei Gruppen unterteilt, nämlich in die erste Kokultur mit den Wildtyp und in die zweite mit den NFATc2 KO Tregs, so ist es erkennbar, dass die NFATc2 KO T-regulatorische Population sowohl die WT als auch KO CD4+ CD25- Zellen wesentlich mehr hemmt. Der in diesem Experiment mitgeführte Ansatz, die Funktionalität der regulatorischen T-Zellen zu überprüfen, zeigt daher, dass die T-regulatorische Population der NFATc2 KO

Mäuse ihre hemmende Funktion durch das fehlende Gen nicht verliert. Somit kann die Antwort der erhöhten Proliferation der CD4⁺ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse nur in der Hyperproliferation der konventionellen CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen liegen und nicht in den endogenen T-regulatorischen Zellen.

3.6 Adoptiver Transfer OVA-spezifischer CD4⁺ T- Zellen im SCID-Maus-System

Für die Zelltransferversuche werden SCID (severe combined immunodeficiency) verwendet Mäuse, welche infolge eines genetischen Defekts kein funktionsfähiges Immunsystem besitzen. Aus diesem Grunde werden sie dort eingesetzt, wo in Experimenten mit allogenen Transplantaten (sei es vereinzelte Zellen oder ganze Hautstücke) die Immunreaktion des Wirtsorganismus umgangen werden muss. Diese werden den Versuchen als „target-Mäuse“ für die Immunisierung mit OVA-spezifischen T-Zellen benutzt. Um das „homing“ der gespritzten CD4⁺ T-Zellen in die Lunge zu verbessern, werden die SCID Mäuse einen Tag vor und drei Tage nach dem Zelltransfer mit OVA-Aerosol behandelt. Abschließend werden die gespritzten SCID Mäuse auf AHR untersucht.

3.6.1 Bestimmung des Atemwegwiderstandes bei SCID Mäusen nach adoptivem Transfer von CD4⁺ T-Zellen aus Nfatc2 KO bzw. WT Mäusen

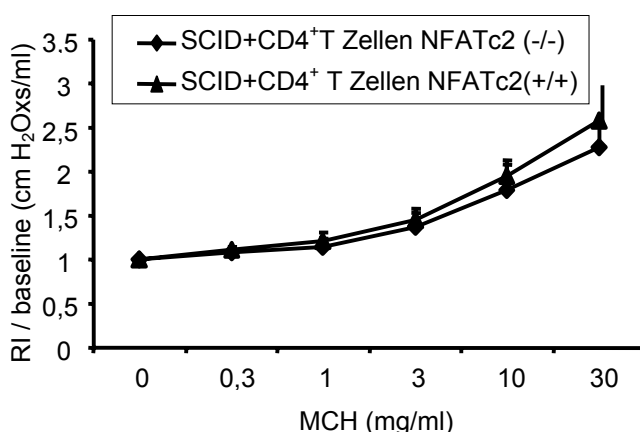


Abbildung 34: Bestimmung der AHR bei SCID Mäusen nach Allergendisposition.

Sechs bis acht Wochen alte Mäuse wurden am Tag 17 intraperitoneal mit OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen behandelt und auf AHR untersucht. Die Untersuchung ergab keine Unterschiede zwischen den SCID+ CD4 NFATc2 KO und den SCID+CD4 WT.

Die Abbildung 34 zeigt die Resistenz als Parameter für den Atemwegswiderstand in OVA sensibilisierten SCID Mäusen, die mit CD4⁺ T-Zellen NFATc2 defizienter bzw. den CD4⁺ T-Zellen der Wildtyp Mäuse an Tag 17 intraperitoneal behandelt werden. Analog zur Abbildung 15 b zeigen die beiden Tiergruppen keinen signifikanten Unterschied in der AHR. Um sicher zu stellen, dass die intraperitoneal gespritzten CD4⁺ T-Zellen auch in der Lunge der SCID Mäuse angekommen sind, werden die Tiere nach der AHR-Messung lavagiert. Das Zellpellet der hierdurch gewonnenen BALF wird anschließend auf CD4⁺ T-Zellen im FACS analysiert. In der analysierten Zellpopulation, kann ein großer Anteil von CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 35).

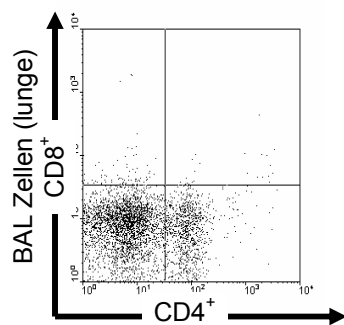


Abbildung 35: Nachweis von CD4⁺ T-Zellen aus der BAL nach adoptivem Transfer

Durchflußzytometrische Untersuchung der BAL von SCID Mäusen nach adoptivem Transfer mit CD4⁺ T-Zellen. Der große Anteil CD4⁺ T-Zellen in der BAL lässt erkennen, dass von einem erfolgreichem „homing“ dieser gesprochen werden kann.

Die zelllosen Überstände der BALF werden für die Bestimmung der Zytokine verwendet. Da nur der Einfluss der immunisierten CD4⁺ T-Zellen untersucht werden soll, beschränkt sich diese Untersuchung nur auf die Th1 und Th2 Zytokine.

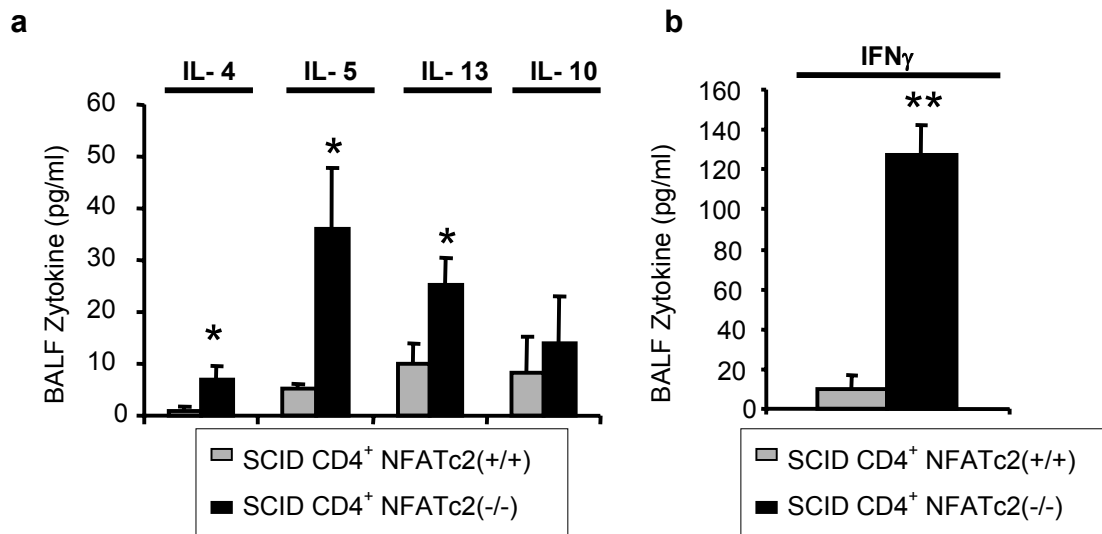


Abbildung 36: Erhöhte Th1 und Th2 Zytokinproduktion im BALF der mit NFATc2KO CD4-T-Zellen immunisierten SCID Mäuse

Die Abbildungen a und b stellen die mittels ELISA ermittelte Th1 und Th2 Produktion in der BALF der behandelten SCID Mäuse dar. Die OVA-behandelten SCID Mäuse, welche mit CD4⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäusen immunisiert wurden, zeigen eine signifikante Erhöhung der Th2 sowie Th1 Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den mit WT CD4⁺ T-Zellen immunisierten Mäusen.

In der Abbildung 36 wird die Zytokinproduktion der BALF dargestellt. Die beiden oben genannten Vergleichsgruppen, unterscheiden sich sowohl in der Th1 als auch in ihrer Th2 Zytokinfreisetzung. Die mit den NFATc2KO CD4⁺ T-Zellen immunisierten SCID Mäuse zeigen eine vermehrte Produktion von IL-4, IL-5 als auch IL-13 im Vergleich zur mit WT CD4⁺ T-Zellen immunisierten Gruppe. Trotz dieser erhöhten Menge an Th2 Zytokinen können keine Unterschiede in der AHR der beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 34). Ähnlich der vermehrten Th2 Zytokinproduktion, kann eine erhöhte Produktion des Th1 Zytokins IFN- γ beobachtet werden, welche für die fehlende Differenz der AHR verantwortlich sein kann. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von IFN- γ und veranlassen zu weiteren Untersuchungen der Produktion dieses Zytokins in anderen Zellepopulationen.

3.7 Untersuchung der $IFN-\gamma$ Produktion in der Lunge von NFATc2 KO Mäusen

Um die Diskrepanz zwischen dem Atemwegswiderstand im OVA/PBS- sowie im OVA/OVA-System aufzuklären, wird die $IFN-\gamma$ Produktion in den Gesamtzellen der Lunge untersucht. Dabei wird die Zytokinproduktion der einzelnen Zelltypen mittels Durchflusszytometrie interzellulär bestimmt.

3.7.1 NFATc2 KO Mäuse zeigen eine erniedrigte $IFN-\gamma$ Produktion in den CD8+ T-Zellen

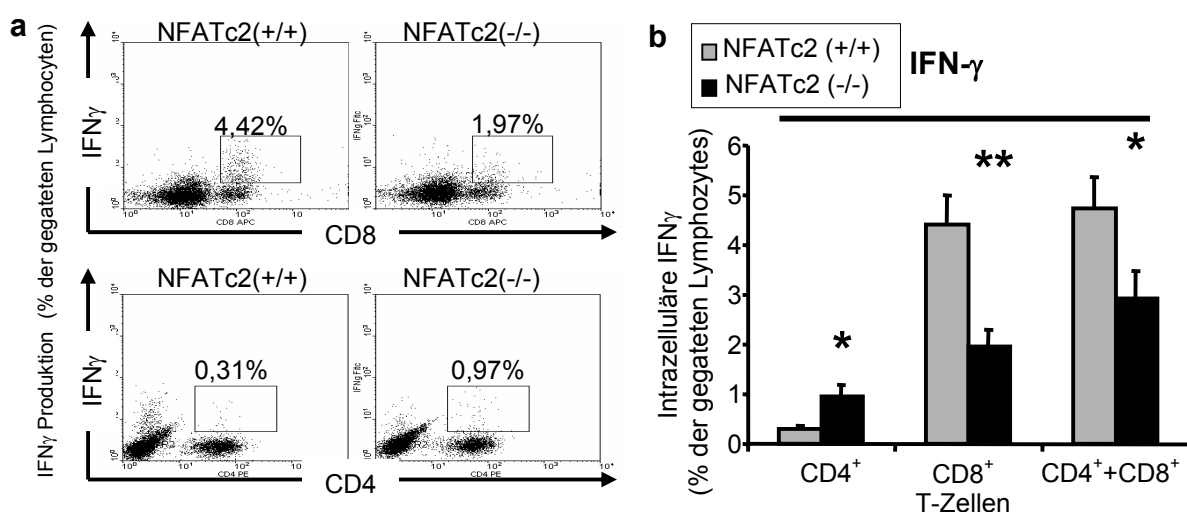


Abbildung 37: Darstellung der $IFN-\gamma$ Produktion in der Gesamtzellpopulation der Lunge.

Die in der Abbildung a abgebildeten Dotplots, stellen die $IFN-\gamma$ positiven CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen dar. Der prozentuelle Anteil der CD4⁺ $IFN-\gamma$ ⁺ T-Zellen ist in den NFATc2 KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen erhöht. Im Gegensatz dazu zeigen die Wildtyp Mäuse eine erhöhte $IFN-\gamma$ Produktion in den CD8⁺ T-Zellen (a). Da die CD8⁺ T-Zellen der WT Mäuse im Allgemeinen mehr $IFN-\gamma$ produzieren, ist die Gesamtmenge an $IFN-\gamma$ in diesen erhöht (b).

Die IFN- γ Produktion der Gesamtzellen erweist sich als eine Überraschung, da diese nicht wie erwartet in den NFATc2 KO Mäusen, sondern in den Wildtypen erhöht ist. Werden die unteren Dotplots in der Abbildung 37 a betrachtet, so ist eine vermehrte IFN- γ Produktion der CD4+ T-Zellen bei den NFATc2 defizienten Mäusen erkennbar. In dem Wildtyp Dotplot erscheint jedoch eine andere IFN- γ produzierende Population, die nach näherer Untersuchung als CD8+ T-Zellen identifiziert werden kann. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die von den CD4+ T-Zellen sezernierte IFN- γ Menge nur einen kleineren Anteil der Gesamtproduktion an IFN- γ ausmacht. Dementsprechend gehören die CD8+ T-Zellen zu der Population, die den Gesamtlevel an IFN- γ in der Lunge dominieren.

Da bei der intrazellulären Zytokinbestimmung die Gesamtzellen mit PMA/Inomycin, zwei unspezifischen Zellstimuli, behandelt werden, um eine maximale IFN- γ Produktion zu erreichen, stellt sich die Frage, wie die IFN- γ Produktion in einer *in vivo* nahen Stimulation aussieht. Zu diesem Zweck werden die CD8+ T-Zellen aus der Lunge der OVA/PBS-behandelten Mäuse isoliert, für 24 Stunden kultiviert und auf IFN- γ Produktion mittels ELISA untersucht.

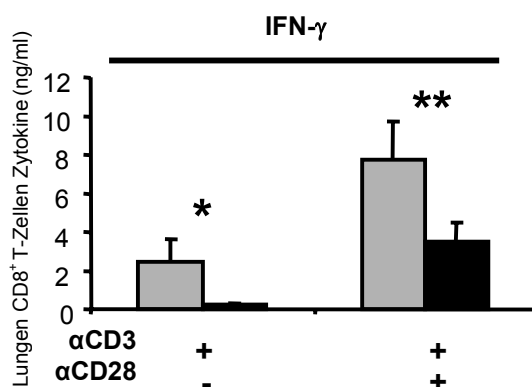


Abbildung 38: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine geringere IFN- γ Produktion in den CD8+ T-Zellen

CD8+ T-Zellen aus NFATc2 KO sowie aus Wildtyp Mäusen werden für 24 h mit anti-CD3 und anti-CD3/CD28 behandelt und auf ihre IFN- γ -Produktion mittels ELISA überprüft.

Wie die Auswertung der ELISA Daten in Abbildung 38 zeigt, sezernieren die CD8+ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse eine signifikant erniedrigte IFN- γ Menge im Vergleich zu den Wildtypen. Wird die in Abbildung 25 dargestellte IFN- γ Produktion der CD4+ T-Zellen, die ebenfalls aus OVA/PBS behandelten Mäusen isoliert wurden, in die Auswertung mit einbezogen, so wird der Abbildung 37 b ein ähnliches Bild sichtbar. Die IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen beträgt bei der ELISA-Messung mehr als das zwanzigfache der CD4+ IFN- γ Menge.

3.7.2 Charakterisierung CD8+ T-Zellen in NFATc2 defizienten Mäusen

Die Differenz in der IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen zwischen den NFATc2 KO und den Wildtypen demonstriert die Aufgaben des NFATc2 Gens nicht nur bei der Regulation der CD4+ T-Zellen, sondern auch bei den CD8+ T-Zellen. Darüber hinaus wird deutlich, dass die CD8+ Population eine regulatorische Einheit beinhalten muss, die direkt *in vivo* als auch *in vitro* die IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen beeinflusst. Aus neueren Publikationen ist bekannt, dass die CD8+ T-Zellen eine Subpopulation mit regulatorischen Fähigkeiten beinhalten. Diese regulatorischen CD8+ T-Zellen werden durch den Oberflächenmarker CD122+ charakterisiert. Die Aufgabe dieser CD8+CD122+ T-Zellen besteht darin die IFN- γ Produktion der CD8+ CD122- T-Zellen zu suprimieren. Demzufolge sollen die NFATc2 KO Mäuse eine erhöhte CD8+ CD122+ Population aufweisen.

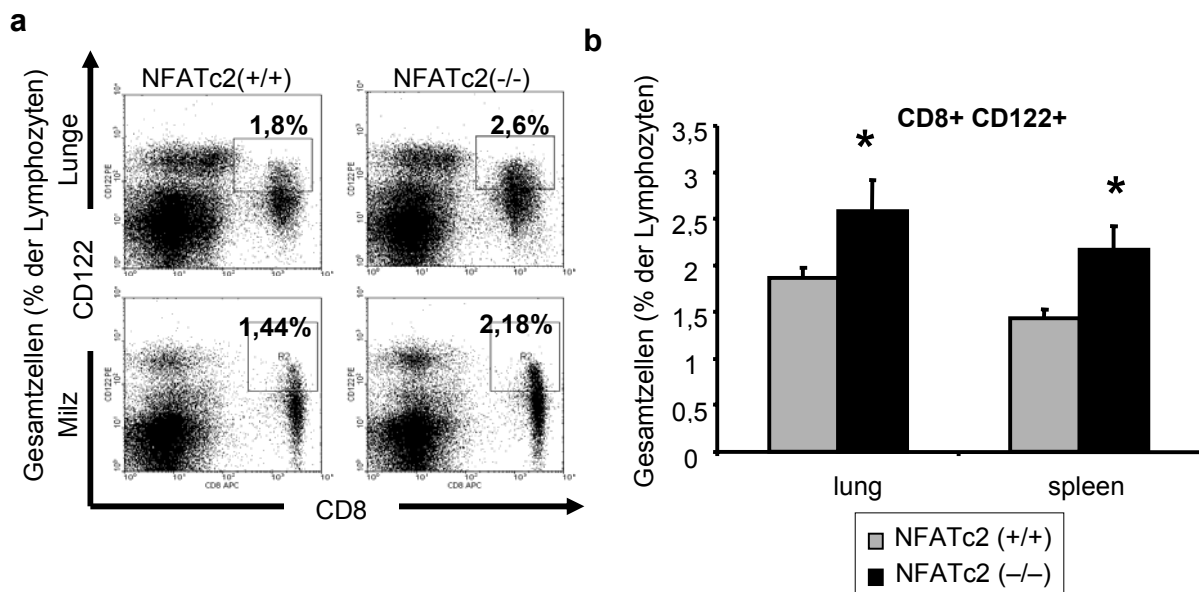


Abbildung 39: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte CD8+CD122+ regulatorische Population

Gesamtzellen der Milz und Lunge OVA/PBS-behandelter NFATc2 KO und Wildtyp Mäuse werden mit den Oberflächenmarkern anti-CD8 und anti-CD122 markiert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Auswertung gibt den prozentuellen Anteil des ausgewählten Lymphozytenbereichs an.

