

Evaluation eines humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Helen Martin

geb. am 16. Juni 1982 in Limburg an der Lahn

Mainz, den 15.03.2012

Aus der

III. Medizinischen Klinik

Schwerpunkt Pneumologie

Universitätsmedizin Mainz

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der Promotion

22.06.2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mitsamt den Ergebnissen selbstständig verfasst und erarbeitet habe und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe.

Mainz, den

(Helen Martin)

Eigene Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

CD4-mediated regulatory T-cell activation inhibits the development of disease in a humanized mouse model of allergic airway disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011, in press, available online.

Martin H, Reuter S, Dehzad N, Heinz A, Bellinghausen I, Saloga J, Haasler I, Korn S, Jonuleit H, Buhl R, Becker C, Taube C.

Weitere Publikationen

Enhanced production of CCL18 by tolerogenic IL-10-treated dendritic cells is associated with recruitment of regulatory T cells and inhibition of allergic airway reactivity. *Zur Veröffentlichung eingereicht im Journal of Allergy and Clinical Immunology.*

Bellinghausen I, Reuter S, **Martin H**, Maxeiner J, Luxemburger u, Türeci Ö, Grabbe S, Taube C, Saloga J.

Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2011 Aug 1;121(8):3088-93.

Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, **Martin H**, Becher B, Taube C, Müller A.

Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *Journal of Immunology* 2011 Feb 15; 186(4):2238-44.

Dehzad N, Bopp T, Reuter S, Klein M, **Martin H**, Ulges A, Stassen M, Schild H, Buhl R, Schmitt E, Taube C.

Mast cells induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease. *International Archives of Allergy and Immunology* 2010 151(3):214-22.

Reuter S, Dehzad N, **Martin H**, Heinz A, Castor T, Sudowe S, Reske-Kunz AB, Stassen M, Buhl R, Taube C.

Aktive Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen:

September 2011 Die CD4-vermittelte Aktivierung regulatorischer T-Zellen vermindert AHR und Atemwegsentzündung in einem humanisierten Mausmodell des allergischen Asthmas.

6. Deutscher Allergiekongress, Wiesbaden

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

Mai 2011 Reduction of pulmonary inflammation through HIV-1 envelope protein gp120 in a humanized mouse model of allergic asthma depends on regulatory T cells.

American Thoracic Society, Denver, Colorado, USA

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

März 2011 Gp120 vermindert AHR und Atemwegsentzündung in einem humanisierten Mausmodell des allergischen Asthmas.

Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, Mainz

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

November 2010 Gp120 reduces AHR and airway inflammation in a humanized mouse model of allergic asthma through activation of regulatory T cells.

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Berlin

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

September 2010 Treatment with gp120 reduces AHR and airway inflammation in a humanized mouse model of asthma bronchiale.

European Respiratory Society, Barcelona, Spanien

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

Juni 2010 Effects of gp120 on pulmonary inflammation using a humanized mouse model of allergic airway disease.

Pneumologie update, Innsbruck, Österreich

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, I. Haasler, S. Korn, H. Jonuleit, R. Buhl, C. Becker, C. Taube

Mai 2010 Analysis of pulmonary inflammation using humanized mouse models.

American Thoracic Society, New Orleans, Louisiana, USA

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, C. Becker, R. Buhl, C. Taube

März 2010 Evaluation eines humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegserkrankung in NOD/Scid γ c defizienten Tieren.

Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, Mainz

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, C. Becker, R. Buhl, C. Taube

September 2009 Evaluation eines humanisierten Mausmodells des Asthma bronchiale.

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Borstel

H. Martin, S. Reuter, N. Dehzad, A. Heinz, I. Bellinghausen, J. Saloga, C. Becker, R. Buhl, C. Taube

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	2
1.1.1.1 Dendritische Zellen (DCs).....	3
1.1.1.2 Makrophagen.....	3
1.1.1.3 Eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten.....	4
1.1.1.4 Mastzellen.....	5
1.1.1.5 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen).....	6
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	7
1.1.2.1 T-Lymphozyten.....	7
1.1.2.2 B-Lymphozyten.....	9
1.2 Allergie und Asthma.....	10
1.2.1 Asthma – Heterogenität und Ursachen.....	10
1.2.2 Allergisches Asthma – Charakterisierung und Pathogenese.....	12
1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs).....	15
1.4 Tregs als therapeutischer Ansatz in der Behandlung des allergischen Asthmas.....	18
1.5 Humanes Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) - Hüllprotein gp120.....	21
1.6 Humanisierte Mausmodelle.....	24
1.7 Ziele der vorliegenden Dissertation.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Laborgeräte.....	27
2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien.....	32
2.1.4 Enzyme.....	35

2.1.5	Histologische Reagenzien.....	35
2.1.6	Zellseparationsantikörper.....	35
2.1.7	Humane Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	36
2.1.8	Antikörper und Standard für den Zytokin-ELISA	37
2.1.9	Puffer, Medien und Zusätze.....	38
2.1.9.1	Zellkultur.....	38
2.1.9.2	Organpräparation, Zellaufarbeitung.....	39
2.1.9.3	Zusammensetzung der Lysepuffer	39
2.1.9.4	Zusammensetzung der Puffer für ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)	40
2.1.9.5	Zusammensetzung der Puffer für die Blutreinigung	41
2.1.9.6	Magnetische Zellseparation	41
2.1.9.7	Puffer für die Durchflusszytometrie	41
2.1.9.8	Puffer für die Histologie	42
2.1.10	Antikörper für die polyklonale Stimulation von T-Zellen	42
2.1.11	Allergene.....	42
2.2	Methoden.....	43
2.2.1	Patienten und Blutentnahme.....	43
2.2.2	Zellbiologische Methoden	44
2.2.2.1	Gewinnung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll.....	44
2.2.2.2	Ermittlung der Lebendzellzahl	45
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	46
2.2.2.4	Separation von CD4 ⁺ Zellen mit magnetischen Beads.....	46
2.2.2.5	Generierung von dendritischen Zellen (DCs)	48
2.2.2.6	Proliferationsassay	49
2.2.2.7	Depletion von Zellpopulationen mit Dynabeads	50
2.2.3	Experimentelle Abläufe	51

2.2.3.1	NOD-Scid	51
2.2.3.2	NOD-Scid γ c.....	51
2.2.4	Behandlung mit gp120	52
2.2.5	Intranasale Provokation der Atemwege – Betäubung mit Forene.....	52
2.2.6	Narcoren-Gebrauchslösung.....	53
2.2.7	Zelltransfer in immundefiziente Mausstämme.....	53
2.2.8	Lungenfunktion	53
2.2.8.1	Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem FlexiVent-System.....	54
2.2.8.2	Praktischer Ablauf der Lungenfunktionsmessung	55
2.2.9	Mauspräparation	57
2.2.9.1	Aufarbeitung des Blutes	57
2.2.9.2	Gey´sche Lyse	58
2.2.9.3	Aufarbeitung der Milz	58
2.2.9.4	Gewinnung der bronchoalveolären Lavarge (BAL).....	59
2.2.9.5	Aufarbeitung der Lunge.....	59
2.2.10	Differenzierung der BAL-Zellen - Anfertigung von Zytospins	60
2.2.11	Zytokin-ELISA	61
2.2.12	Durchflusszytometrie	62
2.2.12.1	Extrazelluläre FACS-Färbung	63
2.2.12.2	Intrazelluläre FACS-Färbung.....	64
2.2.13	Histologie	65
2.2.13.1	Fixierung der Gewebe	65
2.2.13.2	Einbetten der Organe	65
2.2.13.3	Herstellung von Gewebeschnitten.....	66
2.2.13.4	Entparaffinierung der Gewebeschnitte	66
2.2.13.5	Histologische Färbungen.....	66
2.2.14	Mäuse	68
2.2.15	Statistische Analyse.....	69

2.2.16 Software.....	69
3. Ergebnisse.....	70
3.1 Analyse der mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten PBMCs	70
3.2 Etablierung des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid Mäusen.....	72
3.2.1 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid Mäusen	72
3.2.1.1 Analyse der Lungenfunktion in NOD-Scid Mäusen	72
3.2.1.2 Untersuchung der bronchoalveolären Lavage (BAL).....	74
3.2.1.3 Analyse der humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid Tiere...	76
3.2.2 Detektion humaner Zellen in weiteren Organen humanisierter NOD-Scid Tiere.....	79
3.2.2.1 Detektion humaner CD45 ⁺ 3 ⁺ Zellen im Blut der humanisierten NOD-Scid Tiere	79
3.2.2.2 Detektion humaner CD45 ⁺ Zellen in den Milzen humanisierter NOD-Scid Tiere	80
3.2.3 Effekte von gp120 in dem etablierten humanisierten Modell der allergischen Atemwegsentzündung	82
3.3 Etablierung des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid γ c Mäusen	84
3.3.1 NOD-Scid γ c Mäuse entwickeln eine GvHD nach Transfer von 80×10^6 PBMCs.....	84
3.3.2 Evaluation der adäquaten Zellzahl für das Modell der allergischen Atemwegsentzündung im NOD-Scid γ c Stamm	86
3.3.3 Messung des ALT-Spiegels als weiteres Ausschlusskriterium einer GvHD im NOD-Scid γ c Stamm.....	88
3.3.4 Evaluation der geeigneten Transferbedingungen für das humanisierte Asthmodell in NOD-Scid γ c Mäusen	89
3.3.5 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid γ c Mäusen	89

3.3.5.1	Analyse der Lungenfunktion im NOD-Scid γ_c Stamm	89
3.3.5.2	Untersuchung der BAL in humanisierten NOD-Scid γ_c	91
3.3.5.3	Analyse der humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid γ_c	93
3.3.6	Nachweis humaner Zellen in weiteren Geweben von NOD-Scid γ_c Tieren	95
3.3.7	Restimulation der humanen CD4 ⁺ T-Zellen aus den Milzen der NOD- Scid γ_c Mäuse.....	95
3.3.8	Zytokinmuster der humanen CD4 ⁺ T-Zellen.....	98
3.3.9	Nach der intranasalen Provokation der Atemwege mit PBS bleibt die Entwicklung einer AHR aus und die Frequenzen der humanen Zellen in der Lunge sind reduziert	98
3.3.10	Welche T-Zell-Subpopulation ist für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung verantwortlich?	100
3.3.11	Gp120-vermittelte Reduktion der Atemwegsinflammation	103
3.3.12	Sind die Effekte des gp120 auf regulatorische T-Zellen zurückzuführen?	105
4.	Diskussion	109
4.1	Evaluation eines humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in immundefizienten NOD-Scid und NOD-Scid γ_c Mäusen.....	110
4.2	NOD-Scid Mäuse und NOD-Scid γ_c , die mit PBMCs atopischer Spender transferiert wurden entwickeln eine allergische Atemwegsentzündung nach intranasaler Provokation der Atemwege.....	112
4.3	Die Gabe von humanem IL-4 in Kombination mit Birkenallergen verursacht eine starke pulmonale Entzündung nach Transfer atopischer PBMCs.....	113
4.4	Das evaluierte Modell ist von humanen T-Zellen abhängig	115
4.5	Humane CD4 ⁺ T-Zellen sind für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung verantwortlich	117
4.6	Die aus der Behandlung mit gp120 resultierende Reduktion der allergischen Atemwegsinflammation ist auf die Aktivierung von Tregs zurückzuführen .	119

5. Zusammenfassung	122
6. Abstract.....	124
7. Literaturverzeichnis	126
8. Abkürzungsverzeichnis.....	141
9. Lebenslauf	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Treg-vermittelten Immunsuppression durch cAMP nach Ligation von gp120 mit CD4.	23
Abbildung 2:	Isolierung humaner PBMCs mit Ficoll	45
Abbildung 3:	Experimenteller Ablauf der Humanisierung des NOD-Scid Stammes.	51
Abbildung 4:	Experimenteller Ablauf der Humanisierung des NOD-Scid γ c Stammes.	52
Abbildung 5:	FACS-Analyse der humanen Zellen nach Isolierung aus dem Blut von Probanden mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD45, CD14, CD56, CD15, CD19, CD3, CD4 und CD8.	71
Abbildung 6:	Messung der Lungenfunktion unter ansteigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin. Die i.p. Gabe von PBMCs allergischer Spender und folgende i.n. Provokation der Atemwege führt zu AHR in NOD-Scid Mäusen.	73
Abbildung 7:	Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholinkonzentration. Nach intraperitonealer Injektion von PBMCs nicht-allergischer Spender und folgender nasaler Allergenprovokation bleibt die Entwicklung einer AHR aus.	74
Abbildung 8:	Absolute Anteile verschiedener Zellsubpopulationen in der BAL humanisierter NOD-Scid Mäuse. Der Transfer von 80×10^6 PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 erhöht den Einstrom muriner Makrophagen in die Lunge.	75
Abbildung 9:	Absolute Anteile eosinophiler und neutrophiler Granulozyten in der BAL humanisierter NOD-Scid Mäuse. Die Injektion allergischer PBMCs mit Birke und IL-4 erhöht die Anzahl an Granulozyten.	76
Abbildung 10:	FACS-Analyse homogenisierter Lungensektionen humanisierter Mäuse mit humanen Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD45, CD14, CD56, CD15, CD19, CD3, CD4 und CD8.	77

-
- Abbildung 11: Die zusätzliche Gabe von IL-4 und Birke steigert den Einstrom humaner CD45⁺ Zellen in das Lungengewebe humanisierter NOD-Scid Mäuse. 78
- Abbildung 12: Frequenzen humaner CD45/3 doppelt positiver Zellen im Blut humanisierter NOD-Scid Mäuse. Die additive Gabe des Allergens Birke und IL-4 verstärkt die Frequenz humaner Zellen im Blut der humanisierten Mäuse. 80
- Abbildung 13: FACS-Analyse der humaner CD45/3⁺ Zellen in den Milzen humanisierter NOD-Scid Mäuse. 81
- Abbildung 14: Die Behandlung mit gp120 vermindert AHR und Einstrom von Makrophagen in den bronchoalveolären Raum und reduziert die Frequenzen humaner T-Zellen in den Lungen humanisierter NOD-Scid Tiere. 83
- Abbildung 15: Vergleich der Frequenzen humaner T-Zellen in NOD-Scid und NOD-Scid γ c Lungen nach Gabe von 80×10^6 PBMCs mittels FACS-Färbung mit Antikörpern gegen humanes CD3, CD4 und CD8. 85
- Abbildung 16: Titration der PBMCs nicht-allergischer Spender vor Transfer in NOD-Scid γ c Mäuse. Nach Transfer von 5×10^6 PBMCs ist keine GvH-Symptomatik mehr detektierbar. 87
- Abbildung 17: Erfassung der ALT-Spiegel humanisierter Mäuse als Ausschlusskriterium einer GvH-Reaktion. Nach dem Transfer von 5×10^6 PBMCs können keine Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrolltieren und PBMC-transferierten Mäusen detektiert werden. 88
- Abbildung 18: Analyse der Lungenfunktion in Mäusen des NOD-Scid γ c Stammes nach Gabe der PBMCs unter verschiedenen Transferbedingungen. Mäuse, die mit PBMCs atopischer Spender rekonstituiert wurden, entwickeln eine AHR. 90