Um sicher zu stellen, dass es sich hier nicht nur um ein lungenspezifisches Phänomen handelt, wurden die Gesamtzellen der Milz als auch der Lunge mit anti-CD8 und anti-CD122 FACS-Antikörpern markiert und per Durchflusszytometrie analysiert. Die Analyse ergibt, dass NFATc2 defiziente Mäuse sowohl in der Milz als auch in der Lunge erhöhte Mengen an CD8⁺ CD122⁺ Zellen vorweisen (Abbildung 39). Ob nun die CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen selber IFN- γ produzieren oder ob dies nur den CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen vorbehalten ist, wird im Folgenden eingehender untersucht.

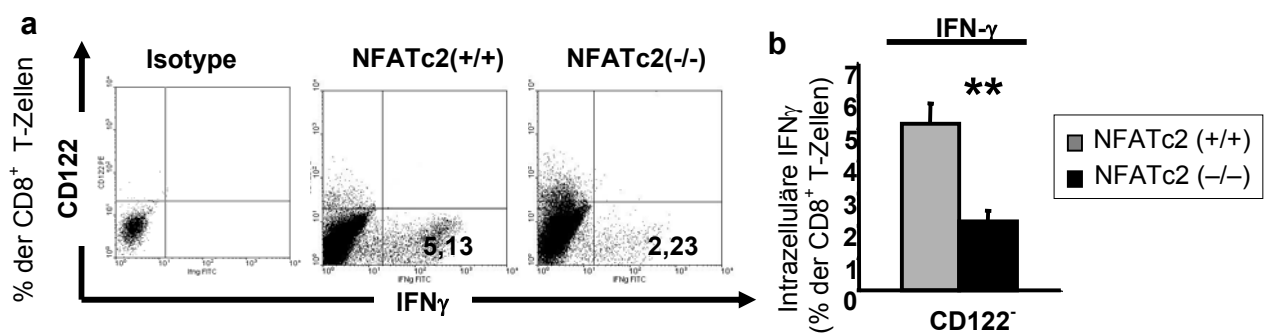


Abbildung 40: CD8⁺ CD122⁺ doppelpositive T-Zellen produzieren kein IFN- γ

Um den Ursprung der IFN- γ Produktion in den CD8⁺ T-Zellen zu bestimmen, werden isolierte CD8⁺ Milzzellen für 24 h mit anti-CD3/CD28 kultiviert und zusätzlich für 5 Stunden mit PMA/Ionomycin + Monensin stimuliert. Anschließend werden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, gewaschen und mit anti-CD8 und anti-CD122 fluoreszenzmarkierten FACS-Antikörpern gefärbt. Die intrazelluläre Färbung erfolgt mit anti-IFN- γ nach einer PFA+Saponin-Behandlung der Zellen.

Wie in Abbildung 40a erkennbar, zeigen die aus der Milz einer Wildtyp Maus isolierten und stimulierten CD8⁺ T-Zellen eine vermehrte IFN- γ Produktion, die nur von CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen ausgeht. Weder die Wildtyp noch die NFATc2 defizienten Mäuse zeigen CD122⁺ IFN- γ ⁺ doppelpositive Zellen, die sich in dem oberen rechten Quadranten der Dotplots befinden müssten. Ein ähnliches Bild ergibt die Auswertung der Gesamtzellen der Lungen, die dreifach mit den Facsatikörpern anti-CD8, anti-CD122 und anti-IFN- γ gefärbt werden (Daten hier nicht gezeigt). Ähnlich der Milzdaten sind die CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen der Lunge ebenso der Ursprung der IFN- γ Produktion.

Da wie in anderen Publikationen beschrieben die CD8⁺ regulatorischen Zellen eine vermehrte Menge an IL-10 produzieren, stellt sich die Frage, ob die aus der Lunge der NFATc2 KO Mäuse isolierten CD8⁺ T-Zellen ebenfalls eine signifikant erhöhte IL-10 Produktion vorweisen.

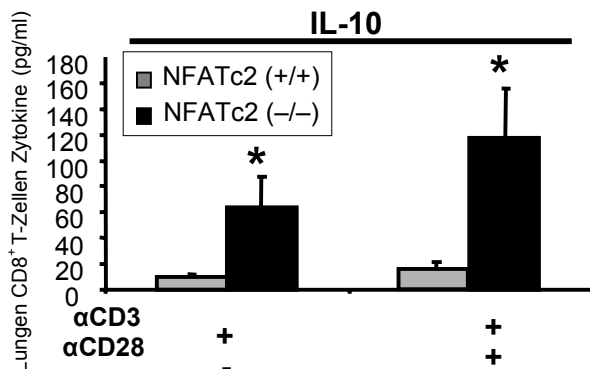


Abbildung 41: CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse sezernieren vermehrte Mengen an IL-10.

Isolierte CD8⁺ T-Zellen von OVA/PBS-behandelten Mäusen werden für 24h in RPMI Medium + anti-CD3 sowie anti-CD3/CD28 kultiviert und auf IL-10 Produktion mittels ELISA überprüft.

Wie in Abbildung 41 dargestellt, produzieren die CD8⁺ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse vermehrt IL-10 im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen aus dem Wildtyp. Anhand der vorliegenden ELISA Auswertung ist es unmöglich mit Bestimmtheit sagen zu können, ob nur die CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen das IL-10 produzieren, oder ob ein gewisser Anteil des IL-10 von CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen stammt. Um dies zu untersuchen werden die Gesamtzellen der Lunge mit anti-CD8, anti-CD122 und anti-IL-10 FACS Antikörpern gefärbt. Da der intrazelluläre Nachweis des IL-10 Zytokins in der CD8⁺ Zellpopulation als sehr schwierig gilt, wird diese Untersuchung aus den Gesamtzellen der Lunge OVA/OVA-behandelter Mäuse durchgeführt. Die Gesamtzellen beinhalten hierbei dendritische Zellen, welche die Stimulation unterstützen. Zusätzlich dient das OVA-Antigen als ein weiterer Stimulus, so dass die IL-10 Produktion der CD8⁺ T-Zellen der OVA/OVA-Gruppe im Vergleich zur OVA/PBS-Gruppe höher ist.

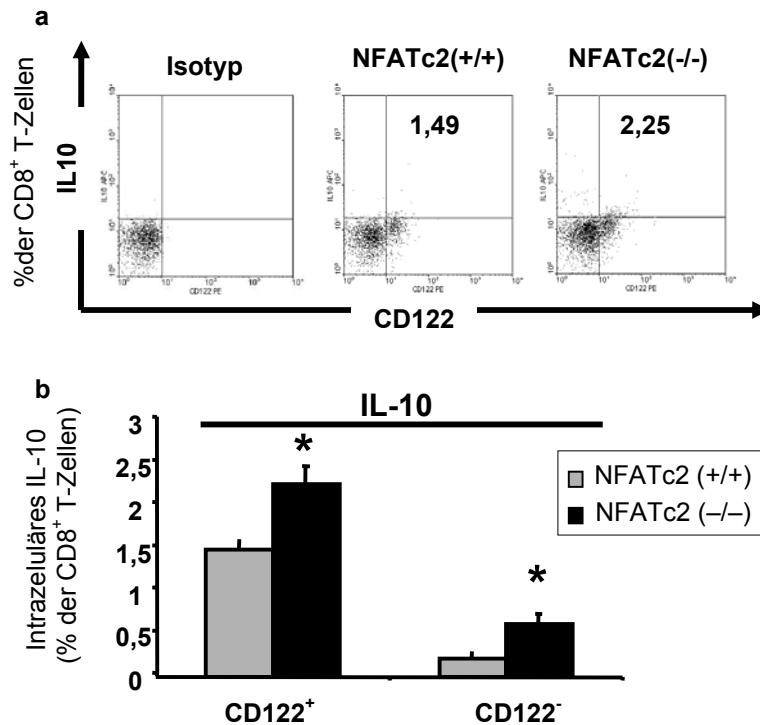


Abbildung 42: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion in den CD8+CD122+ als auch in den CD8+CD122- T-Zellen

Die Gesamtzellen der Lunge von OVA/OVA-behandelten Mäusen werden für 18h mit anti-CD3/CD28 kultiviert und anschließend für 5 h mit PMA/Ionomycin + Monensin behandelt. Sowohl die CD122+ als auch CD122- CD8+ T-Zellen produzieren IL10, wobei der Hauptanteil der IL-10 Produktion an die CD8+CD122+ T-Zellen fällt.

Wie in Abbildung 42 a und b erkennbar, wird das IL-10 größtenteils von CD8+CD122+ T-Zellen produziert. Da die NFATc2 defizienten Mäuse eine größere Anzahl an CD8+CD122+ T-Zellen aufweisen, ist die IL-10 Produktion in diesen auch höher als in den Wildtyp Mäusen. Auch wenn das IL-10 vermehrt von CD8+CD122+ T-Zellen produziert wird, zeigen die CD8+ CD122- T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse ebenfalls eine IL-10 Zytokinfreisetzung. Diese ist im Gegensatz zu den NFATc2 KO Mäusen in den Wildtypen kaum nachweisbar (Abbildung 42 b).

Um die Abhängigkeit der IL-10 Produktion von der IFN- γ Produktion bzw. die der IFN- γ Produktion von der IL-10 Produktion zu ermitteln, werden die Eigenschaften der CD8+ T-Zellpopulation in den IFN- γ Knockout Mäusen im Folgenden untersucht.

3.7.3 Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen in IFN- γ defizienten Mäusen

Da uns keine IL-10 defizienten Mäuse zur Verfügung stehen, um die Abhängigkeit der CD8⁺ CD122⁺ doppelpositiven T-Zellen von IL-10 zu bestimmen, die IFN- γ defizienten Mäuse genutzt, um die CD8⁺ T-Zellpopulation näher zu untersuchen. Bei den CD8⁺ T-Zellen der IFN- γ KO Maus ergeben sich zwei Fragestellungen, nämlich die nach der Abhängigkeit der CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen vom nichtvorhandenen IFN- γ und nach der Abhängigkeit dieser Zellen von dem NFATc2 Gen.

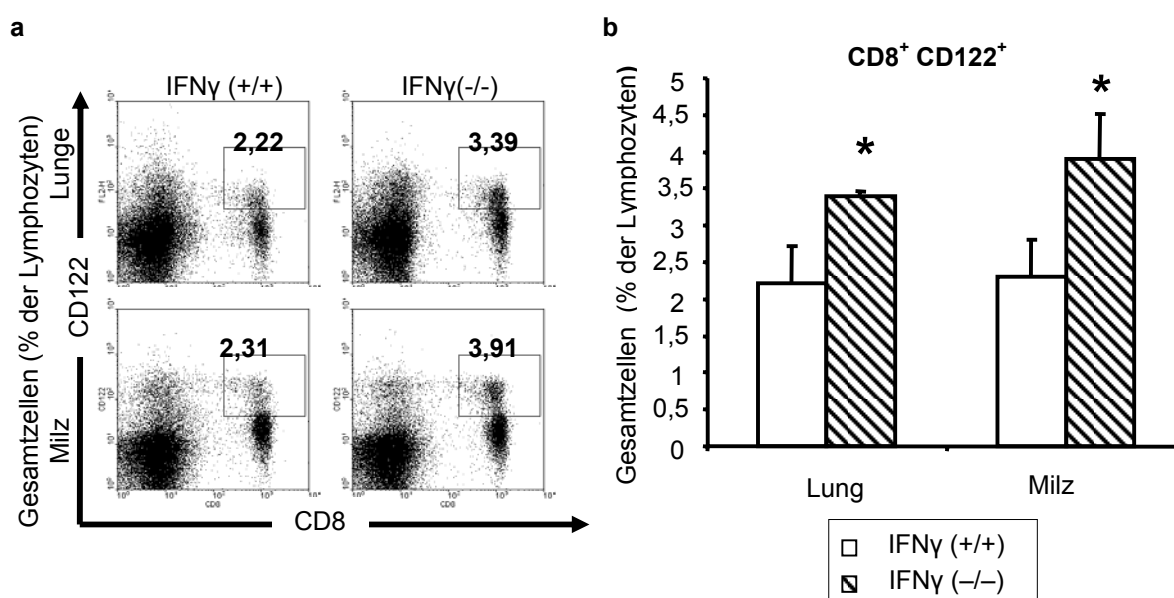


Abbildung 43: IFN- γ defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte CD8⁺CD122⁺ regulatorische Population

Um die CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen in der OVA/PBS-behandelten IFN- γ KO Maus quantitativ zu bestimmen, werden Gesamtzellen der Milz und Lunge mit anti-CD8 und anti-CD122 FACS-Antikörpern markiert und deren Anteil prozentuell auf den ausgewählten Lymphozytenbereich berechnet. Sowohl in der Milz als auch der Lunge ist die Anzahl der CD8⁺CD122⁺ T-Zellen erhöht.

Wie in Abbildung 43 dargestellt, wird der prozentuelle Anteil der CD8⁺CD122⁺ T-Zellen in der Milz und Lunge in OVA/PBS-behandelten IFN- γ defizienten Mäusen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei ist zu erkennen, dass die CD8⁺ CD122⁺

regulatorische Population in den IFN- γ KO Mäusen sowohl in der Milz als auch in der Lunge im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht nur, wie in der Literatur beschrieben, die CD8⁺ CD122⁺ Population die CD122⁻ Population beeinflusst, sondern dass auch Fehlen von IFN- γ eine Zunahme der CD8 Tregs nach sich zieht. Diese vermehrte Expression des Oberflächenmarkers CD122 auf den CD8⁺ T-Zellen ist sowohl in den IFN- γ KO als auch in den NFATc2 defizienten Mäusen unabhängig von der intraperitonealen OVA-Behandlung zu finden, sodass ein OVA-spezifisches Phänomen auszuschliessen ist. Weiterhin kann aus den Daten herausgelesen werden, dass die Anzahl der regulatorischen CD8⁺ T-Zellen nicht nur von dem NFATc2-Gen sondern auch von anderen Faktoren bestimmt wird.

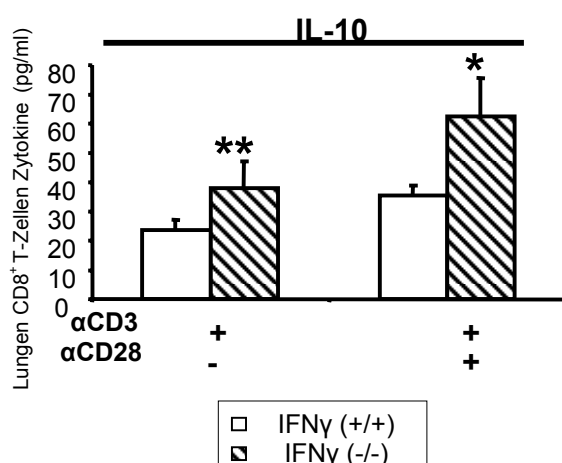
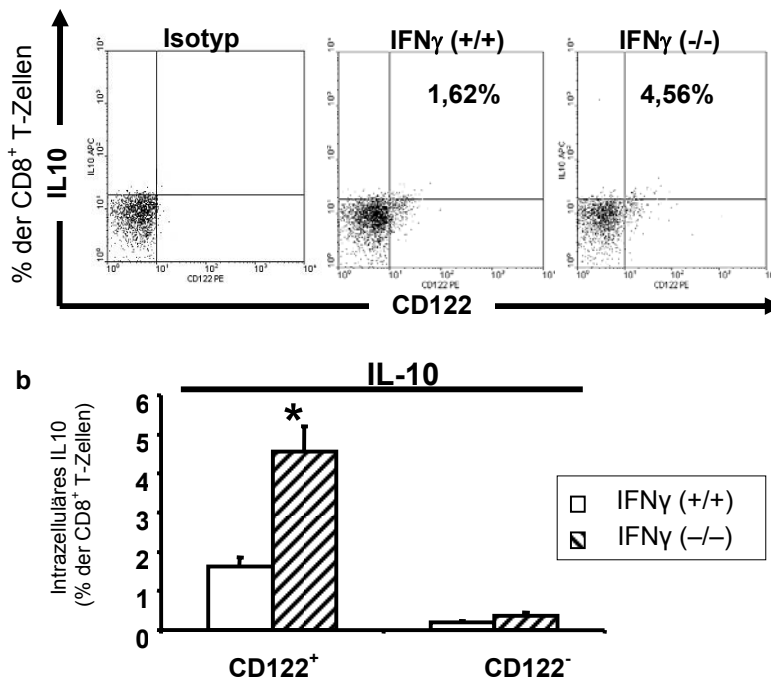


Abbildung 44: CD8⁺ T-Zellen der IFN- γ defizienten Mäuse zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion

Aus der Lunge von der IFN- γ defizienten Mäusen isolierte CD8⁺ T-Zellen werden über Nacht mit anti-CD3 bzw. anti-CD3/CD28 kultiviert und mittels ELISA auf IL-10 Produktion untersucht.

Um die IL-10 Produktion der CD8⁺ T-Zellen in IFN- γ defizienten Mäusen zu untersuchen, werden die T-Zellen per MACS-Isolation aus den Gesamtzellen der Lunge isoliert und für 24h mit anti-CD3 bzw. anti-CD3/CD28 kultiviert. Das mittels ELISA gemessene IL-10 Zytokin, welches von den CD8⁺ T-Zellen der IFN- γ KO Mäuse signifikant erhöht freigesetzt wird, zeigt ein analoges Bild zu den CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse (Abbildung 44). Auch hier kann die vermehrte IL-10 Freisetzung auf die erhöhte Anzahl der CD8⁺CD122⁺ T-Zellen zurückgeführt werden und mittels intrazellulärer FACS Färbung genauer untersucht werden.



Wie in der Abbildung 45 gezeigt, stammt das gemessene IL-10 größtenteils von CD8+CD122+ T-Zellen. Die CD8+ CD122+ T-Zellen der IFN- γ KO Maus zeigten im Gegensatz zur NFATc2 defizienten Maus keine vermehrte Produktion des IL-10 Zytokins. Im Gegenteil, die Werte sind mit denen der Wildtyp Maus vergleichbar. Die Schlussfolgerung, dass alleine die CD8+ CD122- T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse eine messbare Menge an IL-10 freisetzen können, ist jedoch zu bezweifeln. Um dies genauer zu erforschen, sind weitere detaillierte Untersuchungen notwendig.