- Abbildung 19: Quantifizierung der BAL-Zellen nach Transfer von 5×10^6 PBMCs in NOD-Scid γc Mäuse. Aus dem Transfer der humanen Zellen atopischer Spender mit Birke und IL-4 resultiert eine erhöhte Zellfrequenz im bronchoalveolären Raum..... 92
- Abbildung 20: Nach der Gabe atopischer PBMCs kommt es nach i.n. Provokation zum erhöhten Einstrom humaner Zellen in die Lungen von NOD-Scid γc Mäusen. 94
- Abbildung 21: Restimulation der humanen $CD4^+$ T-Zellen isoliert aus NOD-Scid γc Mäusen mit autologen humanen DCs. Die höchste Proliferationsrate ist nach Restimulation der humanen $CD4^+$ T-Zellen aus den Mäusen, die unter additiver Gabe von Birke und IL-4 humanisiert wurden, mit Birken-beladenen DCs detektierbar. 97
- Abbildung 22: Nach i.n. Behandlung mit PBS ist keine Atemwegsinflammation nachweisbar. 99
- Abbildung 23: FACS-Analyse der $CD3^-$, 4^- und 8^- -depletierten PBMCs. Die Depletion führt zu einem vollständigen Verlust der jeweiligen Zellpopulation aus der PBMC-Fraktion..... 100
- Abbildung 24: Die Depletion von $CD3^+$ und $CD4^+$ T-Zellen aus den PBMCs vor Transfer hebt die Entzündung in der Lunge auf. 102
- Abbildung 25: Eine Behandlung mit gp120 vermindert die allergen-induzierte Atemwegsinflammation. 104
- Abbildung 26: FACS-Analyse der PBMCs nach Depletion von Tregs aus dem Blut allergischer Spender mit Antikörpern gegen die humanen Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie das intrazelluläre Protein Foxp3. Die Depletion eliminiert $CD25^{\text{hoch}}$ - sowie Foxp3-exprimierende Zellen..... 105
- Abbildung 27: Die Depletion der Tregs vor Transfer in NOD-Scid γc Mäuse hebt die antiinflammatorische Wirkung des gp120 auf..... 107
- Abbildung 28: Reduktion der humanen $CD4^+$ T-Zellen in den Lungen PBMC-transferierter NOD-Scid γc nach Applikation von gp120..... 108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte	27
Tabelle 2:	Labor- und Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien	32
Tabelle 4:	Enzyme	35
Tabelle 5:	Histologische Reagenzien	35
Tabelle 6:	Zellseparationsantikörper	35
Tabelle 7:	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 8:	Antikörper für den Zytokin-ELISA	37
Tabelle 9:	Totales und Birken-spezifisches IgE der Birkenpollenallergiker	43
Tabelle 10:	Analyseprogramme	69

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk aus zahlreichen zellulären und molekularen Komponenten zum Schutze des eigenen Körpers vor Pathogenen dar. Das Abwehrsystem der Vertebraten gliedert sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem. Diese haben sich im Laufe der Evolution in Anpassung an eine sich wandelnde Umwelt stets weiterentwickelt. Die auf Mustererkennung basierende angeborene Immunität ist bereits bei Invertebraten vorzufinden (1). Sie entstand aus phylogenetischer Sicht sehr früh und viele der Mechanismen der angeborenen Immunität sind zwischen niederen und höheren Spezies genetisch konserviert (2). Beispielsweise verfügt das Nesseltier Hydra, eines der einfachen multizellulären Organismen, über komplexe zellbasierte Abwehrmechanismen. Die Epithelzellen des Nesseltieres bilden antimikrobielle Peptide, die pathogene Infektionen vorbeugen (3).

Das Immunsystem schützt den Körper durch die Erkennung von fremden potentiell schädlichen Eindringlingen. Darüber hinaus überwacht es die eigenen Körpergewebe. Daraus resultiert entweder Toleranz oder die Erkennung und Beseitigung entarteter oder virusinfizierter Zellen.

Trotz hochentwickelter Immunkompetenz ist der Mensch immer neuen Bedrohungen aus der Umwelt ausgesetzt. Dazu gehören multiresistente Bakterienstämme und Viren. Ein zusätzliches Problem sind Überempfindlichkeitsreaktionen gegen harmlose Antigene aus der Umwelt, die z.B. in Form des Asthmas oder des anaphylaktischen Schocks auch lebensgefährlich sein können. Die steigende Anzahl dieser Erkrankungen macht eine intensive Ursachenforschung notwendig, welche die zugrunde liegenden Mechanismen identifiziert. Neue Erkenntnisse im Bereich der Forschung beinhalten eventuell auch die Hoffnung für Patienten, neue potentielle Heilungsansätze zu identifizieren. Solche neuen therapeutischen Ansätze sind Thema der nun vorliegenden Dissertation.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt eine erste Verteidigungslinie gegen invadierte Krankheitserreger dar. Es dient dazu, potentielle Gefahren auf schnellem Wege einzudämmen. Die angeborene Immunantwort basiert auf der Mustererkennung molekularer mikrobieller Strukturen (4). Die Rezeptoren der angeborenen Immunität haben eine ausgedehnte Spezifität und können eine große Anzahl von Molekülen binden. Diese keimbahn-codierten Rezeptoren erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, „pathogen-associated molecular patterns“) (5). Bei den mikrobiellen Liganden dieser Rezeptoren handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan, Flagellin, DNA und RNA (6). Neben den PAMPs führt die Erkennung von sogenannten DAMPs („damage-associated molecular patterns“) zur Aktivierung der angeborenen Immunität. DAMPs sind Moleküle, die infolge einer Infektion durch Zellyse und Gewebeschädigungen frei werden. Die Rezeptoren der angeborenen Immunität sind in ihrer Anzahl limitiert und erkennen unspezifisch konservierte mikrobielle Komponenten, die bei einer Vielzahl von Pathogenen vorzufinden sind (7).

Die angeborene Immunität ergänzt die Protektion, die durch anatomische und physiologische Barrieren wie intakte Haut, Schleimhäute, den niedrigen pH-Wert des Magens und Lysozym in der Tränenflüssigkeit gewährleistet wird (5). Am besten charakterisiert sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die sowohl extra- als auch intrazellulär exprimiert werden. Während viele TLRs auf der Zelloberfläche vorkommen, befinden sich andere in intrazellulären Kompartimenten wie den Endosomen (2). Durch Bindung pathogener Produkte an diese Rezeptoren werden Signalwege aktiviert, welche die Expression antimikrobieller Gene und inflammatorischer Zytokine induzieren. Die Reifung dendritischer Zellen (DCs, „dendritic cells“) wird begünstigt und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen sowie deren Migration in die regionalen Lymphknoten verstärkt, wodurch die adaptive Immunantwort eingeleitet wird (5,8). Ohne die Erkennung von PAMPs und die daraus resultierenden Signale der angeborenen Immunität wäre die Generierung der adaptiven Immunantwort nicht möglich (5).

Neben den auf Antigenpräsentation spezialisierten Zellen wie DCs und Makrophagen, die im Rahmen der angeborenen Immunität agieren, wirken

Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile natürliche Killerzellen (NK) und NK T-Zellen der Pathogeninvasion entgegen. Ihre Aktivierung erfolgt direkt nach Kontakt mit dem Pathogen (7).

1.1.1.1 Dendritische Zellen (DCs)

DCs sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und essentielle Mediatoren von Immunität und Toleranz (9). Sie entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern als unreife Zellen über das Blut in periphere Gewebe des Körpers wie Darmtrakt, Haut, respiratorische Atemwege und Genitalschleimhäute ein (10). Immature DCs sind auf die Entdeckung, Aufnahme und Prozessierung von Pathogenen spezialisiert. Nach Antigenaufnahme beginnt die Maturation der DC. Die Expression der für die T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle und auch die der MHC-Moleküle („Major Histocompatibility Complex“) wird verstärkt. Im Anschluss an die Prozessierung erfolgt die Präsentation von Pathogenpeptiden über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche und die Migration der DCs über die lymphatischen Gefäße in die regionalen lymphoiden Organe, wo die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen erfolgt (11).

1.1.1.2 Makrophagen

Makrophagen kommen neben den DCs in den interstitiellen Geweben, alveolaren Räumen und mukosalen Oberflächen im ganzen Körper vor. Ihre Vorläufer zirkulieren als Monozyten im Blut und wandern, angezogen durch Chemokine oder andere Signalmoleküle in die Gewebe aus, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Diese phagozytieren im Falle einer Infektion oder Verletzung mikrobielle Pathogenbestandteile, Partikel oder Zelldebris. Weiterhin sekretieren sie inflammatorische und antimikrobielle Komponenten (12). Neben ihrer Schlüsselfunktion bei der Abwehr von Infektionen sind Makrophagen maßgebend an der Morphogenese verschiedener Körperstrukturen beteiligt. So unterstützen sie beispielsweise im Knochenmark die Erythropoese und im Gehirn, in Form von Mikrogliazellen, die Vernetzung von Neuronen (13). Ihre Vorläuferzellen, die pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, können sich unter Einfluss entsprechender Wachstumsfaktoren auch zu DCs differenzieren (14).

1.1.1.3 Eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten

Eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten wirken mikrobiellen und parasitären Infektionen entgegen. Wesentlich dabei ist die unverzüglich nach Pathogenkontakt eintretende Sezernierung antiinflammatorischer Mediatoren, die bereits vorgefertigt intrazellulär in Granula vorliegen.

Eosinophile sind wichtige Effektorzellen in Allergie und Parasitenabwehr. Zu den granulären Proteinen der Eosinophilen zählen MBP („major basic protein“), EPO („eosinophil peroxidase“), ECP („eosinophil cationic protein“) und EDN („eosinophil-derived neurotoxin“) (15). Die Proteine perforieren bakterielle Membranen und können weitere Zellen, z.B. Mastzellen aktivieren. ECP und EDN gehören zur Familie der Ribonukleasen und katalysieren die Hydrolyse viraler RNA. Sie besitzen aber auch gewebeschädigende Eigenschaften. Eosinophile synthetisieren zahlreiche Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Interferone. Zusätzlich besitzen Eosinophile die Fähigkeit, Antigene über MHC- bzw. HLA-Moleküle („Human Leukocyte Antigen“) zu präsentieren und die Proliferation von T-Zellen anzuregen (15). Ihre Differenzierung wird im Wesentlichen durch die Transkriptionsfaktoren GATA-1 („GATA-binding protein 1“), PU.1 und c/EBP („CCAAT Enhancer-binding Protein“) gesteuert. Eosinophile Zellen entstehen im Knochenmark unter Einfluss von Interleukin (IL) -5, -3 und GM-CSF („Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“) (15). IL-5 besitzt eine Schlüsselfunktion in Differenzierung, Reifung, Rekrutierung und Aktivierung der Zellen. An der Migration zu einem Entzündungsort partizipieren Zytokine wie IL-4, -5 und -13 sowie Chemokine wie RANTES („Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted“) und Eotaxin (15).

Neutrophile Granulozyten umfassen um die 40-60% der Leukozyten im Blut und bilden damit den größten Anteil des zellulären Bestandteils des Blutes. Ihre primäre Funktion ist die Beseitigung eindringender Mikroben. Sie entsenden chemische Signale, die antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten bzw. Makrophagen und DCs rekrutieren und aktivieren (16). Wie Eosinophile können Neutrophile Fremdpartikel phagozytieren und T-Zellen in Folge der Präsentation antigenen Peptidfragmente direkt über MHC II Moleküle stimulieren. Ihr antimikrobielles Potential erlangen Neutrophile durch die in ihren Granula gespeicherten reaktiven Oxidantien, proteolytischen Enzyme und kationischen Peptide, die dazu befähigt

sind, zahlreiche mikrobielle Substrate zu zersetzen (17). Des Weiteren sezernieren sie zahlreiche Mediatoren, darunter Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine und Chemokine, die andere Immunzellen aktivieren sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Vasodilatation steigern und somit deren Einwandern in die Inflammationsherde im Gewebe fördern. Bei Aktivierung werden die in den Granula gespeicherten Botenstoffe freigesetzt und auch die Synthese neuer Mediatoren initiiert (18).

Basophile stellen die kleinste Subpopulation der Leukozyten dar und spielen eine Rolle in Allergie und Immunantwort gegen intestinale Helmintheninfektionen. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus den gleichen Vorläuferzellen aus denen sich auch Eosinophile differenzieren. Basophile können über Fc-Rezeptoren durch Bindung von Immunglobulinen, Zytokinen und Liganden für die CD200-Rezeptor-Familie stimuliert werden. Ihre Aktivierung äußert sich in der Sezernierung Th2-assoziiertes Moleküle wie Histamin, IL-4 und IL-13 (19). Wie für Eosinophile sind IL-3, -5 und GM-CSF wichtige Wachstumsfaktoren für die basophile Zelllinie (20). Des Weiteren reguliert IL-33 durch Bindung an den ST2-Rezeptor auf Basophilen deren Th2-gerichtete Effektorfunktionen (21).