3.7.4 Weitere Charakterisierung der CD8+ T-Zellen in NFATc2 defizienten Mäusen

Obwohl die regulatorischen Eigenschaften der CD8+CD122+ Population bereits im Abschnitt 3.7.2 beschrieben wird, kann wir jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die CD8+ Fraktion auch weitere Populationen beinhaltet, die einen Einfluss auf den Atemwegswiderstand haben. Da der IL-2 Rezeptor ebenfalls eine große Rolle bei der Entwicklung der CD8+ T-Zellen spielt, wird der Anteil der CD8+ CD25+ doppelpositiven Population in der CD8+T-Zellfraktion bestimmt.

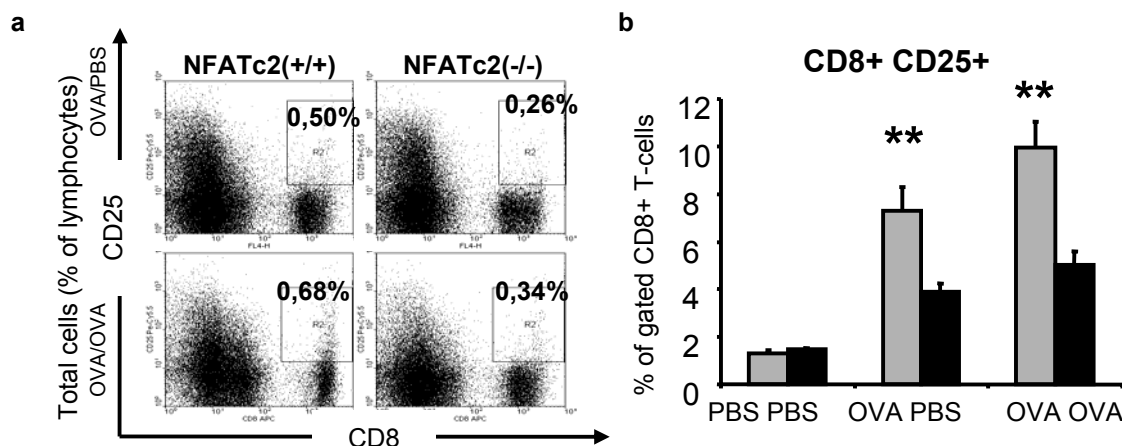


Abbildung 46: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erniedrigte Anzahl an CD25+ CD8+ T-Zellen in der Lunge nach OVA-Sensibilisierung

Gesamtzellen der Lunge von PBS/PBS-, OVA/PBS- und OVA/OVA-behandelten Mäusen werden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die CD8+ CD25+ doppelpositive Population untersucht. Die Auswertung der Zellen erfolgt aus der ausgewählten Lymphozytenpopulation der Lunge.

Das Kultivieren der CD8+ T-Zellen bei vorliegendem IL-2 führt zur Ausprägung von CD8+ Effektorzellen. Dabei handelt es sich hier um IFN- γ produzierende Zellen, die nicht in der CD8+CD122+ doppelpositiven Population beinhaltet sind. Die in Abbildung 46 dargestellte Population, ist ähnlich den CD8+CD122+ Zellen, in der Lymphozytenpopulation zu finden, gehört jedoch zu den CD8+ T-Effektor Zellen, die vermehrt IFN- γ produzieren. Die verstärkte Ausbildung dieser Effektorzellen ist direkt vom Antigen abhängig, da bei PBS/PBS-behandelten Mäusen diese Population weder

in den WT noch in den KO Mäusen erhöht ist. Erst nach intraperitonealer OVA-Gabe steigt der Anteil der CD8⁺ CD25⁺ Zellen auf über 5% der eingegrenzten CD8⁺ T-Zellpopulation. Analog zur INF- γ Produktion der NFATc2 defizienten CD8⁺ T-Zellen ist die Anzahl der Effektor CD8⁺ T-Zellen in den KO Mäusen erniedrigt.

Neben den CD8⁺ T-Effektorzellen spielen auch die „long lived memory“ CD8⁺ T-Zellen eine große Rolle bei der Entwicklung der asthmatischen Reaktion. Diese Population kann je nach Herkunft unterschiedlich definiert werden, exprimiert jedoch immer die alpha Kette des IL-7 Rezeptors. Um den Anteil der „long lived memory“ CD8⁺ T-Zellen in der CD8⁺ Population der Lunge zu bestimmen, wird eine FACS-Färbung durchgeführt.

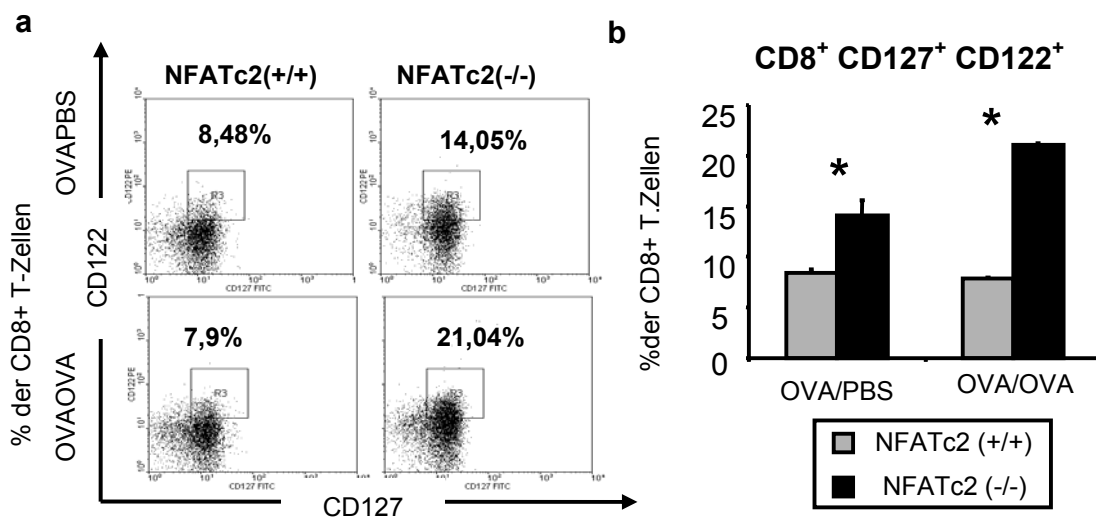


Abbildung 47: Erhöhte „long lived memory“ CD8⁺ T-Zellpopulation in den NFATc2 defizienten Mäusen

Die aus der Lunge der WT und NFATc2 defizienten Mäuse isolierten Gesamtzellen werden mit den FACS Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD8, CD122 und CD127 gefärbt und auf die Anzahl der dreifachpositiven Zellen überprüft (a). Sowohl die OVA/PBS- als auch OVA/OVA-behandelte NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anzahl an „effector memory“ CD8 T-Zellen.

Wie in Abbildung 47 a und b gezeigt, ist der Anteil der CD8⁺CD122⁺CD127⁺ „long lived memory“ Zellen in der NFATc2 defizienten Maus höher als im Wildtyp. Bei näheren Untersuchungen wird festgestellt, dass der IL7R α (CD127) sowohl auf CD122⁺ als auch

auf den CD122- CD8+ T-Zellen exprimiert wird, jedoch nur in der CD8+ CD122+ Population der NFATc2 KO Mäuse erhöht ist.

3.8 Adoptiver Transfer OVA-spezifischer CD4+ und CD8+ T- Zellen im SCID-Maus System

Wie bereits im Abschnitt 3.6 demonstriert, ist der adoptiver Transfer von T-Zellen in immundefiziente Mäuse eine gute Möglichkeit die Funktion und Eigenschaften von einer oder mehreren Populationen zu untersuchen. Da bereits gezeigt wurde, dass die CD4+ T-Zellpopulation der NFATc2 defizienten Mäuse in einem OVA/OVA-System nicht ausreicht, um eine erhöhte AHR im Vergleich zum Wildtyp hervorzurufen, stellt sich die Frage, ob die CD8+ Zellen hierzu fähig sind. Hierfür werden mehrere Versuche mit unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt.

3.8.1 Die CD8+ T-Zellpopulation ist ein wesentlicher Faktor für die erhöhte AHR bei den NFATc2 defizienten Mäusen

Um die Bedeutung der CD8+ T-Zellen bei einer asthmatischen Reaktion zu beurteilen, wurde einen Versuchsaufbau verwendet, bei dem sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen adoptiv in SCID Mäuse transferiert werden. Dabei wird die eingesetzte CD4+ Zellpopulation, die aus den NFATc2 KO Mäusen gewonnen wird, in drei der vier Versuchsgruppen injiziert. So kann gewährleistet werden, dass nur die CD8+ Population für einen möglichen Unterschied bei der AHR Messung in Frage kommt. Die hierzu verwendeten CD8+ T-Zellen stammen aus den Milzen der NFATc2 defizienten bzw. aus den Milzen der Wildtyp Mäuse. Pro Tier werden 2×10^6 CD4+ und $1,5 \times 10^6$ CD8+ bzw. nur 2×10^6 CD4+T-Zellen intraperitoneal verabreicht. Für ein optimales „homing“ der T-Zellen werden einen Tag vor und drei Tage nach der i.p. Gabe die Mäuse mit einem 1%igem OVA-Aerosol für 30 Minuten behandelt.

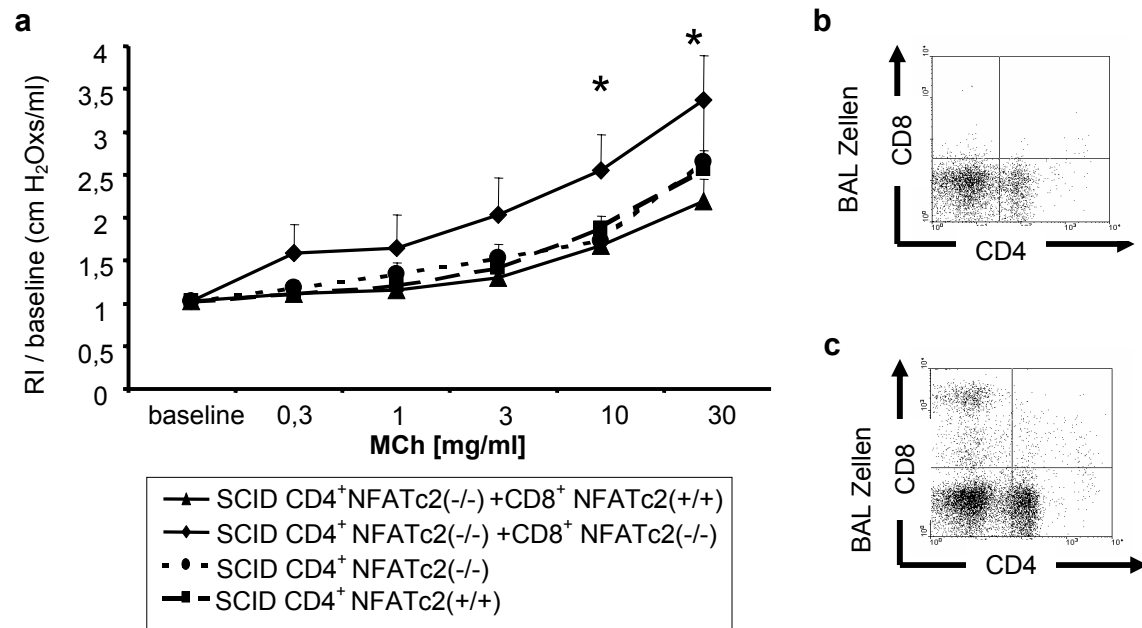


Abbildung 48: CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse sind u.a. für die erhöhte AHR verantwortlich

Acht Wochen alte SCID Mäuse werden am Tag 17 intraperitoneal mit 2×10^6 CD4⁺ NFATc2 KO und $1,5 \times 10^6$ CD8⁺ NFATc2 KO bzw. WT T-Zellen i.p. gespritzt. Die transferierten T-Zellen werden aus der Milz von OVA/OVA-behandelten Tieren mittels MACS isoliert. Die SCID Mäuse werden einen Tag vor und 3 Tage nach der i.p. Gabe mit einer 1%igen OVA in PBS Lösung aerosolisiert und am Tag 21 einer AHR-Messung unterzogen (a). Die nach der AHR Messung gewonnene BALF wird für den Nachweis des T-Zell „homing“ verwendet (b, c).

Die Abbildung 48 a zeigt die Atemwegswiderstandsmessung vier unterschiedlich behandelte SCID Versuchsgruppen. Die beiden in der Mitte dargestellten gestichelten Linien gehören der nur mit CD4⁺ T-Zellen immunisierten Gruppen an, die sich untereinander nicht unterscheiden. Dies entspricht den bereits vorgestellten Daten im Abschnitt 3.6. Werden die mit CD8⁺ T-Zellen immunisierten Gruppen verglichen, so ist einen signifikanten Unterschied in der AHR bei einer Metacholindosis von 10 und 30 mg/ml zu erkennen. Dabei zeigen die mit CD4⁺ KO und CD8⁺ KO behandelten SCID Mäuse den höchsten Atemwegswiderstand aller vier Gruppen. Die mit CD4⁺ KO und CD8⁺ WT T-Zellen immunisierten SCID Mäuse zeigen im Gegensatz dazu eine ARH Kurve, die sogar geringfügig unter der CD4⁺ KO Kontrollgruppe liegt, so dass davon

ausgegangen werden muss, dass die WT CD8⁺ T-Zellen leicht protektive Eigenschaft besitzen.

Um das „homing“ der T-Zellen in die Lunge zu überprüfen, werden die aus der BALF gewonnenen Zellen mit anti-CD4 und anti-CD8 FACS Antikörpern gefärbt und mittels FACS ausgewertet (Abbildung 48 b und c). Sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen sind in den Lungen der SCID Mäuse wiederfinden, so dass man hier von einem erfolgreichen „homing“ gesprochen werden kann.

Die BALF wird bei diesem Versuch ebenfalls für die Untersuchung der IFN- γ und IL-17 Produktion verwendet.

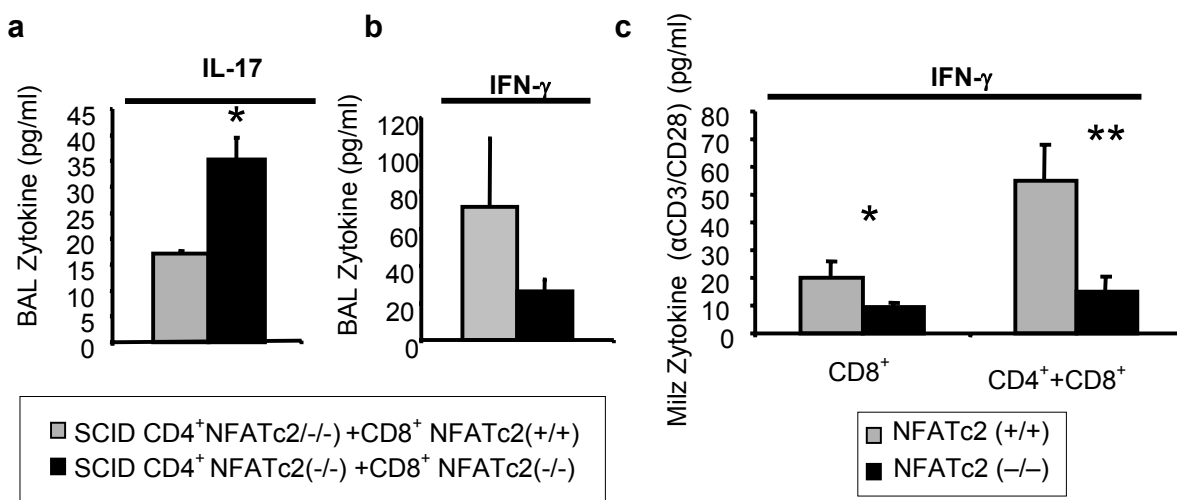


Abbildung 49: IL-17 und IFN- γ Produktion in der BALF sowie in den Überständen kultivierter Milzzellen

In der Abbildung a und b wurde die BALF der lavagierten SCID Mäuse auf den IL-17 und IFN- γ Level mittels ELISA überprüft. Die BALF wurde durch zweimaliges Spülen der Lungen mit 1 ml Sterofundin gewonnen. Um die Zytokinfreisetzung der in die Maus gespritzten Milz Zellen zu überprüfen, wird ein Teil dieser nach Isolation für 24h mit anti-CD3/CD28 kultiviert und auf die IFN- γ Produktion untersucht (c).

Wie in Abbildung 49 a erkennbar, zeigen die mit den NFATc2 KO CD8⁺ T-Zellen gespritzten SCID Mäuse in der BALF eine erhöhte IL-17 Produktion. Diese Erhöhung steht dem erniedrigten IFN- γ Level gegenüber (Abbildung 49 b), was die allgemeine These stützt, dass die Abwesenheit des IFN- γ die Freisetzung von IL-17 fördert. Das Fehlen der Signifikanz dieser Zytokin Bestimmung ist auf die hohe Standardabweichung zurückzuführen. Um jedoch sicherzustellen, dass die aus der Milz isolierten T-Zellen eine erhöhte IFN- γ Produktion in den CD8⁺ WT T-Zellen zeigen, wird ein Teil dieser

mittels ELISA auf das Zytokin IFN- γ untersucht. Die kultivierten Populationen bestehen entweder aus einzelnen CD8+ T-Zellpopulationen, oder aus CD4+ KO und CD8+ Kokulturen. Erstaunlicherweise zeigt die aus CD4+ KO und CD8+ WT Zellen bestehende Kokultur eine viel höhere IFN- γ Produktion als die der CD8+ Population. Dies scheint auf den ersten Blick unverständlich, da die Anzahl der T-Zellen in allen wells gleich ist (Abbildung 49 b). Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass die vermehrte IFN- γ Produktion auf einen erhöhten Zell-zu-Zell-Kontakt zurückzuführen ist. Vielmehr kommt es zu einer erhöhten Proliferation der T-Zellen in den „Misch-Kokulturen“, was zu einer vermehrten IFN- γ Produktion führt. Diese Erhöhung der Proliferation bei CD4+/CD8+ Kokulturen wird bei Versuchen beobachtet, bei denen die CD4+ T-Zellpopulation mit CFSE markiert und auf Proliferation in Gegenwart sowie Abwesenheit von CD8+ T-Zellen untersucht wird. Trotz gleicher Zellzahlen ist eine vermehrte Proliferation der CD4+ T-Zellen mit der CD8+ Population zu verzeichnen (Abbildung 50).