1.1.1.4 Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich lokal aus myeloiden Vorläuferzellen hämatopoetischen Ursprungs in den Geweben. Dort befinden sie sich in der Nähe von Epithelien, Blutgefäßen, Nerven, der glatten Muskulatur und mukusproduzierenden Drüsen des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege (22). Durch Phagozytose von Fremdpartikeln und Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Falle einer Infektion wirken sie bei angeborener und adaptiver Immunität mit. Zu den wichtigen in ihren Granula gespeicherten Mediatoren gehören Histamin, Heparin, MBP, Proteasen (Chymasen und Trypsasen) und Peroxidase. Daneben sezernieren Mastzellen Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) und zahlreiche Zytokine, durch die sie Immunantworten regulieren und mit T-, B-Zellen und DCs interagieren (22). Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der Allergie des Soforttyps, dem auch das allergische Asthma zugeordnet ist. Auf ihrer Oberfläche tragen sie hochaffine Rezeptoren für IgE (FcεRI), membranständiges IgE führt nach Kreuzvernetzung zu ihrer Aktivierung. Weiterhin exprimieren Mastzellen TLRs, die es der Zelle

ermöglichen, pathogenspezifische Antworten zu generieren (12). Durch die schnelle Freisetzung vorgefertigter Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α können beispielsweise Neutrophile rekrutiert und aktiviert werden, die Pathogene eindämmen (23). Weiterhin sind Mastzellen an der Rekrutierung von T-Effektorzellen in die Lunge beteiligt und können durch die TNF-vermittelte Aktivierung von Th2-Zellen die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung begünstigen (24).

1.1.1.5 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind an der Beseitigung viraler Infektionen und an Immunreaktionen gegenüber Tumoren beteiligt. Sie sind mit aktivierenden und inhibierenden Zelloberflächenrezeptoren ausgestattet, deren Ligation u.a. mit MHC Klasse I Molekülen auf der Zielzelle unterschiedliche Effektorfunktionen wie Zytotoxizität und Chemokin- und Zytokinproduktion steuern (25,26). Sie eliminieren infizierte Zellen durch Ausschüttung von Perforin und Granenzymen und durch Bindung von apoptoseinduzierenden Rezeptoren auf ihren Zielzellen (27,28). Vorgefertigte Transkripte, z.B. für Interferon (IFN)- γ , initiieren die Zytokinsynthese unverzüglich nach Aktivierung der NK Zelle und ermöglichen eine rapide Effektorfunktion (29).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die erworbene Immunität ist sowohl an der Eliminierung von Pathogenen zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion als auch an der Generierung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt (2). Sie wird im Wesentlichen durch die Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten vermittelt. Diese Rezeptoren entstehen durch zufällige Zusammenlagerung verschiedener keimbahnkodierter Gensegmente, den V(D)J-Segmenten (V: „variable“, D: „diversity“, J: „joining“), im Prozess der somatischen oder auch V(D)J – Rekombination. Die Rekombination wird durch die Gene RAG-1 („recombination activating gene-1“) und RAG-2 („recombination activating gene-2“) initiiert. Durch anschließende klonale Expansion werden Lymphozyten einer bestimmten Antigenpezifität selektiert. Auf diese Weise entsteht ein nahezu unbegrenztes Repertoire an Antigenrezeptoren mit dem Potential annähernd jede antigene Determinante spezifisch zu erkennen (30). Während die B-Zellen die humorale Abwehrreaktion mit Hilfe von Immunglobulinen bilden, vermitteln T-Zellen Immunität auf zellulärer Ebene.

1.1.2.1 T-Lymphozyten

T-Zellen haben unterschiedliche Effektorfunktionen und unterscheiden sich durch Expression verschiedener Korezeptoren die zusammen mit dem T-Zellrezeptor (TZR) einen Komplex aus MHC-Molekül und prozessiertem mikrobiellem Peptid erkennen. Man unterscheidet die Korezeptoren CD4 und CD8. CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigenpeptide in Kombination mit MHC-Klasse II-Molekülen (MHC II), CD8⁺ T-Zellen dagegen binden Peptide, die von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Um Lymphozyten effektiv zu aktivieren und die Proliferation von Lymphozyten einer bestimmten Spezifität anzuregen, ist neben der Präsentation des Antigens über MHC-Komplexe ein zweites sogenanntes kostimulatorisches Signal erforderlich. Dieses wird durch Expression von Molekülen wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf antigenpräsentierenden Zellen wie DCs vermittelt (31).

CD4⁺ T-Zellen haben viele Subpopulationen, die sich aufgrund ihrer Zytokinproduktion differenzieren lassen. Typ 1 T-Helferzellen (Th1) produzieren IFN- γ , IL-2 und TNF- β . Als Folge davon werden Makrophagen aktiviert sowie Zellvermittelte und Phagozyten-abhängige protektive Immunität induziert. Typ 2 T-Helferzellen (Th2) produzieren IL-4, IL-5 und IL-13, welche die Antikörperproduktion

von B-Zellen vorantreiben und Eosinophile aktivieren, wobei Makrophagen eher gehemmt werden (32).

Neuere Studien machen auf die Existenz weiterer T-Zellsubpopulationen aufmerksam. In zwei etablierten murinen Modellen, dem Mausmodell der Multiplen Sklerose („experimental autoimmune encephalomyelitis“) sowie im Modell der kollagen-induzierten Arthritis, kam erstmalig der Verdacht auf, dass diese Modelle nicht, wie zuvor angenommen, von INF- γ -produzierenden Th1-Zellen abhängig sind (33). Tatsächlich erwiesen sich IL-17-produzierende CD4⁺ T-Effektorzellen in diesen Modellen als krankheitsfördernd (33). Aktuell werden IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen als Th17-Zellen separiert von allen übrigen T-Zellsubpopulationen betrachtet.

Die Beschreibung einer weiteren Subpopulation IL-9-sezernierender CD4⁺ T-Zellen erweiterte den Bestand verschiedener T-Zellsubpopulationen zusätzlich. IL-9 wurde zunächst als Th2-Zytokin postuliert. Verschiedene Studien deuteten jedoch auf eine von den übrigen Th2-typischen Zytokinen zu unterscheidende Regulation des Zytokins hin. So verstärkt beispielsweise die Addition von IL-4 und TGF- β („Transforming growth factor β “) zu naiven T-Zellen deren IL-9-Produktion, wobei die klassischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 inhibiert werden (34). Für die Entwicklung von Th9-Zellen ist TGF- β erforderlich und ihre IL-9-Produktion wird durch IL-25 hochreguliert (34,35).

Die Entdeckung IL-22 produzierender T-Zellen rundet die Komplexität der verschiedenen T-Zelluntergruppen weiter ab. IL-22 kann von Th17 und von einer Subpopulation von NK-Zellen produziert werden (36-38). Neuere Studien beschreiben allerdings auch die Produktion von IL-22 von einer separaten Subpopulation humaner CD4⁺ T-Effektorzellen (39). Bisher konnte eine duale Funktion für IL-22 evaluiert werden. Es wirkt hauptsächlich auf Gewebszellen nichthämatopoetischen Ursprungs, beispielsweise Epithelzellen des Respirations- und Verdauungstraktes und Keratinozyten in der Haut. Während IL-22 einerseits die Produktion antimikrobieller Peptide anregen kann, ist es andererseits mit der Entstehung chronischer Inflammation assoziiert (39).

1.1.2.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität zuständig. Im Zuge der adaptiven Immunantwort produzieren sie Antikörper, die sogenannten Immunglobuline (Ig). Jeder Antikörper besteht aus zwei Fab-Fragmenten und einem Fc-Teil (40). Antikörper binden ihre spezifischen Antigene über variable Sequenzen innerhalb der Fab-Regionen (40). Sie können Pathogene durch Neutralisation oder Agglutination (Verklumpung infolge von Antigen-Antikörper-Komplexbildung) unschädlich machen (41). Der Fc-Teil vermittelt weitere Effektorfunktionen wie die Opsonisierung, durch die mit Fc-Rezeptoren ausgestattete Phagozyten wie beispielsweise Makrophagen, aktiviert und somit zur Phagozytose angeregt werden. Des Weiteren können Antikörper Proteine des Komplementsystems binden, was zur Aktivierung des Systems führt (41).

Für ihre Entwicklung im Knochenmark benötigen B-Zellen IL-7 produzierende Stromazellen (42,43). Ihre Differenzierung verläuft zunächst antigen-unabhängig. Immature B-Zellen exprimieren membranständiges IgM, mature membranständiges IgM und IgD (43). Diese auf der Oberfläche der Zelle befindlichen Antikörper stellen frühe B-Zellrezeptoren dar. Wie der T-Zellrezeptor besitzt der B-Zellrezeptor Korezeptoren wie beispielsweise CD19 (43). Nach ihrer Maturierung verlässt die B-Zelle das Knochenmark. In der Peripherie können die reifen B-Zellen durch Antigene aktiviert werden und den Vorgang der somatischen Hypermutation durchlaufen, woraus eine Erhöhung ihrer Affinität zum Antigen resultieren kann (43).

Durch antigene Stimulation maturer IgM⁺ und IgD⁺ B-Zellen kann ein weiterer Mechanismus, der sogenannte Isotyp „switch“ (Isotypklassenwechsel) initiiert werden, bei dem sich die konstante Region des Antikörpers durch differentielle Genexpression ändert. Die Antigenspezifität bleibt dabei erhalten. Im Menschen kommen fünf verschiedene Isotypen der Immunglobuline vor (IgM, IgD, IgA, IgG, IgE) (40), welche die Effektorfunktionen der B-Zellen erweitern und auf die Beseitigung von Pathogenen in unterschiedlichen Kompartimenten spezialisiert sind. Der Isotypklassenwechsel ist von Th2-Helferzellen abhängig. Diese exprimieren den CD40-Liganden und übermitteln instruktive Signale in Form von Zytokinen (44,45). IL-10 und TGF- β begünstigen beispielsweise einen Klassenwechsel zu IgG während IL-4 und IL-13 die Produktion von IgE-Antikörpern fördern (43).

1.2 Allergie und Asthma

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen wie allergische Rhinitis, Asthma und Ekzeme schreitet vor allem in den industrialisierten Ländern der Welt voran und nimmt epidemische Ausmaße an (46,47). Ursache ist eine Überempfindlichkeitsreaktion gegen eigentlich harmlose Substanzen aus der Umwelt in prädisponierten Individuen (Atopie). Neben Schleimhäuten, Haut und Gastrointestinaltrakt sind häufig die Atemwege von allergischen Reaktionen betroffen. Die Allergie richtet sich dabei gegen einheimische Gräser oder Pollen von Bäumen und Sträuchern wie Birke, Erle und Hasel.

1.2.1 Asthma – Heterogenität und Ursachen

Asthma ist ein komplexes Syndrom und besitzt viele heterogene Phänotypen, die durch verschiedene Faktoren kategorisiert werden können (48,49). Neben der allergen-induzierten Form treten nicht-allergisches intrinsisches Asthma oder Mischformen auf, wobei Letztere durch virale Infektionen, Luftverschmutzung, oder Medikamente induziert werden können (48). Die Symptome der verschiedenen Asthmaformen sind sehr variabel und die Ursachen sind noch nicht vollständig geklärt. Patienten mit schwerem, kortikosteroid-resistentem Asthma neigen beispielsweise zur IFN- γ - und IL-17-Produktion sowie einer Neutrophilie in den Atemwegen (48). In mildem bis moderatem Asthma sind Th2-Zellen die in den Atemwegen dominierende Subpopulation (50).

Die allergische Form des Asthmas ist weit verbreitet und soll im Folgenden näher beleuchtet werden. Im Vergleich zu gesunden Individuen zeigen Allergiker eine differentielle Polarisierung der T-Effektorzellen. Eine wesentliche Hypothese benennt dabei ein Th1-Th2-Ungleichgewicht als Ursache für die Erkrankung mit einer verstärkten Th2-Antwort bei Patienten mit Allergie und Asthma. In diesem Zusammenhang konnte eine Studie zeigen, dass Birkenallergen (Bet v 1)-spezifische CD4⁺ Zellen von Allergikern im Vergleich zu gesunden Spendern eine verminderte Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ aufweisen (51). Auch kann bei Patienten mit Asthma eine erhöhte Anzahl von Th2-Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden (52). In den vergangenen Jahrzehnten

wurden immer mehr Gene identifiziert, die an der Regulation der Th2-polarisierten Erkrankung partizipieren (53,54). Neben der genetischen Prädisposition beeinflussen weitere Faktoren schon frühzeitig in der Kindheit die Entstehung des allergischen Asthmas. Laut der Hygienehypothese begünstigen eine keimfreie Umgebung, keine Geschwister, die Einnahme von Antibiotika, Impfungen und eine industrialisierte Gesellschaft die Entstehung des Asthmas, während frühe Infektionen, Geschwister und der Besuch von Kindergärten sowie das ländliche Leben in der Nähe von Bauernhöfen toleranzinduzierend und protektiv wirken (55). In diesem Zusammenhang könnte ein Ungleichgewicht in der Th1-Th2-Balance als Ursache in Betracht kommen. Es wurde postuliert, dass eine Konfrontation mit mikrobiellen Bestandteilen in der frühen Kindheit möglicherweise für eine Verschiebung der Th-Lymphozyten-Balance von einer Th2-Antwort in Neugeborenen hin zu einer dominierenden Th1-Antwort im späteren Leben führt (56). Unterstützt wurde diese Theorie mit Untersuchungen, die einen Defekt in der Th1-vermittelten Immunantwort in Neugeborenen aus Familien mit gehäuften Allergievorkommen korreliert mit einem Anstieg der Th2-Antwort aufdeckten (57). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass Th1-Zellen die Proliferation von Th2-Zellen inhibieren (58) und dass das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ die IgE-Synthese und Eosinophilie unterdrücken kann (59,60).

Die Hypothese, dass Infektionen eine Verschiebung der Th1-Th2-Balance in Richtung Th1 fördern und damit der Entstehung des Asthmas entgegenwirken, ist jedoch nicht uneingeschränkt verifizierbar und auf alle möglichen Infektionen übertragbar. Beispielsweise lassen sich in Populationen mit verbreiteten Helmintheninfektionen, die starke Th2-Antworten hervorrufen, weniger Allergien nachweisen (61). Busse und Kollegen beschrieben in diesem Kontext, dass frühzeitige virale Infektionen des respiratorischen Traktes anstatt protektiv zu wirken, die Entwicklung und Exazerbation des Asthmas auch begünstigen können. Eine Infizierung mit dem humanen Rhinovirus regt dabei Epithelzellen zur Produktion von TSLP („thymic stromal lymphopoietin“) an. TSLP ist ein Zytokin, dass die Generierung einer Th2-Immunantwort in anderen Zellen, darunter DCs, fördert (62). Außerdem wurde die rein protektive Rolle von Th1-Zellen beim allergischen Asthma durch andere Mausmodelle widerlegt. Hier führte der Transfer allergenspezifischer Th1-Zellen sogar zu einer Exazerbation der durch Th2-Zellen induzierten Hyperreagibilität und pulmonalen Entzündung. Weiterhin führt der Transfer von Th1-

Zytokinen in die asthmatische Lunge zu einer Verstärkung der allergischen Entzündung (63,64) und allergen-spezifische Th1-Zellen können auch direkt eine Atemwegsinflammation induzieren (65). Unter Betrachtung dieser Aspekte müssen Therapiestrategien, die auf eine Verschiebung der Th2-Antwort in Richtung einer Th1-Immunität abzielen, kritisch betrachtet werden. Höchstwahrscheinlich sind an der Unterdrückung der Th2-polarisierten, allergischen Atemwegsinflammation weitere Zellsubpopulationen als ausschließlich Th1-Zellen beteiligt.