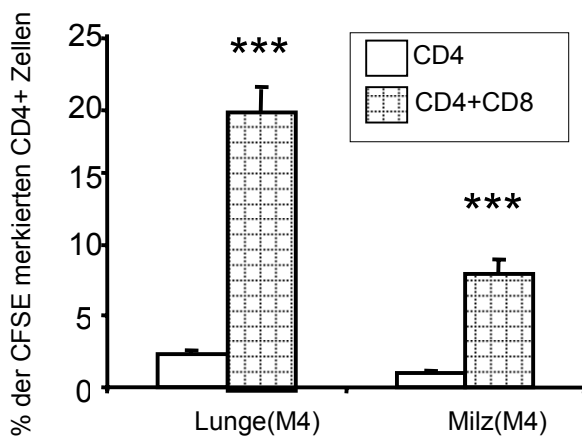


Abbildung 50: Proliferation von CD4+ CFSE markierten T-Zellen mit und ohne CD8+ Population.

Die für die Proliferation benötigte CD4+ und CD8+ T-Zellpopulation wird aus der Lunge und Milz von OVA/OVA behandelten Mäusen isoliert. Da nur die CD4+ Proliferation gemessen werden soll, werden diese mit CFSE markiert und nach vier Tagen mittels FACS gemessen. Um die Proliferation zu unterstützen, werden zu den CD4+ bzw. CD4+/CD8+ T-Zellen 1×10^4 APC's und anti-CD3 (5 μ g/ml) hinzugefügt.

3.8.2 Für die Entwicklung der AHR in den NFATc2 Mäusen werden neben CD8+ T-Zellen auch CD4+ T-Zellen benötigt

Obwohl gezeigt werden konnte, dass CD8+ T-Zellen bei den NFATc2 defizienten Mäusen eine bedeutende Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob die CD8+ T-Zellen

alleine für eine Erhöhung der AHR ausreichen. Um dies näher zu erörtern, werden aktivierte CD8⁺ Zellen aus der Lunge von NFATc2 KO Mäusen sowie Wildtyp Mäusen isoliert und intravenös in die Schwanzvene der SCID Mäuse appliziert.

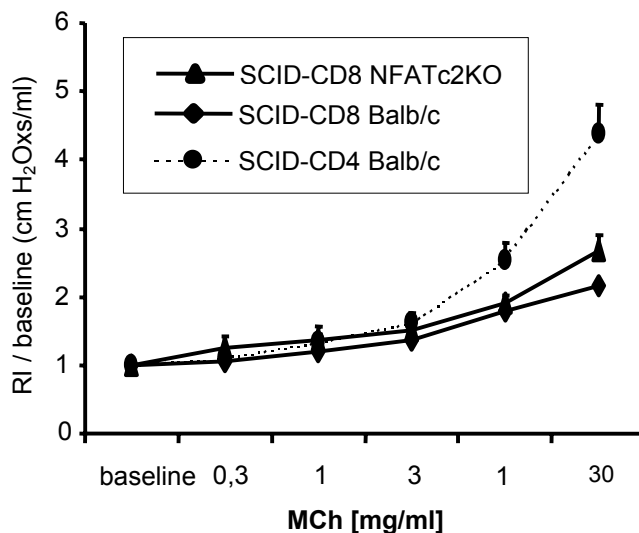


Abbildung 51: Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die AHR ohne die CD4⁺ Population

Um den Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die AHR-Entwicklung zu prüfen, werden diese aus den Lungen von NFATc2 KO und Wildtypen isoliert und i.v. in die Schwanzvene von SCID Mäusen gespritzt. Als Vergleichsgruppe werden die aus der Lunge gewonnenen CD4⁺ T-Zellen in die SCID Mäuse i.v. appliziert.

Um gewährleisten zu können, dass die gespritzten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen OVA spezifisch sind, werden diese aus OVA/OVA-behandelten Mäusen isoliert und in SCID Mäuse i.v. appliziert. Die SCID Mäuse werden einen Tag vor der i.v. Gabe und an drei aufeinander folgenden Tagen nach der i.v. Gabe mit OVA-Aerosol behandelt. Wie in Abbildung 51 erkennbar, zeigen die mit CD4⁺ T-Zellen behandelten Mäuse eine über 400% gestiegene AHR im Vergleich zur „baseline“ (gepunktete Linie). Im Gegensatz dazu zeigt keine der anderen beiden „CD8⁺-Gruppen“ eine wesentliche AHR Erhöhung. Weder die NFATc2 defizienten noch die WT CD8⁺ T-Zellen verursachen eine ebenso hohe AHR wie die CD4⁺ T-Zellen. Allein dieses Ergebnis zeigt, dass sie CD4⁺ T-Zellen unabkömmlich für die entzündliche Reaktion sind. Dies lässt den Rückschluss zu, dass das Ausbleiben der CD4⁺ T-Zellen einen positiven Einfluss auf die AHR hat. Weiterhin unterstützen diese Daten, die im Abschnitt 3.6 gemachte Beobachtung, dass der Anstieg der T-regulatorischen Population eine direkte Auswirkung auf die AHR hat.

3.8.3 Die CD8+ CD122+ doppelpositiven T-Zellen sind mitunter für den erhöhten Atemwegswiderstand verantwortlich.

Die im Abschnitt 3.8.1 gezeigten Daten verdeutlichen eindrucksvoll die Rolle der CD8+ T-Zellen bei der asthmatischen Reaktion. Trotzdem stellte sich die Frage, ob die CD8+ CD122+ T-Zellpopulation, die sowohl regulatorische als auch „effector memory“ Zellen beinhaltet, wirklich für diese AHR Erhöhung verantwortlich ist. Um die Bedeutung der CD8+ CD122+ T-Zellen bei der Entwicklung des Atemwegswiderstandes zu untersuchen, sind mittels FACS Sorter die CD8+ CD122+ T-Zellen von den CD8+ CD122- Populationen getrennt worden, um diese mit den CD4+ T-Zellen in SCID Mäuse i.p. zu injizieren (Abbildung 52).

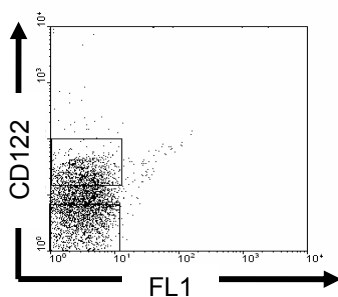


Abbildung 52: Isolation der CD8+ CD122+ T-Zellen aus der Peripherie von NFATc2 KO Mäusen

Aus Milzen von OVA/OVA behandelten sechs Wochen alten KO Mäusen werden mittels MACS CD8+ T-Zellen angereichert und nach Färbung mit anti-CD8 und anti-CD122 in CD8+ CD122+ sowie CD8+ CD122- durch einen FACS-Sorter isoliert.

Die hierbei verwendeten CD8+ T-Zellen stammen genauso wie die CD4+ Zellen aus der NFATc2 KO Maus. Die Wahl fiel auf die CD8+ T-Zellen der NFATc2 defizienten Maus, da der prozentuelle Anteil der CD8+ CD122+ T-Zellen in dieser Knockout Variante beinahe doppelt so hoch ist, wie der in den Wildtyp Mäusen. Um die AHR-Messung mit dem ersten Transferversuch vergleichen zu können, werden die benötigten T-Zellen ebenfalls aus der Milz isoliert. Weiterhin werden auch hier die SCID Mäuse einen Tag vor und drei Tage nach i.p.-Gabe der gesorteten Zellen mit einem OVA-Aerosol für 30 Minuten behandelt, so dass die Rahmenbedingungen in den beiden Versuchen gleich sind.

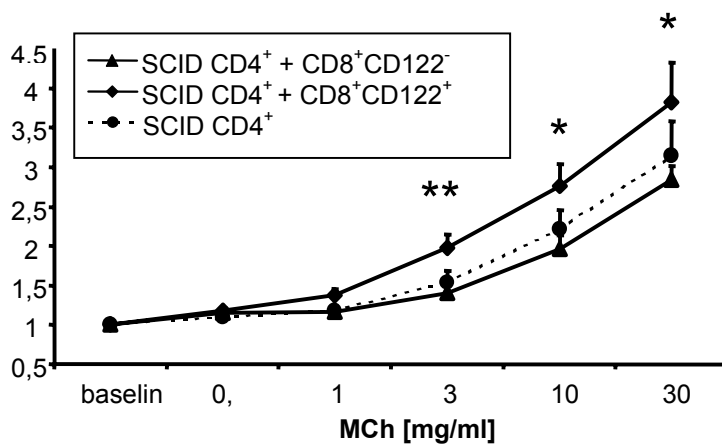


Abbildung 53: NFATc2 KO CD8+ CD122+ T-Zellen sind für die AHR-Entwicklung verantwortlich

Mittels MACS-Anreicherung und anschließender FACS-Isolation werden $1,5 \times 10^6$ isolierte CD8+ CD122+ bzw. CD8+ CD122- NFATc2 KO T-Zellen mit 2×10^6 CD4+ NFATc2KO Zellen intraperitoneal in OVA-behandelte SCID Mäuse gespritzt. Drei Tage nach der i.p.-Gabe wird die Messung des Atemwegswiderstandes durchgeführt.

Die in Abbildung 53 dargestellten AHR Ergebnisse sind äquivalent zu der in Abschnitt 3.8.1. beschriebenen Messung. Die SCID Mäuse, die mit den CD4+ und CD8+ CD122+ T-Zellen der NFATc2 KO Maus immunisiert werden, zeigen eine signifikante Erhöhung des Atemwegswiderstandes im Vergleich zu den SCID Mäusen, bei welchen die CD8+ CD122- Zellen mit den CD4+ der NFATc2 KO Maus in die Mäuse gespritzt werden. Ebenfalls ist zu beobachten, dass die CD8+CD122- T-Zellen der KO Maus eine ähnliche Erniedrigung des Atemwegswiderstandes herbeiführen, sodass die AHR Kurve dieser auch unter der CD4+ KO Kurve liegt. Weiterhin stellt sich auch die Frage, ob die Blockade des IL-2-beta Rezeptors in WT Mäusen einen ähnlichen Effekt mit sich bringen würde, wie das Entfernen der CD8+CD122+ Population mittels FACS-Sort. Bei diesem Versuch werden zwei weitere Parameter des Asthma bronchiale untersucht, nämlich die IFN- γ und die Eotaxin Produktion.

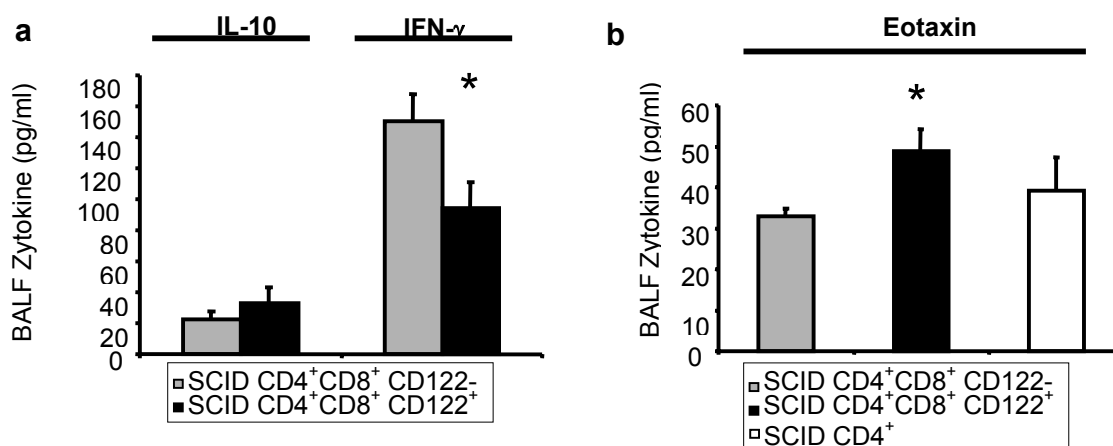


Abbildung 54: Die mit CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen immunisierten SCID Mäuse zeigen eine vermehrte IFN- γ und eine erniedrigte Eotaxin Produktion in der BALF

Nach der Messung des Atemwegswiderstandes wird aus den Tieren durch zweimaliges Spülen der Lunge mit PBS eine BAL-Lösung gewonnen. Diese wird anschließend mittels ELISA auf IL-10, IFN- γ (a) und Eotaxin (b) untersucht.

Die Abbildung 54 a ist äquivalent mit der Darstellung im Abschnitt 3.8.1. Die freigesetzte IFN- γ Menge der mit CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen gespritzten Mäuse ist signifikant höher als die der mit CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen immunisierten Gruppe. Der IL-10 Level ist wie erwartet nicht in der BALF der CD8⁺ CD122⁺ Gruppe höher, da die mitgespritzten CD4⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse viel mehr IL-10 freisetzen, sodass die durch die CD8⁺ Treg produzierte IL-10 Menge nicht ins Gewicht fällt. Zusätzlich zu den beiden Zytokinen wird ebenfalls der Eotaxin-Level in den BALF der drei Gruppen bestimmt (Abbildung 54 b). Dabei spiegelt die Eotaxin-Menge den AHR Kurvenverlauf in Abbildung 53 wieder. Die nur mit CD4⁺ KO T-Zellen behandelten Mäuse weisen einen Eotaxin-Level vor, der zwischen den anderen beiden liegt (weißer Balken). Die SCID Mäuse, in die die CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen transferiert wurden, zeigen den höchsten Eotaxin-Spiegel, der im Vergleich zu der mit CD8⁺ CD122⁻ T-Zellen immunisierten Gruppe signifikant erhöht ist.

3.8.4 Zusammenfassung

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Arbeit in Stichpunkten zusammengefasst:

- Die mit OVA/PBS-behandelten NFATc2 defizienten Mäuse zeigen im Gegensatz zu den OVA/OVA-behandelten Knockout Mäusen bei der AHR Bestimmung einen erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu den Wildtypen.
- Diese erhöhte AHR bei den NFATc2 Mäusen beruht auf dem ersten Blick auf folgenden Faktoren :
 - Th2 Phänotyp der NFATc2 Mäuse (mehr IL-4, IL-5, IL-13)
 - erhöhte IL-17 Produktion in den CD4+ T-Zellen der Lunge
 - erhöhte Lymphozytenmenge in dem intraepithelialen Raum
 - erhöhte Kollagendeposition in den Bronchien
 - erhöhte Proliferation der CD4+ T-Zellen
- FACS Messungen der Gesamtzellen ergeben, dass die NFATc2 KO Mäuse eine erhöhte Aktivierung der CD4+ T-Zellen vorweisen (CD4+ CD44+ CD69+), und dass die CD4+ Population vermehrte Mengen an Kollagenrezeptoren (CD49b) exprimieren.
- Das Fehlen des Transkriptionsfaktors NFATc2 beeinflusst die Entstehung von Tregs in der Lunge (erhöhte Anzahl an CD4+ CD25+ GITR+ FOXP3+)
- NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine vermehrte Proliferation der CD4+ T-Zellen, die auf der Resistenz gegenüber den funktionsfähigen Tregs begründet ist.
- Die mit CD4+ NFATc2 KO Zellen behandelten SCID Mäuse zeigen nach einer Allergendisposition keine Erhöhung der AHR gegenüber den SCID Mäusen, welche mit den CD4+ T-Zellen der Wildtyp Mäuse behandelt werden.

- Die Untersuchung der Zytokinfreisetzung der NFATc2 KO CD8+ T-Zellen ergibt einen erniedrigte IFN- γ und einen erhöhten IL-10 Level im Vergleich zu den Wildtypen.
- Die NFATc2 (-/-) und die IFN- γ (-/-) CD8+ Zellen exprimieren erhöhte Mengen an CD122 im Vergleich zu den NFATc2 (+/+) und IFN- γ (+/+) CD8+ T-Zellen der WT Mäuse.
- Die CD8+CD122+ Population produziert kein IFN- γ , jedoch geringe Mengen an IL-10
- Die CD8+CD122+ Population beinhaltet die „long lived memory“ Population, die neben den IL15R-beta (CD122) auch den IL7R-alpha (CD127) exprimiert.
- Die CD8+ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse können eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes bei Transferversuchen in die SCID Mäuse hervorrufen.
- Der CD122+ Anteil der CD8+ T-Zellen ist für die Entwicklung der asthmatischen Reaktion entscheidend.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des NFATc2 (nuclear factor of activated T cells c2), welches zur Familie der nuclear factor of activated T cells (NFAT) Transkriptionsfaktoren gehört und bei der Pathogenese des Asthma bronchiale eine große Rolle spielt. Das in den vorliegenden Studien verwendete Protokoll zur Induktion von Asthma, das bei den zu untersuchenden NFATc2 defizienten Mäusen und der zugehörigen Wildtyp Gruppe angewendet wird, orientiert sich an dem gut etablierten Sensibilisierungsprotokoll, das bereits seit mehreren Jahren in der Arbeitsgruppe angewendet wird (13, 21, 23, 69, 70). Dabei entspricht die durch dieses Protokoll verursachte asthmatische Reaktion der Mäuse den meisten Charakteristika, die beim Asthma bronchiale des Menschen zu finden sind. Hierzu zählen die pulmonale Infiltration von unterschiedlichen Zelltypen, die hierdurch verursachte Änderung des Zytokinlevels und die Freisetzung verschiedener Mediatoren, als auch die Aktivierung und Regulation unterschiedlicher Lymphozytenpopulationen (71, 72). Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit ist neben der Widerstandsmessung der Atemwege sowohl die Untersuchung des Zytokinmusters unterschiedlicher Zelltypen, die bei der Pathogenese des Asthma bronchiale eine Rolle spielen, als auch die Charakterisierung dieser selbst.