Neuere Studien machen auf eine Dysfunktion regulatorischer T-Zellen als weitere mögliche Ursache des allergischen Asthmas aufmerksam. Die Induktion regulatorischer T-Zellen, die in der Lage sind, unerwünschte Th1- und Th2-Antworten zu supprimieren, wird dabei auch durch Infektionen beeinflusst (55,66-69).

Das Spektrum an möglichen Ursachen für die Entstehung des Asthmas ist vielfältig. Die Polarisierung der T-Effektorzellen ist dabei durch genetische Prädisposition im Kontext variabler Umwelteinflüsse sehr individuell geprägt. Die Entdeckung von immer mehr T-Zell-Subpopulationen wie Th9 und Th17, die an der Pathogenese des Asthmas beteiligt sein können (48,70), unterstreichen die Komplexität der Erkrankung zusätzlich.

1.2.2 Allergisches Asthma – Charakterisierung und Pathogenese

Allergisches Asthma ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR, „airway hyperresponsiveness“), gesteigerte Mukussekretion und darauffolgende Atemwegsobstruktion, Becherzellmetaplasie, Th2-assoziierte Zytokinproduktion und Eosinophilie gekennzeichnet ist (71). Besonders bei ausbleibender Behandlung besteht die Gefahr, dass das Asthma in eine chronische Form übergeht mit der eine Umstrukturierung der Atemwege einhergeht. Das allergische Asthma bronchiale untergliedert sich nach erfolgter Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen in eine frühe und eine späte Phase.

Grundlegend für die Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung ist die Sensibilisierung gegen ein normalerweise harmloses Protein aus der Umwelt. Unter dem Atemwegsepithel befindet sich ein Netzwerk von DCs, welches inhalierte

Substanzen und Pathogene erfasst. Immature DCs werden nach Kontakt mit einem Antigen in Verbindung mit PAMPs aktiviert und migrieren dann in die drainierenden Lymphknoten (66). Die Aktivierung und Migration der DCs wird dabei durch Epithelzellen kontrolliert, die Th2-polarisierende Zytokine sezernieren können (72). In einem Mausmodell konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression von TLR 4 auf Atemwegsepithelzellen eine wesentliche Rolle in der Hausstaub-induzierten allergischen Atemwegsentzündung spielt (73). Essentiell für die Sensibilisierung ist, dass die alleinige Exposition gegenüber dem Allergen für die Einleitung der Th2-gerichteten Immunantwort nicht ausreicht. Vielmehr induziert ein zweiter pathogener Stimulus (z.B. PAMP), ein Gefahrensignal, in Verbindung mit dem Antigen eine adaptive Immunantwort gegen das eigentlich harmlose Antigen.

In den regionalen Lymphknoten präsentieren die maturierten DCs antigene Peptidfragmente und exprimieren die zur Generierung der adaptiven Immunantwort erforderlichen kostimulatorischen Moleküle. Voraussetzung dafür ist, neben der antigen-spezifischen Erkennung, ein zweites kostimulatorisches Signal. Auf diese Weise erfolgt das sogenannte T-Zell-„priming“. CD4⁺-naive T-Zellen werden aktiviert, polarisiert, proliferieren und wandern zurück in die Lunge (66). Dort vermitteln sie Entzündungsreaktionen des Th1-Typs (Attraktion von Neutrophilen) oder des Th2-Typs (Attraktion von Eosinophilen) (66). Im Falle der Th2-gerichteten Immunantwort kommt es insbesondere zur Produktion der Zytokine IL-4 und IL-13, die B-Zellen zur Produktion antigenspezifischer IgE-Immunglobuline anregen und die Atemwegsinfektion vorantreiben. Die Th2-spezifische Zytokinsekretion wird dabei maßgeblich von den Transkriptionsfaktoren GATA-3 („Trans-acting T-cell-specific transcription factor-3“) und STAT-6 („Signal Transducers and Activators of Transcription“) vermittelt (70,74). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Zytokine, die von Th2-Zellen sezerniert werden, insbesondere IL-13, auch unabhängig von IgE und eosinophilen Granulozyten AHR induzieren können (75). Mit der Bindung der IgE-Antikörper an Fc-Rezeptoren auf mukosalen Mastzellen in den Atemwegen schließt die Sensibilisierungsphase ab. Kommt es darauffolgend zur erneuten Allergen-Inhalation setzt unverzüglich die sogenannte Frühreaktion ein. Das membranständige IgE auf den Mastzellen wird quervernetzt und Lipidmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Prostaglandin E₂ werden freigesetzt. Diese Mediatoren führen zur asthmatischen Bronchokonstriktion. Im weiteren Verlauf produzieren Mastzellen Zytokine wie IL-4, -5 und -13, welche die

Antikörperproduktion der B-Zellen anregen, aber auch zur Atemwegshyperreaktivität und Eosinophilie beitragen. Die im Lymphknoten aktivierten T-Zellen werden durch Chemoattraktion zurück ins Gewebe gelockt, wo sie durch weitere Zytokinausschüttung die Entzündung weiter vorantreiben und die sogenannte Spätreaktion einleiten. So werden vor allem durch das Zytokin IL-5 eosinophile Granulozyten in die Atemwege rekrutiert. Neben den aktiven T-Zellen entstehen auch allergenspezifische Gedächtnis-T-Zellen, die in den Atemwegen patrouillieren und sofort auf erneut eindringende Allergene reagieren (76).

1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Immunantworten regulieren zu können, stellen Tregs einen interessanten Ansatzpunkt für neue Therapieformen auch gegen das allergische Asthma dar.

Tregs können die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen wie z.B. die Zytokinproduktion von zahlreichen Immunzellen, einschließlich $CD4^+$, $CD8^+$ -T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen, B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* und *in vivo* unterdrücken (77). Sie wurden erstmals als $CD4^+CD25^+$ T-Zellen beschrieben, die eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz spielen (78). Diese $CD4^+CD25^+$ T-Zellen werden heute als sogenannte nTregs (natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen) bezeichnet. Sie entstehen im Thymus in einem Selektionsprozess, der separiert von positiver Selektion und Deletion abläuft, durch hoch-affine Bindung an körpereigene Peptide, die durch MHC-Moleküle thymoider Stromazellen präsentiert werden (79,80). Tregs können aber auch außerhalb des Thymus in peripheren Lymphknoten induziert werden (iTregs). Die iTregs entwickeln sich aus naiven $CD4^+$ Zellen in Abhängigkeit von Antigenstimulation und Zytokinmilieu (81). Innerhalb der iTregs werden Tr1- („T regulatory type 1“) und Th3-Zellen („T helper type 3“) unterschieden, deren immunsuppressives Potential im Wesentlichen durch die Zytokine IL-10 und TGF- β vermittelt werden (82).