Ein methodischer Schwachpunkt dieser Arbeit ist die Tatsache, dass die meisten Versuche größtenteils nur mit NFATc2 defizienten Mäusen und deren Kontrollgruppe durchgeführt worden sind. Dabei führt die Verwendung des Knockout Modells nicht nur zur Deletion des NFATc2 Gens auf pulmonaler Ebene, sondern im gesamten Organismus. Weiterhin muss die Frage gestellt werden, ob die embryonale Entwicklung der Mäuse in Abwesenheit des NFATc2 Gens Organschäden nach sich zieht, sodass die Ergebnisse der Atemwegswiderstandsmessung verfälscht werden. Ein Beispiel für ein verwandtes Gen, das bei der embryonalen Entwicklung eine große Rolle spielt, ist z.B. das NFATc1 Gen, welches bei der Entwicklung der endothelialen Herzzellen unabkömmlich ist. Daher ist es nicht möglich NFATc1 Knockout Mäuse zu züchten, da diese bereits im Mutterleib an einem Herzfehler versterben (73).

Um das Problem der „systemischen“ Wirkung des ausgeknockten Gens zu vermeiden, werden in dieser Arbeit Zelltransferversuche in immundefiziente SCID Mäuse durchgeführt, die mit einer oder mehreren Zellpopulationen immunisiert werden. Dabei soll geklärt werden, welche Aufgabe die einzelnen Zellpopulationen haben. Solche Versuche beinhalten jedoch mehrere methodische Schwachpunkte, da die Art der Zellapplikation (i.p oder i.v) oder der Ursprung (z.B. Milz, Lunge oder Lymphknoten) sowie die Anzahl der gespritzten Zellen einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse haben.

4.1 *Bronchiale Hyperreagibilität und allergische Th2 Immunantwort der NFATc2 defizienten Mäuse*

Mäuse, die defizient für den Transkriptionsfaktor NFATc2 (auch NFAT1 oder NFATp genannt) sind, wurden das erste Mal 1998 von Joao P.B. Viola, in Verbindung mit einer allergischen Reaktion in einem OVA/OVA Protokoll untersucht (64). Hierbei handelte es sich jedoch nicht um die direkte Beschreibung einer Bestimmung des Atemwegswiderstandes, sondern allgemein um die Regulation der allergischen Inflammation sowie der Eosinophilie in NFATc2 defizienten Mäusen. Auch in anderen Literaturquellen kann kein direkter Nachweis für einen erhöhte AHR in den NFATc2 KO Mäusen gefunden werden, so dass letztendlich nur vermutet werden kann, ob und in wieweit die NFATc2 defizienten Mäuse einen erhöhten Atemwegswiderstand vorweisen. Bei der Betrachtung der Abbildung 15, stellt sich die Frage wieso NFATc2 defiziente Mäuse keinen signifikanten Unterschied bei der invasiven AHR-Messung im OVA/OVA Protokoll zeigen. Eine Differenz ist jedoch sichtbar in der OVA sensibilisierten Mausgruppe, die keine Allergendisposition erfährt (OVA/PBS). Um diese Diskrepanz zu verstehen, wird die humorale Immunantwort der Mäuse mit der humoralen Immunantwort der Asthmatiker verglichen. Bereits vor fast 20 Jahren wurde in der Literatur beschrieben, dass die Th2 Population eine große Rolle in der asthmatischen Reaktion bei Menschen spielt (16, 72, 74). Obwohl die Bedeutung der einzelnen Th2 Zytokine im Laufe der Zeit mehr und mehr aufgeklärt wurde, ist sie bis heute immer noch nicht vollständig entschlüsselt. Ein wichtiges Charakteristikum der NFATc2

defizienten Mäuse, welches mit den der Asthmatiker übereinstimmt, ist die von Hodge und Kiani beschriebene Disregulation der IL-4 Produktion in NFATc2 KO Mäusen (58, 75). Diese hier beschriebene erhöhte Produktion des IL-4 konnte ebenfalls in der Lunge der OVA/PBS- als auch OVA/OVA-behandelter Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 21). Bei der Untersuchung der restlichen Zytokinproduktion der CD4⁺ Th2 Zellen aus der Lunge beider Konditionen wird ein ähnliches Zytokinmuster, wie in der Literatur beschrieben ist, beobachtet (9, 64, 76). Die NFATc2 KO Mäuse zeigen äquivalent zu den Publikationen eine vermehrte IL-5 und IL-13 Produktion im Vergleich zu den Wildtypen (Abbildung 21). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass in dem verwendeten Asthmadmodell die NFATc2 defizienten Mäuse einen erhöhten IgG-Spiegel im Blut vorweisen (Abbildung 16), sollte zwangsläufig zu einer erhöhten AHR bei OVA/PBS- als auch bei OVA/OVA-behandelten Mäusen führen. Da dies jedoch trotz mehrerer Versuche in den OVA/OVA-behandelten Gruppen nicht der Fall gewesen ist, müssen andere Faktoren bei den OVA/PBS-behandelten Mäusen eine Rolle spielen, als bei Mäusen, die der Allergendisposition ausgesetzt werden. Die Untersuchungen der Eosinophilenpopulation im OVA/OVA Modell zeigt ebenfalls einen weiteren Widerspruch zu bereits publizierten Daten. In dem bereits erwähnten Paper von Joao P.B. Viola (64) wird von einer signifikant erhöhten Anzahl Eosinophiler im Blut, Knochenmark und der Pleura NFATc2 defizienter Mäuse berichtet. Diese Beobachtung kann weder in den histologisch ausgewerteten Lungenschnitten der Mäuse, noch in den aus der BALF gewonnenen Zellen der OVA/OVA-behandelten Mäuse bestätigt werden (Abbildung 20). Im Gegenteil, die Auszählung der BAL Zellen ergibt eine signifikant erniedrigte Eosinophilenzahl bei den NFATc2 KO Mäusen. Weiterhin kann ein tendenzieller Rückgang an Eotaxin in den NFATc2 defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 20 b). Dies stärkt die These von einer reduzierten Anzahl Eosinophiler in der OVA/OVA Kondition. Der gemessene Eotaxin-Level widerspricht ebenfalls bereits publizierten „Humandaten“, bei denen grundsätzlich ein erhöhter Level an Eotaxin bei Asthmatikern vorgefunden wird (77). Daher stellt sich hier die Frage, wieso es trotz erhöhter IL-5 Werte, die bekanntlicherweise die Eosinophilie fördern (78, 79), zu keiner vermehrten Anzahl Eosinophiler in der Lunge der OVA/OVA-behandelten Mäuse kommt.

4.2 **Histologische Untersuchung NFATc2 defizienter Mäuse**

Weder bei den OVA/PBS- noch bei den OVA/OVA-behandelten Mäusen kann mittels histologischer Untersuchung an HE-gefärbten Schnitten eine signifikant erhöhte Schädigung des Lungenepithels in den NFATc2 defizienten Mäusen gezeigt werden (Abbildung 17). Bei der Untersuchung der Lungenschnitte, die mit der Trichromfärbung nach Masson-Goldner gefärbt sind, kann eine erhöhte Kollageneinlagerung in den NFATc2 KO Mäusen beobachtet werden (Abbildung 19). Diese erhöhte Kollagendeposition wird teilweise durch die regulatorischen Eigenschaften des NFATc2 Gens bei der Chondrogenesis (Knorpelbildung) erklärt werden (80). In dem von Ranger et al. publizierten Artikel wird eine erhöhte Knorpelbildung in ausgewachsenen NFATc2 Mäusen beschrieben. Da Knorpelgewebe hauptsächlich aus Zellen und Interzellulärsubstanz, welche größtenteils aus Kollagenen und Proteoglykanen (hauptsächlich Aggrecan) besteht, aufgebaut ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Transkriptionsfaktor NFATc2 die Kollagenbildung auch beeinträchtigt. Obwohl Kollagen für die Stützfunktion der Lunge unabkömmlich ist, führt eine vermehrte Expression des Kollagens zu einer reduzierten Dehnbarkeit und damit zu einem vermehrten Atemwegswiderstand (81).

Bei näherer Begutachtung der HE-Schnitte (Abbildung 17 a, b, d, e) kann trotz der fehlenden Schädigung des Lungenepithels eine vermehrte Anzahl an Lymphozyten im intraepithelialen Raum bei den NFATc2 defizienten Mäusen beobachtet werden. Da der Schwerpunkt der Untersuchung bei den OVA/PBS Mäusen liegt, wird die quantitative Zellzahlbestimmung der Lymphozytenmigration nur in den Mäusen ohne Allergendisposition durchgeführt (Tabelle 2). Eine Analyse der Cryoschnitte mittels immunhistologischer Untersuchung ergibt, dass es sich hier unter anderem um CD4⁺ T-Lymphozyten handelt, die vermehrt bei den NFATc2 KO Mäusen im intraepithelialen Raum zu finden sind (Abbildung 17 c und f). Ein möglicher Grund für diese vermehrte Migration der CD4⁺ T-Lymphozyten kann die erhöhte Expression des Kollagenbindenden Rezeptors $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2; CD49b) auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen sein (Abbildung 28 a). Die mittels Durchflusszytometrie nachgewiesenen CD4⁺ CD49b⁺ doppelpositiven T-Zellen können in erhöhter Anzahl in allen drei Konditionen (PBS/PBS, OVA/PBS, OVA/OVA) in Lunge und Milz NFATc2 defizienter Mäuse nachgewiesen

werden. Diese CD4⁺ CD49b⁺ T-Zellen werden von Richter et al. 2007 als eine Population beschrieben, die eine hohe Affinität zu den in der Lunge vorkommenden Kollagen I-reichen Gewebe besitzt (68). Aus diesem Grunde ist es sehr wahrscheinlich, dass diese vermehrt in die kollagenreichen Regionen der NFATc2 KO Maus einwandern. Untersuchungen der CD8⁺ T-Zellen ergeben hingegen keine Expression des VLA-2 Rezeptors. Dies lässt den Rückschluss zu, dass VLA-2 ein CD4⁺ T-zellspezifisches Integrin ist. Neben der erhöhten Expression an CD49b (VLA-2) in den NFATc2 KO Mäusen kann ein signifikanter Anstieg der CD4⁺CD49b⁺ T-Zellen in der OVA/OVA-Gruppe im Vergleich zur PBS/PBS-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 28 c). Dies ist jedoch nur in der Lunge der Fall und kann nicht in der Milz verifiziert werden. Im Gegenteil, es hat vielmehr den Anschein, dass mit steigender Allergendisposition der Anteil CD4⁺CD49⁺ T-Zellen in der Milz sinkt, was wiederum ein Hinweis auf einen ubiquitären Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen der KO Maus ist. Um dies zu beweisen, hätten zusätzlich die CD4⁺ CD8⁻ CD49b⁺ Thymozyten (Zellen aus dem Thymus) und die CD4⁺CD49b⁺ Zellen der Lymphknoten untersucht werden müssen, was jedoch nicht geschehen ist.

Betrachtet man neben der erhöhten IL-4 und IL-5 Produktion die ebenfalls erhöhte IL-13 Produktion in den CD4⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse (Abbildung 21 b und d), so ist dies ein weiteres Anzeichen der vermehrten Th2 Antwort in der KO Maus (24, 82). Nicht zuletzt ist das IL-13 auch als ein Zytokin bekannt, welches die vermehrte Mukusproduktion in der Lunge der OVA/OVA-behandelten NFATc2 KO Mäuse erklärt (83) (Abbildung 18).

4.3 Zytokin-Level in den Zellkulturüberständen CD4⁺ T-Zellen

Bei der Bestimmung der unterschiedlichen Zytokine in den Zellkulturüberständen der für 24h kultivierten CD4⁺ T-Zellen finden sich neben den o.g. klassischen Th2 Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 auch erhöhte Mengen an IFN- γ , IL-10, TGF- β_1 und IL-17 in den NFATc2 defizienten Mäusen. IL-17, welches unter anderem von CD4⁺ Th17 Zellen freigesetzt wird, wurde bereits 1996 als ein proinflammatorisches Zytokin erkannt (84). Im Laufe der Jahre wurde dies öfter demonstriert, dass erhöhte IL-17-Spiegel

vermehrt in der BAL und im Sputum von Asthmatikern gefunden werden (15, 28). Dies lässt sich auch mit der Tatsache in Einklang bringen, dass man bei Asthmatikern für gewöhnlich geringe Mengen an IFN- γ in der BAL sowie im Sputum findet (3, 36). Dabei kann die Th17 Population in Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen von IL-12 als auch von IFN- γ supprimiert werden (85). Dies steht jedoch im Widerspruch zur Tatsache, dass trotz vermehrter IFN- γ Produktion in den CD4+ T-Zellen (Abbildung 25), ebenfalls eine vermehrte IL-17 Freisetzung gefunden werden kann. Diese Diskrepanz kann teilweise mit der Regulierung des IL-17 Promotors durch NFAT erklärt werden (86). Die in der Publikation von Xikui et al. beschriebene Regulierung des IL-17 durch NFAT wird in humanen Jurkartzellen untersucht. Weiterhin wird in der Publikation näher beschrieben, dass die proximale Region des IL-17 Promotors an NFATc1 einen „Gegenspieler“ von NFATc2 bindet, so dass es beim „knockout“ des NFATc2 Gens wahrscheinlich zu einer indirekten Hochregulation von IL-17 kommt. Ein anderer Ansatz, der die Bedeutung von NFATc2 bei der Th17 Regulierung verdeutlicht, ist die von Rengeraja et al. publizierte Veröffentlichung (87). Diese demonstriert, dass der „Interferon regulatory factor 4“ (IRF4) eine Synergie mit NFATc2 eingeht, was wiederum die Aktivierung des IL-4 Promotors verstärkt. Kombiniert man dies mit der erst kürzlich veröffentlichten Publikation, die zeigt, dass IRF4 defiziente Mäuse eine vermehrte Menge an IL-17 produzieren (88), so stellt sich hier die Frage, ob dieses Phänomen auch durch NFAT bedingt ist.

Ob die IL-17 Freisetzung nun durch den erhöhten IFN- γ Level in den CD4+ T-Zellen beeinflusst wird, kann auch mit dieser Annahme nicht befriedigend beantwortet werden. Es kann jedoch definitiv gezeigt, dass naive CD4+CD62L+ T-Zellen, die aus der NFATc2 defizienten Maus isoliert werden, unter IL-17 Kondition mehr IL-17 produzieren als die naiven CD4+CD62L+ T-Zellen der Wildtyp Maus (Daten nicht gezeigt). Weiterhin fällt bei der Analyse der Zellkulturüberstände auf, dass fast alle Zytokine, sei es Th1, Th2, Th17 oder die immunsuppressiven Zytokine TGF- β_1 und IL-10, in den CD4+ T-Zellen der Lunge der NFATc2 KO Mäuse erhöht sind. Aus diesem Grunde stellt sich die Frage nach der Aktivierung der konventionellen CD4+ T-Zellen und nach einer möglichen Hyperproliferation dieser, die teilweise den erhöhten Level aller Zytokine erklären könnte.

4.4 Aktivierter Phänotyp der konventionellen CD4+ T-Lymphozyten

Der Aktivierungslevel der CD4+ T-Zellen ist auch ein weiterer Hinweis auf die Entwicklung des Atemwegswiderstandes in den NFATc2 defizienten Mäusen. Um dies zu untersuchen werden Analysen der Gesamtzellen aus Milz und Lunge durchgeführt, um sich ein Bild über den peripheren und die lokalen Aktivierungslevel der CD4+ T-Zellen zu verschaffen. Hierfür werden die Gesamtzellen der Milz und Lunge mit anti-CD4, anti-CD44, anti-CD69 und anti-CD1d Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf ihren prozentuellen Anteil in der Lymphozytenpopulation untersucht. Das Proteoglykan CD44 ist ein Oberflächenmolekül, das ubiquitär vorkommt. Es wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert (z.B. Eosinophilen Granulozyten, NK- Zellen, Lymphozyten), wobei es zu einer Hochregulation dieses bei metabolischer Aktivierung *in vivo* als auch *in vitro* kommt (z.B. durch IL-3 oder IL-5) (89, 90). Das zweite Oberflächenmolekül, das zur Identifikation aktivierter T-Zellen dient, ist CD69, welches auf Eosinophilen, Neutrophilen, NK Zellen und Lymphozyten exprimiert wird. Die Expression dieses CD Markers ist ähnlich dem CD44 abhängig von der Antigenstimulation, sodass hier auch eine Aussage über die Frühaktivierung der Lymphozyten getroffen werden kann (91, 92). Um jedoch sicher zu stellen, dass es sich hier um die gemessene Population von CD4+ T-Zellen und nicht um NKT-Zellen handelt (93), die ebenfalls CD4 CD44 CD69 positiv sein können, wird diese ausgeschlossen, indem alle Zellen, die CD1d (ein NKT Zell Marker) positiv sind, nicht mit in die Auswertung einbezogen werden (Abbildung 26). Die Auswertung der Daten, die in Abbildung 27 dargestellt sind, ergeben ein interessantes Bild der peripheren (Milz) und lokalen (Lunge) CD4 Aktivierung. Werden die OVA/PBS-behandelten Tiere mit den Tieren die zusätzlich einer Allergendisposition ausgesetzt worden sind (OVA/OVA), verglichen, so fällt auf, dass die OVA/PBS Tiere sowohl in der Milz als auch in der Lunge einen aktivierten Phänotyp der CD4+ T-Zellen zeigen. Dies ist jedoch nur in der Milz der OVA/OVA-behandelten Mäuse der Fall. Das Ausbleiben des aktivierten Phänotyps der CD4+ T-Zellen in den Lungen der OVA/OVA-behandelten NFATc2 KO Mäuse spiegelt sich in der AHR-Messung dieser wider (Abbildung 15 b). Dieses

Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen in der Lunge NFATc2 defizienter Mäuse andere Faktoren eine Rolle spielen als in der Milz.

4.5 Erhöhte T-regulatorische Population in den Lungen NFATc2 defizienter Mäuse

Wie bereits erwähnt, zeigt die mittels ELISA durchgeführte Analyse der Zellkulturüberstände CD4⁺ T-Zellen, welche aus den Lungen von NFATc2 KO Mäusen gewonnen werden, erhöhte Mengen an den immunsuppressiven Zytokinen TGF- β_1 und IL-10 (Abbildung 22, Abbildung 23). Obwohl es bekannt ist, dass TGF- β_1 eine wichtige Rolle bei der Suppression von autoaggressiven CD4⁺ T-Zellen spielt (94), ist es noch diskussionsbedürftig, ob dieses Zytokin membrangebunden essenziell bei der T-regulatorisch vermittelten Suppression ist (95, 96). Versuche mit TGF- β defizienten Mäusen zeigen, dass aus diesen Mäusen isolierte T-regulatorische Zellen eine TGF- β_1 abhängige Suppression induzierten (94). TGF- β_1 selbst kann ebenfalls die Entstehung von T-regulatorischen Zellen fördern (97), wobei es maßgeblich von IL-10 beeinflusst wird (98). Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass die Erkenntnis über die vermehrte TGF- β_1 und IL-10 Produktion eine Untersuchung der T-regulatorischen Population in der NFATc2 defizienten Maus sinnvoll macht.

Die Population der T-regulatorischen Zellen wurde unter anderem von Bopp et. al. bis dato nur in Milzen NFATc2/NFATc3 doppeldefizienter Mäuse untersucht (35). Dabei fand man eine erhöhte Menge an CD4⁺ CD25⁺ doppelpositiven T-Zellen, deren regulatorische Fähigkeit mit Hilfe von Proliferationsversuchen untersucht wurde. Die Untersuchung des T-regulatorischen Anteils in in dieser Arbeit untersuchten NFATc2 defizienten Mäusen, erfolgt aus den Gesamtzellen der Lunge, wobei die NFATc2 KO Mäuse eine erhöhte Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu den Wildtypen zeigen (Abbildung 29). Um die T-regulatorische Population in den NFATc2 KO Mäusen bestmöglich zu bestimmen, wird neben den gängigen Treg Oberflächenmarkern anti-CD4, anti-CD25 und anti-GIRT (99, 100) die Expression des im Zellkern lokalisierten Transkriptionsrepressors, genannt FoxP3, bestimmt. FoxP3, das zur Familie der Forkhead-box Transkriptionsfaktoren gehört, ist bis dato der einzig anerkannte Treg

Marker (101-103). Neben der Bestimmung dieses Markers mittels FACS ist gleichzeitig auch der FOXP3 mRNA-Level in isolierten CD4⁺ T-Zellen der Lungen NFATc2 defizienter Mäuse untersucht worden (Abbildung 29). Auch hier zeigen die NFATc2 KO Mäuse in der Realtimebestimmung eine erhöhte FoxP3 mRNA Menge, wobei die FoxP3 Expression nach Allergendisposition ähnlich wie in der durchflusszytometrischen Bestimmung am höchsten ist. Vor diesem Hintergrund stellt sich ebenfalls die Frage, in wie weit die erhöhte T-regulatorische Population der OVA/OVA-behandelten Mäuse die entzündliche Reaktion in der Lunge unterdrücken kann. Wie essenziell diese erhöhte Treg Population für die Zellhomeostase ist, sollte durch die Messung der CD4 Proliferation (Abbildung 31) gezeigt werden.

Die Messung der Proliferation mittels CFSE zeigt, dass sowohl die CD4⁺ T-Zellen aus den Lungen, als auch aus der Milz OVA/PBS-behandelter NFATc2 defizienter Mäuse stärker proliferieren, als die der Wildtypen. Eine Hyperproliferation der B- und T-Zellen in NFATc2 KO Mäusen, wurde bereits von Hodge et al. 1996 gezeigt und mehrmals in anderen Publikationen bestätigt (58, 104). Da in dieser Arbeit eine erhöhte Treg Population in den NFATc2 KO Mäusen gefunden wurde, die Hand in Hand mit der Hyperproliferation der CD4⁺ T-Zellen geht, kann von einem Defekt in den Tregs oder in den konventionellen CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen ausgegangen werden. Da bis dato die Funktion der Tregs in der single NFATc2 defizienten Maus nicht untersucht wurde, werden einige Kokulturversuche mit isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und den zugehörigen Tregs durchgeführt. Die hierzu benötigten Zellen stammen aus der Milz von unbehandelten Tieren, um eine bestmögliche Aussage über die Eigenschaften beider Populationen treffen zu können. Die isolierte Treg Population, welche für diesen Versuch verwendet wird, besteht aus der in Bopp et al beschriebenen CD4⁺ CD25⁺⁺ GITR⁺⁺ Population (35), welche fast zu 100% FoxP3 positiv ist. Ähnlich wie in der hier genannten Publikation zeigen die isolierten CD4⁺ CD25^{low} GITR^{low} Zellen keine Suppression der CD4⁺ CD25⁻ „Targetzellen“ (Abbildung 32). Daher kann davon ausgegangen werden, dass nur die CD4⁺ CD25⁺⁺ GITR⁺⁺ T-Zellen suppressiv wirken. Die Untersuchung der Zytokinproduktion der CD4⁺ CD25^{low} GITR^{low} T-Zell Population, ergibt ebenfalls eine erhöhte IL-5 Produktion (Daten nicht gezeigt), was wiederum ein Merkmal von Effektorzellen ist. Dies lässt sich mit den Untersuchungen von Asthmatikern in Einklang bringen, bei denen neben der vermehrten IL-5 Produktion

ebenso eine erhöhte Anzahl an CD4+CD25+ Zellen in der Lunge gefunden wird (105). Um die suppressive Eigenschaft der CD4+ CD25++ GITR++ Tregs aus WT und KO Mäusen zu untersuchen, werden diese jeweils mit den WT als auch mit den KO CD4+CD25- konventionellen T-Zellen für vier Tage kultiviert. Am Tag vier werden die Kokulturen auf ihre Proliferation untersucht (Abbildung 33). Obgleich die Tregs der WT oder KO Mäuse mit den NFATc2 KO CD4+CD25- T-Zellen kokultiviert werden, zeigen diese immer eine erhöhte Proliferation gegenüber der CD4+CD25- WT Gruppe.

Dieses Experiment zeigt daher, dass sich unabhängig vom Ursprung der Tregs die Proliferation der konventionellen NFATc2 KO CD4+ CD25- T-Zellen im Vergleich zu den konventionellen CD4+ CD25- T-Zellen des Wildtyps weniger inhibieren lässt. Die T-regulatorische Population der NFATc2 KO Mäuse scheint vollkommen funktionstüchtig zu sein, da sie die WT als auch die KO CD4+CD25- T-Zellen gleichermaßen hemmt. Dies wiederum wirft die Frage auf, ob die deutliche Erhöhung der T-regulatorischen Population in der Lunge der NFATc2 defizienten Maus, wie das der Fall in den OVA/OVA-behandelten Mäusen ist, den entzündlichen Prozessen in der Lunge entgegenwirkt und mitunter für die geringere Eosinophilenanzahl (Abbildung 20) in der BAL der NFATc2 KO Mäuse mitverantwortlich ist. Dass die T-regulatorische Population die spezifische Th2 Antwort und die Eosinophilenzahl *in vivo* reduzieren kann, wurde bereits mehrmals in verschiedenen Publikationen gezeigt (106-108). Auch jegliche Erhöhung der T-regulatorischen Anzahl, wie z.B. durch Zugabe eines löslichen IL-6 Rezeptors, wirkt den entzündlichen Prozessen *in vivo* entgegen (13). Zugleich kann in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass FoxP3 eine direkte Interaktion mit NFAT vorweist (59, 109), sodass das Ausbleiben dieses Gens für eine Erhöhung der T-regulatorischen Population verantwortlich sein kann, was wiederum eine protektive Wirkung in einer asthmatischen Reaktion hätte.

Eine genauere Untersuchung der Lungen Tregs von-OVA/OVA behandelten NFATc2 KO Mäusen in Punkto Eosinophilie und Proliferation bleibt jedoch aus.

4.6 Einfluss OVA-spezifischer CD4+ T-Zellen auf die Entwicklung der AHR nach adoptivem Transfer

Um die Auswirkung der CD4+ T-Zellen auf die Entwicklung des Atemwegswiderstandes zu untersuchen, werden jeweils aus der Milz der NFATc2 defizienten Mäuse bzw. des Wildtyps die OVA spezifischen CD4+ T-Zellen isoliert und in SCID Mäuse intraperitoneal injiziert (siehe Abschnitt 3.6). Durch die Behandlung der SCID Mäuse mit dem OVA-Antigen, dem die Mäuse sowohl einmal vor als auch dreimal nach dem T-Zelltransfer ausgesetzt werden, kommt es in den immunisierten Tieren zur Proliferation der transferierten Zellpopulation und zur Entwicklung einer entzündlichen Reaktion (13, 110). Wie in Abbildung 34 dargestellt, gibt es bei der Messung der AHR keine Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Gruppen. Die Messung der Zytokine mittels ELISA, welche aus der BAL der SCID Mäuse durchgeführt wird, zeigt jedoch ähnlich den Zellkulturüberständen der CD4+ T-Zellen, eine erhöhte Th2 als auch eine drastisch erhöhte Th1 Zytokinproduktion in den SCID Mäusen, welche mit den CD4+T-Zellen der NFATc2 defizienten Maus immunisiert werden. Da eindeutig mit diesem Versuch gezeigt werden kann, dass trotz einer erhöhten Th2 Zytokinproduktion keine vermehrte Entzündungsreaktion im Vergleich zum Wildtypen auftritt, stellt sich die Frage in wieweit IFN- γ für die fehlende Differenz des Atemwegswiderstandes verantwortlich ist. IFN- γ , das in einer Vielzahl von Publikationen mit der Expression des T-bet Transkriptionsfaktors (T-box expressed in T cells) in T- und NK-Zellen korreliert (60, 111), kann die Entwicklung der asthmatischen Reaktion maßgeblich beeinflussen (21, 91). Weiterhin wird gezeigt, dass T-bet auch die Rekrutierung der Eosinophilen und die durch Th-17 Zellen bedingte Rekrutierung der Neutrophilen verhindern kann (112). Dies steht wiederum mit der Erkenntnis im Einklang, dass bei Untersuchungen der Cytospin Präparate, die aus der BAL der SCID Mäuse gewonnen werden, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Makrophagen, Eosinophilen, Monozyten oder der Neutrophilen gefunden wird (Daten nicht gezeigt).

Ob nun nur die erhöhte IFN- γ Produktion der CD4+ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse, oder auch die erhöhte Treg Population dieser für das Fehlen der AHR im SCID-Modell verantwortlich ist, kann durch den alleinigen Transfer der CD4+ T-Zellen nicht geklärt werden.

4.7 Die Gesamtmenge an IFN- γ in den Lungen der NFATc2 KO Mäuse ist niedriger als in den Wildtypen

Die Tatsache, dass das IFN- γ eine große Rolle bei der Entstehung des Asthma bronchiale spielt, wird in dieser Arbeit mehrmals demonstriert (36-38, 76, 113). Daher kann die erhöhte Produktion dieses Zytokins der CD4+ T-Zellen nicht mit dem erhöhten Atemwegswiderstand der OVA/PBS-behandelten Mäuse in Einklang gebracht werden. Da die CD4+ T-Zellen nicht den größten Anteil an IFN- γ in der Lunge produzieren, wird die Quantität dieses Zytokins mittels intrazellulärer Färbung in der Lunge untersucht (Abbildung 37). Dadurch können alle anderen IFN- γ produzierenden Zellen in der Lunge erfasst werden. Wie erwartet, ist die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD8+ T-Zellen in beiden Gruppen höher als die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4+ T-Zellen, allerdings produzieren die NFATc2 KO CD8+ T-Zellen weniger IFN- γ , als die CD8+ T-Zellen des Wildtyps. Zusammengefasst ist die Menge, die in der Lunge der Wildtypen produziert wird, höher als die Menge, die in der Lunge der NFATc2 KO Mäuse produziert wird. Damit spielt die IFN- γ Produktion der CD4+ T-Zellen sowohl in den Wildtyp als auch in den KO Mäusen eine untergeordnete Rolle. Da die Zellen bei der intrazellulären Färbung für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert werden, gibt die Messung Auskunft über die Fähigkeit einer Zelle ein bestimmtes Zytokin zu produzieren, sagt jedoch nichts über die tatsächlich freigesetzte Menge aus. Um eine *in vivo* nahe IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen zu erhalten, werden diese aus den Zellkulturüberständen isolierter CD8+ T-Zellen mittels Elisa bestimmt. Wie in Abbildung 38 gezeigt, ist auch in den Zellkulturüberständen der isolierten CD8+ T-Zellen die IFN- γ Produktion der NFATc2 KO Mäuse niedriger, als in den Wildtypen. Diese Abhängigkeit der IFN- γ Produktion von NFATc2 wurde Mitte 2005 von Teixeira et al. beschrieben (66). Ebenso kann in dieser Publikation eine verringerte IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen in den NFATc2 defizienten Mäusen festgestellt werden. Weiterhin wird in der gleichen Publikation gezeigt, dass mit steigender IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen die IL-4 Freisetzung der CD4+ T-Zellen sinkt.

Die Ursache für die gestörte IFN- γ Produktion in den CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse und der direkte Einfluss dieser CD8⁺ T-Zellen auf die Entwicklung der AHR wird im Detail beschrieben.

4.8 Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse

Da bis heute nur wenig über die Rolle der CD8⁺ T-Zellen bei Asthma bronchiale publiziert wurde (47), ist auch entsprechend wenig über die unterschiedlichen Subpopulationen der CD8⁺ T-Zellen bei dieser Krankheit bekannt. Frühere Untersuchungen der CD8⁺ T-Zellen zeigen, dass sich *naive* CD8⁺ T-Zellen durch Antigenstimulation zu „effector“ CD8⁺ T-Zellen entwickeln (114, 115), die wiederum, wie unter anderem von Sallusto et al. beschrieben (116), in central memory (CCR7⁺ CD62L⁺) und effector memory (CCR7⁻ CD62L⁻) unterteilt werden können. Der Chemokinrezeptor CCR7 (BLR2, CD197) ist für das „Homing“ der Lymphozyten und Dendritischen Zellen in die Lymphknoten verantwortlich und wird hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert. Der Marker CD62L hingegen wird hauptsächlich auf naiven Zellen exprimiert. Die Charakterisierung der Subpopulationen in den Lungen mit den o.g. Marker ergibt bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren keine Unterschiede, da weder CCR7 noch CD62L in den KO als auch in den WT Lungenzellen vermehrt exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Marker kommen vorwiegend in lymphatischen Organen, wie z.B. der Milz, oder den Lymphknoten, vor (116, 117). Da jedoch definitiv ein Unterschied in den CD8⁺ T-Zellen der Lunge von Wildtyp und NFATc2 defizienten Mäusen besteht, der sich besonders in der IFN- γ Produktion manifestiert, ist unter anderem der IL-2 Rezeptor auf den CD8⁺ T-Zellen untersucht worden. Der IL-2 Rezeptor, welcher aus drei Untereinheiten besteht, nämlich der 55kDa α -Kette (CD25), einer 75kDa β -Kette (CD122) und einer 64kDa γ -Kette (CD132), wird nicht nur auf T-Zellen exprimiert, sondern auch auf NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Thymozyten, Endothelzellen und Oligodendrozyten (118). Bei der Untersuchung der CD8⁺ T-Zellen der Lunge und der Milz fällt auf, dass die α -Kette in den NFATc2 KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen auf den CD8⁺ T-Zellen leicht erniedrigt ist, die β -Kette jedoch stark erhöht exprimiert wird (Abbildung 39, Abbildung 46). Dieses Ergebnis

spricht für eine höhere IFN- γ Produktion in den Wildtypen, da bereits in früheren Publikationen gezeigt werden konnte, dass die CD8+CD122+ doppelpositiven T-Zellen eine regulatorische Fähigkeit gegenüber den CD8+CD122- T-Zellen besitzen. Andere publizierte Versuche ergaben, dass durch Zugabe von CD8+CD122+ T-Zellen in eine CD8+CD122- Population, die Proliferation und die IFN- γ Produktion der CD8+CD122- T-Zellen gehemmt werden kann (119, 120). Eine genauere Untersuchung der IFN- γ Produktion in den CD8+ T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung zeigt in dem im Absatz 3.7.2 beschriebenen Experiment, dass das IFN- γ tatsächlich nur von den CD8+CD122- T-Zellen produziert wird (Abbildung 40). Dass die Produktion von IFN- γ mit der Expression der β -Kette korreliert, kann mit zwei anderen Knockout Stämmen demonstriert werden. Sowohl IFN- γ KO (Abbildung 43) als auch die T-bet KO Mäuse (Daten nicht gezeigt) zeigen eine vermehrte Expression des Oberflächenmarkers CD122 auf den CD8+ T-Zellen. Diese Ergebnisse werden in der Arbeit von Matsuda et al. bestätigt (121), in der gezeigt werden konnte, dass T-bet sowohl die IFN- γ , die CxCR3 als auch die CD122 Expression reguliert (CxCR3 ist ein Mitglied der CXC Familie der Chemokinrezeptoren und ist unter anderem maßgeblich an der Pathogenese chronisch entzündlicher Veränderungen beteiligt). Dies lässt den Rückschluss zu, dass sich die vermehrte IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen positiv auf die Genesis des Asthma bronchiale auswirkt. Diese Aussage wird sowohl durch die humanen Untersuchungen, bei denen sich ein erhöhter IFN- γ Level in der Lunge protektiv auf die bronchiale Inflammation auswirkt (21, 46), untermauert, als auch durch Beobachtungen, die demonstrieren, dass NFATc2 defiziente Mäuse eine höhere AHR vorwiesen.

Um die regulatorischen CD8+ T-Zellen der Wildtyp und der NFATc2 KO Mäuse näher zu bestimmen, wurde ebenfalls wie in der Publikation von Endharti et al. (119) das Augenmerk auf die IL-10 Produktion der CD8+ T-Zellen gerichtet. Im Einklang mit dieser Publikation kann ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl die CD8+ T-Zellen der NFATc2 KO als auch der IFN- γ KO Mäuse mehr IL-10 freisetzen (Abbildung 41,Abbildung 44), welches eindeutig größtenteils von CD8+CD122+ T-Zellen produziert wird (Abbildung 42,Abbildung 45). Die Funktion und Bedeutung der IL-10 produzierenden CD8+ Tregs ist nicht vollständig geklärt und höchst umstritten. Ferner wurde von Noble et al. gezeigt,

dass die IL-10 produzierenden CD8⁺ T-Zellen eine suppressive Wirkung auf naive als auch auf CD8⁺ Effektorzellen haben (31). Dies spiegelt sich in dieser Publikation im erniedrigten IgE jedoch nicht im OVA-spezifischen IgE1-Level wieder. Die ebenfalls in dieser Publikation untersuchten CD8⁺ Tregs setzen jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten CD8⁺ Tregs, große Mengen an IL-10 und IFN- γ frei (beinahe 100% der CD8⁺ Tregs sind IFN- γ und IL-10 doppelpositiv). Daher ist zu bezweifeln, dass diese hohe Zytokinfreisetzung, welche nur mittels einer Dexamethason/Vitamin D + IL-4/IL-12 Behandlung erreicht werden konnte, *in vivo* vorkommt. Zwar zeigten die NFATc2 defiziente Mäuse einige IFN- γ ⁺ IL-10⁺ doppelpositive Zellen, diese Anzahl ist jedoch im Vergleich zu den restlichen CD8⁺ T-Zellen verschwindend gering (Daten nicht gezeigt). Andererseits konnte auch in einer anderen Publikation demonstriert werden, dass die CD8⁺CD122⁺ Tregs nicht nur die IFN- γ Produktion der CD8⁺ T- Effektorzellen, sondern ebenso die der IFN- γ produzierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen verringern kann (120). Dies kann in den untersuchten NFATc2 defizienten Mäusen nicht beobachtet werden.

Neben der Bedeutung des Oberflächenmarkers CD122 bei den regulatorischen CD8⁺ T-Zellen wird dieser auch unter anderem auf den „long live memory“ und den o.g „effektor memory“ T-Zellen exprimiert. Die „long live memory“ Zellen werden ebenfalls durch den Marker CD127 definiert, der ein Bestandteil des IL-7 Rezeptors ist (115, 122). IL-7R besteht neben dem Oberflächenmarker CD127 (IL-7-alpha Kette), ebenfalls aus dem Marker CD132, welcher wiederum auch ein Bestandteil des IL-2 Rezeptors ist. Untersuchungen der CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Analyse ergeben eine signifikant erhöhte Anzahl an CD8⁺CD122⁺CD127⁺ dreifachpositiven Zellen in der Lunge NFATc2 defizienter Mäuse. Dabei handelt es sich hier der Literatur nach um „long-lives memory“ CD8⁺ T-Zellen, die eine sehr schnelle Immunantwort in Anwesenheit eines Antigens nach sich ziehen (115, 123). Obwohl die meisten publizierten Untersuchungen dieses Zelltyps bei einer viralen Infektion durchgeführt werden, sollte auch ein OVA-Antigen, ähnlich einem Viralen-Antigen, eine vermehrte Anzahl an CD8⁺ T-Effektorzellen hervorrufen können. Eine erhöhte Anzahl an T-Effektorzellen kann wiederum, wie in der Publikation von Miyahara et al. beschrieben, für eine vermehrte Inflammation und einen erhöhten Atemwegswiderstand verantwortlich sein (45). Zusätzlich zu dem erhöhten Atemwegswiderstand kann in dieser Publikation eine vermehrte IL-13 Sekretion gezeigt

werden, die ebenfalls in den untersuchten NFATc2 KO Mäusen zu finden ist. In diesem Fall stellt sich jedoch zuerst die Frage, ob die CD8⁺ Population der NFATc2 defizienten Mäuse eine Auswirkung auf die AHR hat.

4.9 Effekt der CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Maus auf die AHR

Da, wie bereits in Abbildung 34 gezeigt, die OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse nicht in der Lage sind eine erhöhte AHR hervorzurufen, sollte die Rolle der CD8⁺ T-Zellen im OVA/OVA-Modell untersucht werden. Spätere Untersuchungen anderer Behandlungsmodelle zeigen, dass ohne den Einsatz von CD4⁺ T-Zellen eine vergleichbar hohe Atemwegswiderstandsmessung im SCID Modell nicht möglich ist (Abbildung 51). Dies wird teilweise durch die Tatsache unterstützt, dass für die Entwicklung von CD8⁺ Memory-Zellen die Anwesenheit der CD4⁺ T-Zellen entscheidend ist (124, 125). Da jedoch allgemein akzeptiert ist, dass die CD8⁺ T-Zellen neben den CD4⁺ T-Zellen bei der pulmonalen Entzündung mitverantwortlich sind (45, 126), werden die CD8⁺ T-Zellen des Wildtyps oder der KO Maus mit den CD4⁺ T-Zellen der KO Maus in die Mäuse intraperitoneal injiziert. Die Abbildung 48 zeigt, dass die SCID Mäuse, die mit den CD8⁺ T-Zellen aus der NFATc2 defizienten Maus gespritzt werden, eine erhöhte AHR aufweisen. Daher stellt sich hier die Frage, in wieweit der erhöhte Anteil der CD8⁺CD122⁺ T-Zellen hierfür mitverantwortlich ist. Der Oberflächenmarker CD122 (β -Kette des IL-2-Rezeptors) ist zugleich auch eine Bindungsstelle für IL-15, welches an einen heterotrimerischen Rezeptorkomplex bindet. Dieser Rezeptor besitzt eine eigene IL-15R α Kette, teilt jedoch die β - und die γ -Kette mit dem IL-2-Rezeptor (127). Rückert et al. demonstrierte ebenfalls in einem OVA/OVA-Modell, dass die Blockade des IL-15 durch Zugabe eines löslichen IL-15 Rezeptors eine signifikante Erniedrigung der Th2 Zytokine und der AHR zufolge hat (128). Ebenfalls konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass die Anzahl an CD8⁺CD122⁺ doppelpositiven T-Zellen sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten bei Antikörpergabe erniedrigt war. Diese Publikation korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit und erklärt den erhöhten IL-17 und erniedrigten IFN- γ Level in der BAL immunisierter SCID Mäuse, welche mit NFATc2 KO CD8⁺ T-Zellen rekonstituiert werden (Abbildung 49 a und b). Demzufolge verursacht die erhöhte Menge an

CD8⁺CD122⁺ doppelpositiven T-Zellen eine geringere Freisetzung an IFN- γ (Abbildung 49 c), was wiederum zur vermehrten IL-17 Produktion führt. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls bei T-bet KO Mäusen gemacht, die eine erhöhte AHR und zugleich eine erhöhte IL-17 Produktion aufweisen (112). Der Beweis dafür, dass die CD8⁺ T-Zellen direkt die IL-17 Produktion beeinflussen können, kann in später durchgeführten Versuchen gezeigt werden. In diesen Versuchen werden CD4⁺ T-Zellen mit CD8⁺ T-Zellen NFATc2 defizienter Mäuse kokultiviert. Die Kokulturen, welche die CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 defizienten Mäuse beinhalten, zeigen eine höhere Produktion des Zytokins IL-17, als die gleichen CD4⁺ T-Zellen, die mit den CD8⁺ T-Zellen des Wildtyps kokultiviert wurden (Daten nicht gezeigt). Die Hypothese, dass die erhöhte CD8⁺CD122⁺ Population in den NFATc2 defizienten Mäusen eine verstärkte asthmatische Reaktion hervorruft, kann mit dem CD8⁺ T-Zelltransfer nicht vollständig bewiesen werden.

Um diese Frage zu beantworten, werden CD8⁺ T-Zellen der NFATc2 KO Mäuse in CD122⁺ und CD122⁻ mittels FACS-Sort getrennt und in SCID Mäuse zusammen mit CD4⁺ T-Zellen intraperitoneal injiziert (Abbildung 52). Die Messung der AHR ergibt ein ähnliches Bild wie in Abbildung 48. Die SCID Mäuse, welche sowohl mit CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen immunisiert werden, zeigen eine höhere AHR als Mäuse, die mit CD8⁺CD122⁻ Zellen immunisiert werden (Abbildung 53). Die Untersuchung der BAL zeigt ebenfalls eine Reduzierung von IFN- γ und Erhöhung des Eotaxins in der Mäusegruppe mit dem höheren Atemwegswiderstand. Der Anstieg des Eotaxins kann dadurch erklärt werden, dass IFN- γ in der späten Phase des Asthma bronchiale eine erniedrigte Expression des Eotaxin-Rezeptors CCR3 induziert. Dieser ist für die Entwicklung der Eosinophilen aus den hämatopoetischen Progenitorzellen verantwortlich (129). Ob nun der erhöhte Atemwegswiderstand durch den unterschiedlichen IFN- γ Level, welcher teilweise durch die regulatorische Fähigkeit der CD8⁺ CD122⁺ Zellen bedingt ist, oder durch die hohe Anzahl an CD8⁺CD122⁺CD127⁺ „long lived memory“ Zellen verursacht ist, bleibt zu klären.

5 Zusammenfassung

Im derzeitigen Verständnis spielt die Balance von Th1, Th2, Th17 und T-regulatorischen Zellen eine zentrale Rolle bei allergischen Erkrankungen, zu denen auch Asthma bronchiale gehört. Die Lymphozytensubpopulationen, welche sich aus naiven Th0 Zellen differenzieren, können die Entwicklung und Aktivierung anderer Zellarten wie z.B. Eosinophile, B-Zellen, Mastzellen als auch Becherzellen beeinflussen. Die Regulation der T-Lymphozyten wird unter anderem mittels unterschiedlicher Zytokine bzw. durch andere T-Lymphozyten gesteuert. Eine besondere Rolle bei der Regulation dieser spielen die T-regulatorischen Zellen, welche unverzichtbar bei der Kontrolle der Immunantwort sind.

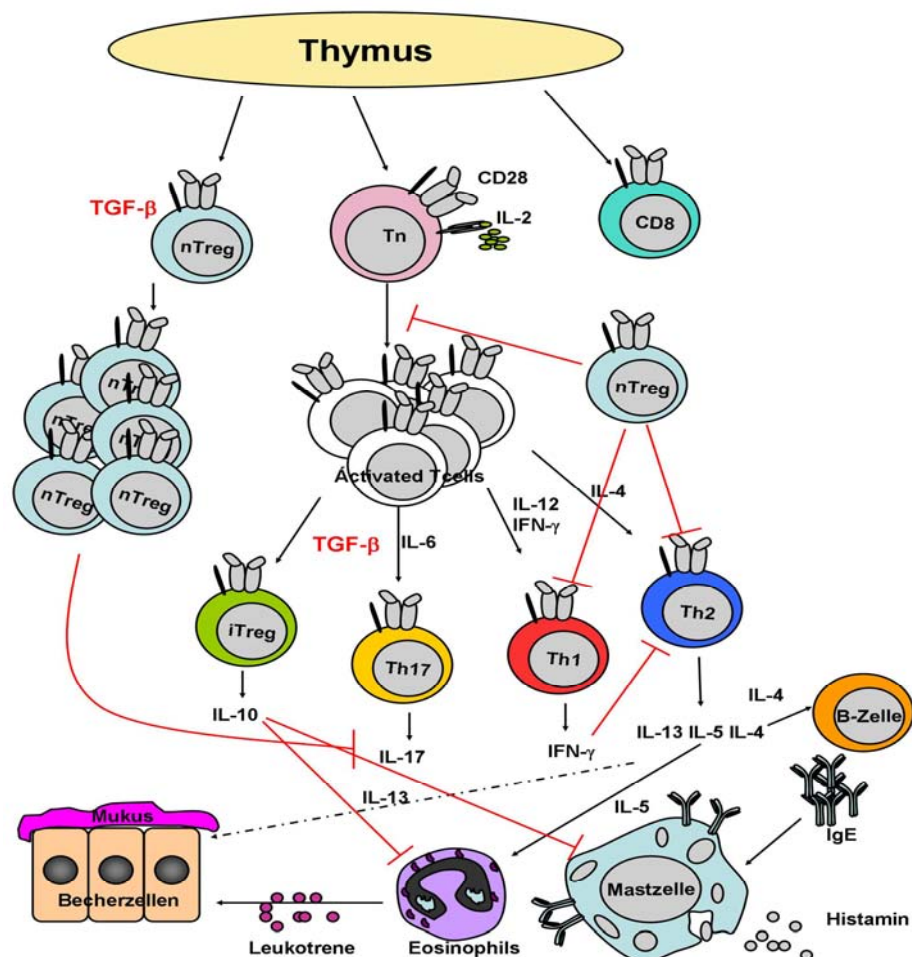


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Zell-Regulierung, die eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Asthma bronchiale spielen

In der vorliegenden Arbeit wird *in vitro* der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFATc2 (nuclear factor of activated T cells c2), welcher zur Familie der nuclear factor of activated T cells (NFAT) gehört, in Hinblick auf die asthmatische Reaktion in einem murinen Modell untersucht. In NFATc2 defizienten Mäusen, die für diese Untersuchung zur Verfügung stehen, werden, wie ebenfalls in der Literatur beschrieben, vermehrte Mengen an IgE und proinflammatorischen Zytokinen, die der Th2 Gruppe angehören (IL-4, IL-5 und IL-13) gefunden. Zwar zeigen die NFATc2 defizienten Mäuse nach einer OVA/PBS-Behandlung einen erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu den Wildtypen, dieser ist jedoch nach einer Allergendisposition nicht mehr messbar. Der Grund für die fehlende AHR kann einerseits durch die erhöhte Anzahl an T-regulatorischen Zellen bedingt sein, andererseits durch den vermehrten Level der Zytokine IL-10 und IFN- γ in den CD4+ T-Zellen. Sowohl IL-10 als auch IFN- γ können im späteren Verlauf einer Entzündung antiinflammatorische Funktionen besitzen. Grundsätzlich kann gezeigt werden, dass die Anzahl der T-regulatorischen Zellen nach einer Allergendisposition hauptsächlich in der Lunge erhöht ist. Weiterhin ist die Anzahl der Eosinophilen trotz vermehrter IL-5 Sekretion in der BALF signifikant erniedrigt, was wiederum nur durch eine direkte Hemmung dieser erklärbar ist.

Weitere durchgeführte Untersuchungen bei OVA/PBS-behandelten Tieren zeigen eine Prävalenz der NFATc2 defizienten Mäuse zu einem erhöhten Atemwegswiderstand. Diese ist durch unterschiedliche Faktoren, wie z.B. vermehrte Kollagenbildung, erhöhte Th2 Zytokin-Sekretion und verringerte IFN- γ Produktion in der Lunge bedingt. Nähere Untersuchungen der IFN- γ Produktion in der Lunge und der Milz NFATc2 defizienter Mäuse ergeben eine verringerte Freisetzung dieses Zytokins durch die CD8+ T-Zellen. Die IFN- γ Produktion wird unter anderem durch die CD8+CD122+ doppelpositiven T-regulatorischen Zellen beeinflusst, deren Anzahl in den NFATc2 KO Mäusen erhöht ist. Der Level an IFN- γ beeinflusst ebenfalls die Sekretion von IL-17 aus Th-17 CD4+ T-Zellen. Dies kann sowohl direkt mit Hilfe von Kokulturen der CD4+ und CD8+ T-Zellen, als auch durch Transfer dieser in ein SCID-Maus-Modell gezeigt werden. Auf der anderen Seite stellt sich die Frage, ob die CD8+CD122+ regulatorische Population neben dem bereits beschriebenen Einfluss auf die anderen beiden Populationen ebenso einen Einfluss auf die Th1 CD4+ T-Zellen als auch auf die Th2 CD4+ T-Zellen hat. Da

hier jedoch nur mit einer undifferenzierten CD4+ T-Zellpopulation gearbeitet wurde, kann diese Frage ohne weitere detaillierte Untersuchungen nicht beantwortet werden.

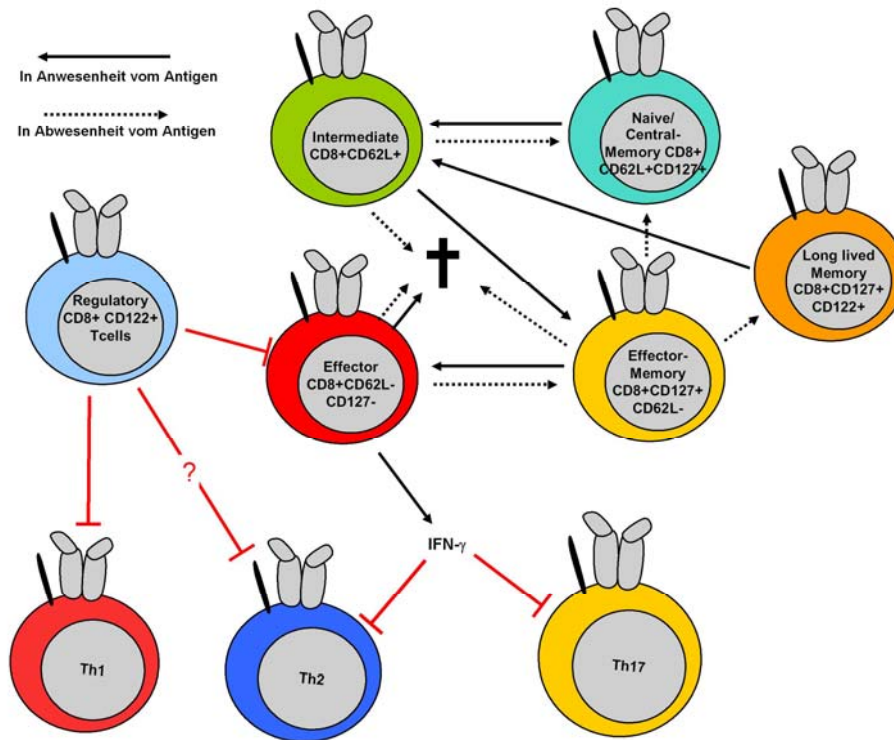


Abbildung 56: Übersicht über die unterschiedlichen CD8+ Subpopulationen und deren Wirkung auf CD4+ T-Zellen

Eine andere CD8+ Subpopulation, die ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung des Asthma bronchiale spielt und in den NFATc2 defizienten Mäusen erhöht ist, sind die CD8+CD122+CD127+ „long lived Memory“ T-Zellen. Diese können in der Anwesenheit eines Antigens zu CD8+ T-Effektorzellen umgewandelt werden und eine entzündliche Reaktion mittels einer initialen Menge an IFN- γ hervorrufen. Ob nun die Effektorzellen in den NFATc2 defizienten Mäusen über eine längere Zeit das IFN- γ freisetzen können, ist hinsichtlich der hohen CD8+ Treg Population zu bezweifeln.

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit die Vielschichtigkeit des NFATc2 Transkriptionsfaktors dargestellt werden. Einerseits ist die Defizienz des NFATc2 Gens vermehrt für proinflammatorische Faktoren wie z.B. Th2 und Th17 Zytokine als auch für CD8+ T-Effektorzellen verantwortlich, andererseits wirkt die erhöhte CD4+ Treg Population in NFATc2 defizienten Mäusen protektiv und antiinflammatorisch.

6 Literaturverzeichnis

1. The World Health Organization. <http://www.who.int/respiratory/en/>
2. Kroegel, C. 1998. Asthma bronchiale: pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*
3. Finotto, S., P.R. Galle, and M.F. Neurath. 2000. Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale. *Pneumologie* 54:412-418.
4. Busse, W., and S. Holgate. 1995. Asthma and Rhinitis. *Blackwell Scientific Publications, Cambridge*
5. Mutschler, E., and G. Geisslinger. 2001. Arzneimittelwirkungen *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*
6. Sampson, A.P., and S. Rorke. 2001. Combination therapy with anti-mediator drugs in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 31:11-17.
7. Janeway, C.A. 2002. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*
8. Zweiman, B., and L. Schwartz. 2002. Inflammatory Mechanisms in Allergic Diseases.
9. Klein, M., S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, C. Tertilt, T. Bopp, V. Heib, M. Becker, C. Taube, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2006. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J Immunol* 177:6667-6674.
10. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-142.
11. Kotloff, R.M., J. Little, and J.A. Elias. 1990. Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:497-505.
12. Sato, E., M. Haniuda, H. Numanami, T. Ushiyama, A. Tsukadaira, S. Takashi, Y. Okubo, and S. Koyama. 2002. Histamine and serotonin stimulate eotaxin production by a human lung fibroblast cell line. *Int Arch Allergy Immunol* 128 Suppl 1:12-17.
13. Doganci, A., T. Eigenbrod, N. Krug, G.T. De Sanctis, M. Hausding, V.J. Erpenbeck, B. Haddad el, H.A. Lehr, E. Schmitt, T. Bopp, K.J. Kallen, U. Herz, S. Schmitt, C. Luft, O. Hecht, J.M. Hohlfeld, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, H. Renz, M.F. Neurath, P.R. Galle, and S. Finotto. 2005. The IL-6R alpha chain controls

- lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 115:313-325.
14. Sibille, Y., and F.X. Marchandise. 1993. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J* 6:1529-1543.
 15. Ferretti, S., O. Bonneau, G.R. Dubois, C.E. Jones, and A. Trifilieff. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106-2112.
 16. Robinson, D.S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A.M. Bentley, C. Corrigan, S.R. Durham, and A.B. Kay. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326:298-304.
 17. Perkins, D., Z. Wang, C. Donovan, H. He, D. Mark, G. Guan, Y. Wang, T. Walunas, J. Bluestone, J. Listman, and P.W. Finn. 1996. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol* 156:4154-4159.
 18. Lane, P., C. Haller, and F. McConnell. 1996. Evidence that induction of tolerance in vivo involves active signaling via a B7 ligand-dependent mechanism: CTLA4-Ig protects V beta 8+ T cells from tolerance induction by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Eur J Immunol* 26:858-862.
 19. Abbas, A.K. 2005. Cellular and Molecular Immunology.
 20. Chen, Y.Q., and H.Z. Shi. 2006. CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy* 61:15-26.
 21. Finotto, S., M.F. Neurath, J.N. Glickman, S. Qin, H.A. Lehr, F.H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P.R. Galle, S.J. Szabo, J.M. Drazen, G.T. De Sanctis, and L.H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
 22. Yamashita, N., H. Tashimo, H. Ishida, Y. Matsuo, H. Tamauchi, M. Terashima, I. Yoshiwara, S. Habu, and K. Ohta. 2006. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L1045-1051.
 23. Finotto, S., G.T. De Sanctis, H.A. Lehr, U. Herz, M. Buerke, M. Schipp, B. Bartsch, R. Atreya, E. Schmitt, P.R. Galle, H. Renz, and M.F. Neurath. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* 193:1247-1260.

24. Temann, U.A., Y. Laouar, E.E. Eynon, R. Homer, and R.A. Flavell. 2007. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol* 19:1-10.
25. Xystrakis, E., S. Kusumakar, S. Boswell, E. Peek, Z. Urry, D.F. Richards, T. Adikibi, C. Pridgeon, M. Dallman, T.K. Loke, D.S. Robinson, F.J. Barrat, A. O'Garra, P. Lavender, T.H. Lee, C. Corrigan, and C.M. Hawrylowicz. 2006. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 116:146-155.
26. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
27. Dragon, S., M.S. Rahman, J. Yang, H. Unruh, A.J. Halayko, and A.S. Gounni. 2007. IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1023-1029.
28. Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska. 2003. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 97:726-733.
29. Schnyder-Candrian, S., D. Togbe, I. Couillin, I. Mercier, F. Brombacher, V. Quesniaux, F. Fossiez, B. Ryffel, and B. Schnyder. 2006. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 203:2715-2725.
30. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo. 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*
31. Noble, A., A. Giorgini, and J.A. Leggat. 2006. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 107:4475-4483.
32. Foulds, K.E., M.J. Rotte, and R.A. Seder. 2006. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 177:2565-2574.
33. Hawrylowicz, C.M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 202:1459-1463.
34. Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 204:239-243.
35. Bopp, T., A. Palmeshofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2005. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play

- a crucial role in suppression of CD4⁺ T lymphocytes by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:181-187.
36. Hohler, T., E. Reuss, P. Adams, B. Bartsch, B. Weigmann, M. Worns, P.R. Galle, A. Victor, and M.F. Neurath. 2005. A genetic basis for IFN-gamma production and T-bet expression in humans. *J Immunol* 175:5457-5462.
 37. Coyle, A.J., S. Tsuyuki, C. Bertrand, S. Huang, M. Aguet, S.S. Alkan, and G.P. Anderson. 1996. Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 156:2680-2685.
 38. ten Hacken, N.H., Y. Oosterhoff, H.F. Kauffman, L. Guevarra, T. Satoh, D.J. Tollerud, and D.S. Postma. 1998. Elevated serum interferon-gamma in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation. *Eur Respir J* 11:312-316.
 39. Das, G., S. Sheridan, and C.A. Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. *J Immunol* 167:2004-2010.
 40. Korsgren, M. 2002. NK cells and asthma. *Curr Pharm Des* 8:1871-1876.
 41. Timonen, T., and B. Stenius-Aarniala. 1985. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol* 59:85-90.
 42. Korsgren, M., C.G. Persson, F. Sundler, T. Bjerke, T. Hansson, B.J. Chambers, S. Hong, L. Van Kaer, H.G. Ljunggren, and O. Korsgren. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 189:553-562.
 43. Medzhitov, R., and C.A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
 44. Das, J., P. Eynott, R. Jupp, A. Bothwell, L. Van Kaer, Y. Shi, and G. Das. 2006. Natural killer T cells and CD8⁺ T cells are dispensable for T cell-dependent allergic airway inflammation. *Nat Med* 12:1345-1346; author reply 1347.
 45. Miyahara, N., B.J. Swanson, K. Takeda, C. Taube, S. Miyahara, T. Kodama, A. Dakhama, V.L. Ott, and E.W. Gelfand. 2004. Effector CD8⁺ T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nat Med* 10:865-869.
 46. Krug, N., V.J. Erpenbeck, K. Balke, J. Petschallies, T. Tschernig, J.M. Hohlfeld, and H. Fabel. 2001. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage-derived CD4(+), CD8(+), and

- gammadelta T cells in people with asthma after segmental allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:125-131.
47. Wells, J.W., C.J. Cowled, A. Giorgini, D.M. Kemeny, and A. Noble. 2007. Regulation of allergic airway inflammation by class I-restricted allergen presentation and CD8 T-cell infiltration. *J Allergy Clin Immunol* 119:226-234.
 48. Holmes, B.J., P.A. MacAry, A. Noble, and D.M. Kemeny. 1997. Antigen-specific CD8+ T cells inhibit IgE responses and interleukin-4 production by CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 27:2657-2665.
 49. Holmes, B.J., P.A. MacAry, and D.M. Kemeny. 1997. Depletion of CD8+ T cells following primary immunization with ovalbumin results in a high and persistent IgE response. *Int Arch Allergy Immunol* 113:160-162.
 50. Park, J., A. Takeuchi, and S. Sharma. 1996. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J Biol Chem* 271:20914-20921.
 51. Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472-484.
 52. Serfling, E., S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, T. Bopp, M. Stassen, and E. Schmitt. 2006. NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 36:2837-2843.
 53. Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20:2476-2489.
 54. Jain, J., P.G. McCaffrey, V.E. Valge-Archer, and A. Rao. 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356:801-804.
 55. Bodor, J., and J.F. Habener. 1998. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *J Biol Chem* 273:9544-9551.
 56. Avni, O., D. Lee, F. Macian, S.J. Szabo, L.H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 3:643-651.
 57. Yoshida, H., H. Nishina, H. Takimoto, L.E. Marengere, A.C. Wakeham, D. Bouchard, Y.Y. Kong, T. Ohteki, A. Shahinian, M. Bachmann, P.S. Ohashi, J.M. Penninger, G.R.

- Crabtree, and T.W. Mak. 1998. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8:115-124.
58. Hodge, M.R., A.M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4:397-405.
59. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
60. Rao, A., and O. Avni. 2000. Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br Med Bull* 56:969-984.
61. Ansel, K.M., R.J. Greenwald, S. Agarwal, C.H. Bassing, S. Monticelli, J. Interlandi, I.M. Djuretic, D.U. Lee, A.H. Sharpe, F.W. Alt, and A. Rao. 2004. Deletion of a conserved Il4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol* 5:1251-1259.
62. Agarwal, S., O. Avni, and A. Rao. 2000. Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* 12:643-652.
63. Monticelli, S., and A. Rao. 2002. NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur J Immunol* 32:2971-2978.
64. Viola, J.P., A. Kiani, P.T. Bozza, and A. Rao. 1998. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 91:2223-2230.
65. Mowen, K.A., and L.H. Glimcher. 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* 202:203-222.
66. Teixeira, L.K., B.P. Fonseca, A. Vieira-de-Abreu, B.A. Barboza, B.K. Robbs, P.T. Bozza, and J.P. Viola. 2005. IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol* 175:5931-5939.
67. Monticelli, S., D.C. Solymar, and A. Rao. 2004. Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells. *J Biol Chem* 279:36210-36218.
68. Richter, M., S.J. Ray, T.J. Chapman, S.J. Austin, J. Rebhahn, T.R. Mosmann, H. Gardner, V. Kotlianski, A.R. deFougerolles, and D.J. Topham. 2007. Collagen distribution and expression of collagen-binding alpha1beta1 (VLA-1) and alpha2beta1 (VLA-2) integrins on CD4 and CD8 T cells during influenza infection. *J Immunol* 178:4506-4516.

69. Hausding, M., R. Karwot, P. Scholtes, H.A. Lehr, M. Wegmann, H. Renz, P.R. Galle, M. Birkenbach, M.F. Neurath, R.S. Blumberg, and S. Finotto. 2007. Lung CD11c(+) cells from mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI-3) prevent airway hyper-responsiveness in experimental asthma. *Eur J Immunol* 37:1663-1677.
70. Hausding, M., I.C. Ho, H.A. Lehr, B. Weigmann, C. Lux, M. Schipp, P.R. Galle, and S. Finotto. 2004. A stage-specific functional role of the leucine zipper transcription factor c-Maf in lung Th2 cell differentiation. *Eur J Immunol* 34:3401-3412.
71. Ramirez-Icaza, G., K.A. Mohammed, N. Nasreen, R.D. Van Horn, J.A. Hardwick, K.L. Sanders, J. Tian, C. Ramirez-Icaza, M.T. Johnson, and V.B. Antony. 2004. Th2 cytokines IL-4 and IL-13 downregulate paxillin expression in bronchial airway epithelial cells. *J Clin Immunol* 24:426-434.
72. Cho, S.H., L.A. Stanciu, S.T. Holgate, and S.L. Johnston. 2005. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171:224-230.
73. Ranger, A.M., M.J. Grusby, M.R. Hodge, E.M. Gravallesse, F.C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H.S. Baldwin, and L.H. Glimcher. 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392:186-190.
74. Olivenstein, R., R. Taha, E.M. Minshall, and Q.A. Hamid. 1999. IL-4 and IL-5 mRNA expression in induced sputum of asthmatic subjects: comparison with bronchial wash. *J Allergy Clin Immunol* 103:238-245.
75. Kiani, A., J.P. Viola, A.H. Lichtman, and A. Rao. 1997. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7:849-860.
76. Viola, J.P., and A. Rao. 1997. Role of the cyclosporin-sensitive transcription factor NFAT1 in the allergic response. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2:147-155.
77. Zeibecoglou, K., S. Ying, Q. Meng, A.B. Kay, D.S. Robinson, and N. Papageorgiou. 2000. Expression of eotaxin in induced sputum of atopic and nonatopic asthmatics. *Allergy* 55:1042-1048.
78. Thivierge, M., M. Doty, J. Johnson, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2000. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165:5221-5226.

79. Yamaguchi, Y., Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, T. Kasahara, S. Kitamura, M. Torisu, S. Mita, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1988. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167:1737-1742.
80. Ranger, A.M., L.C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E.M. Gravallesse, M.J. Glimcher, and L.H. Glimcher. 2000. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191:9-22.
81. Reinhardt, A.K., S.E. Bottoms, G.J. Laurent, and R.J. McNulty. 2005. Quantification of collagen and proteoglycan deposition in a murine model of airway remodelling. *Respir Res* 6:30.
82. Andrews, A.L., J.W. Holloway, S.T. Holgate, and D.E. Davies. 2006. IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *J Immunol* 176:7456-7461.
83. Webb, D.C., Y. Cai, K.I. Matthaei, and P.S. Foster. 2007. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function. *J Immunol* 178:219-227.
84. Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593-2603.
85. Nakae, S., Y. Iwakura, H. Suto, and S.J. Galli. 2007. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 81:1258-1268.
86. Liu, X.K., X. Lin, and S.L. Gaffen. 2004. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J Biol Chem* 279:52762-52771.
87. Rengarajan, J., K.A. Mowen, K.D. McBride, E.D. Smith, H. Singh, and L.H. Glimcher. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195:1003-1012.

-
88. Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*
 89. Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335.
 90. Marhaba, R., P. Freyschmidt-Paul, and M. Zoller. 2006. In vivo CD44-CD49d complex formation in autoimmune disease has consequences on T cell activation and apoptosis resistance. *Eur J Immunol* 36:3017-3032.
 91. Finotto, S., M. Hausding, A. Doganci, J.H. Maxeiner, H.A. Lehr, C. Luft, P.R. Galle, and L.H. Glimcher. 2005. Asthmatic changes in mice lacking T-bet are mediated by IL-13. *Int Immunol* 17:993-1007.
 92. Lim, L.C., M.N. Fiordalisi, J.L. Mantell, J.L. Schmitz, and J.D. Folds. 1998. A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:392-398.
 93. Ikarashi, Y., A. Iizuka, Y. Heike, M. Yoshida, Y. Takaue, and H. Wakasugi. 2005. Cytokine production and migration of in vitro-expanded NK1.1(-) invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells using alpha-galactosylceramide and IL-2. *Immunol Lett* 101:160-167.
 94. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201:737-746.
 95. Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061-1067.
 96. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172:834-842.
 97. Fantini, M.C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P.R. Galle, and M.F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153.

98. Fuss, I.J., M. Boirivant, B. Lacy, and W. Strober. 2002. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* 168:900-908.
99. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
100. Levings, M.K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban, and M.G. Roncarolo. 2002. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196:1335-1346.
101. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
102. Khattri, R., T. Cox, S.A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
103. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
104. Caetano, M.S., A. Vieira-de-Abreu, L.K. Teixeira, M.B. Werneck, M.A. Barcinski, and J.P. Viola. 2002. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *Faseb J* 16:1940-1942.
105. Antunez, C., M.J. Torres, C. Mayorga, J.L. Corzo, A. Jurado, L.F. Santamaria-Babi, A. Vera, and M. Blanca. 2006. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 17:166-174.
106. Bellinghausen, I., B. Klostermann, J. Knop, and J. Saloga. 2003. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 111:862-868.
107. Cottrez, F., S.D. Hurst, R.L. Coffman, and H. Groux. 2000. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 165:4848-4853.
108. Suto, A., H. Nakajima, S.I. Kagami, K. Suzuki, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2001. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 164:680-687.

109. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
110. Gavin, M.A., S.R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33-41.
111. Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
112. Fujiwara, M., K. Hirose, S. Kagami, H. Takatori, H. Wakashin, T. Tamachi, N. Watanabe, Y. Saito, I. Iwamoto, and H. Nakajima. 2007. T-bet inhibits both TH2 cell-mediated eosinophil recruitment and TH17 cell-mediated neutrophil recruitment into the airways. *J Allergy Clin Immunol* 119:662-670.
113. Wu, C., G. Yang, L.G. Bermudez-Humaran, Q. Pang, Y. Zeng, J. Wang, and X. Gao. 2006. Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int Immunopharmacol* 6:610-615.
114. Probst, H.C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6:280-286.
115. Kaech, S.M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415-422.
116. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
117. Cyster, J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102.
118. Ruscetti, F.W. 1988. Interleukin 2 receptor: two distinct proteins bind interleukin 2. *Year Immunol* 3:129-137.
119. Endharti, A.T., I.M.s. Rifa, Z. Shi, Y. Fukuoka, Y. Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, and H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 175:7093-7097.

120. Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, and H. Suzuki. 2004. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 200:1123-1134.
121. Matsuda, J.L., T.C. George, J. Hagman, and L. Gapin. 2007. Temporal dissection of T-bet functions. *J Immunol* 178:3457-3465.
122. Huster, K.M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K.M. Kerksiek, H. Wagner, and D.H. Busch. 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5610-5615.
123. Bachmann, M.F., P. Wolint, K. Schwarz, P. Jager, and A. Oxenius. 2005. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* 175:4686-4696.
124. Shedlock, D.J., and H. Shen. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300:337-339.
125. Khanolkar, A., M.J. Fuller, and A.J. Zajac. 2004. CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation. *J Immunol* 172:2834-2844.
126. Schaller, M.A., S.K. Lundy, G.B. Huffnagle, and N.W. Lukacs. 2005. CD8+ T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. *Eur J Immunol* 35:2061-2070.
127. Waldmann, T.A. 2002. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J Clin Immunol* 22:51-56.
128. Ruckert, R., K. Brandt, A. Braun, H.G. Hoymann, U. Herz, V. Budagian, H. Durkop, H. Renz, and S. Bulfone-Paus. 2005. Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo. *J Immunol* 174:5507-5515.
129. Lamkhioued, B., S.G. Abdelilah, Q. Hamid, N. Mansour, G. Delespesse, and P.M. Renzi. 2003. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells. *J Immunol* 170:537-547.

7 Danksagung