Der Anteil an Tregs beträgt 5-10% der $CD4^+$ Zellen des peripheren Blutes (83-85). Tregs exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3 („Forkhead box protein 3“) und die IL-2-Rezeptor α Kette (CD25) und im Gegensatz zu aktivierten T-Effektorzellen ist die Expression des IL-7 Rezeptors α (CD127) gering (86-88). Foxp3 ist ein wichtiges Kontrollgen in der Entwicklung von sowohl humanen als auch murinen Tregs (86,89,90). Seine Expression ist auf $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor tragende Zellen beschränkt (91). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 kann an den IL-2 Promotor binden und damit die Transkription der mRNA für IL-2, einen T-Lymphozyten-Wachstumsfaktor, reprimieren (92). Die Mutation des Genes in der „Scurfy“ Maus führt zu der Unfähigkeit, Tregs zu entwickeln und damit zu einer völligen Fehlregulation des Immunsystems, die in dem schnellen Unterliegen heftiger Entzündungen mündet (89). Die entsprechende Erkrankung im Menschen wird als IPEX („Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“) bezeichnet

(93). Ein weiteres Charakteristikum von Tregs ist deren konstitutive CTLA-4 („Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4“-)Expression, während naive T-Zellen dieses Molekül nur nach Aktivierung exprimieren (83). Neben CD25 und CTLA-4 gehört GITR („glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“) zu den Signalmolekülen regulatorischer T-Zellen (94). Eine konstitutive Foxp3-Expression sowie die hohe Expressionsrate des CD25 sind auf nTregs beschränkt. iTregs zeichnen sich durch eine variable Expressionen dieser Gene aus (69,82,95), was eine Identifikation der Zellen anhand spezifischer Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Proteine erschwert.

Die Suppressionsmechanismen von Tregs sind vielfältig. Neben der zytokinabhängigen Suppression kann diese auch durch zellkontaktabhängige Mechanismen vermittelt werden. Jonuleit und Mitarbeiter zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Stimulation Treg-depletierter CD4⁺ Zellen mit CD25⁺ Zellen zu einer Anergie in den CD4⁺ Zellen führt. Die anergen CD4⁺-Zellen supprimieren in einem separaten Ansatz die Proliferation konventioneller CD4⁺ Zellen. Die Autoren bezeichneten dieses Phänomen als infektiöse Toleranz und schlugen folgende Regulation vor: Während die primäre Suppression der CD4⁺-Zellen durch Treg lokal erfolgt und kontaktabhängig ist, wird der induzierte sekundäre Suppressionsmechanismus durch lösliche Faktoren vermittelt (96). Die Suppression ist dabei unabhängig von antigenpräsentierenden Zellen und nicht Antigen-spezifisch. Die Arbeitsgruppe um Thronton zeigte, dass Tregs *in vitro* keinen Einfluss auf die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD86 oder CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen haben. Für die Initiierung der regulatorischen Eigenschaften bedarf es lediglich der Aktivierung der Tregs über ihren T-Zellrezeptor, z.B durch Zusatz von Antikörpern, die gegen das CD3 des T-Zellrezeptors gerichtet sind. Die durch Aktivierung resultierende Suppression der Effektorfunktionen konventioneller T-Zellen durch Tregs ist unspezifisch, die Präsentation eines Antigens über MHC-Moleküle ist dabei nicht erforderlich (97). Interessanterweise reicht die Aktivierung humaner Tregs mit anti-CD4-Antikörpern bereits aus, um eine vollständige Suppressionsfähigkeit zu erlangen. Nach Aktivierung über den CD4-Rezeptor unterdrücken CD4⁺CD25⁺ T-Zellen des peripheren Blutes die Proliferation, Zytokinproduktion sowie CD25-Expression kokultivierter CD8⁺ Zellen (98). Eine Übertragung suppressiver Eigenschaften durch direkte Interaktion zwischen Treg und T-Effektorzelle wurde durch neuere Studien bestätigt. Bopp und Mitarbeiter wiesen *in*

vitro und *in vivo* eine direkte Übertragung von cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat) von Tregs auf T-Effektorzellen nach (99). Neben dem direkten Zellkontakt zwischen Treg und Effektorzelle kann Letztere auch indirekt durch antigenpräsentierende Zellen beeinflusst werden. Die Arbeitsgruppe um Tang wies elektronenmikroskopisch den Kontakt von DCs mit Tregs in den peripheren Lymphknoten nach, während eine direkte Interaktion der Tregs mit T-Effektorzellen ausblieb (100).

CTLA-4 könnte ein weiteres wichtiges Signalmolekül in der kontaktabhängigen Toleranzinduktion darstellen. *In vivo* agiert es als negativer Regulator der T-Zellaktivierung (101). Wird eine T-Zelle über den TZR und Interaktion von CD28 mit den B7-Molekülen (CD80, 86) auf der antigenpräsentierenden Zelle aktiviert, kommt es im Zuge eines negativen Regulationsmechanismus zu einer verstärkten Expression von CTLA-4 auf der T-Zelle. Die im Vergleich zu CD28 höhere Bindungsaffinität von CTLA-4 zu den B7-Molekülen ist für die Homöostase der Immunantwort essentiell und ermöglicht ein Abklingen der Immunantwort nach erfolgter Aktivierung (102). Im Mausmodell bedingt der Verlust von CTLA-4 auf Tregs Autoimmunität und eine Beeinträchtigung der suppressiven Funktion der Regulatoren (103,104). CTLA-4 auf Tregs kann direkt mit CD80 und 86 aktivierter T-Zellen interagieren und supprimierende Signale weiterleiten (105). Weiterhin kann es wie oben beschrieben über antigenpräsentierende Zellen wirken. Eine Stimulation von CTLA-4 verstärkt die Expression des Enzymes IDO („Indoleamine 2,3-dioxygenase“) in DCs. IDO katalysiert die Umsetzung von Tryptophan in Kynurenin und andere Metabolite, die möglicherweise die Induktion von Tregs aus naiven CD25⁻CD4⁺ Zellen fördert (105). Takahashi und Kollegen zeigten, dass die Addition von anti-CTLA-4 Antikörpern die Suppression in Kokulturen mit CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aufhebt (106) während Thornton und Jonuleit keine Aufhebung der suppressiven Kapazität infolge CTLA-4 blockierender Antikörper nachweisen konnten (84,107). Die Expression von CTLA-4 wird von Foxp3 reguliert. Bei ektopischer Expression von Foxp3 in naiven T-Zellen wird auch CTLA-4 hochreguliert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zellkontaktabhängige Induktion suppressiver Eigenschaften in T-Effektorzellen sowohl durch den direkten Kontakt zwischen aktivierter Treg und T-Zelle als auch über antigenpräsentierende Zellen übermittelt werden kann.

Als weiterer suppressiver Mechanismus wurde die sogenannte Konkurrenz beschrieben, bei der Tregs mit T-Effektorzellen um lösliche Wachstumsmediatoren wie IL-2, -4 und -7 konkurrieren. Zusätzlich dazu könnten Tregs durch verstärkte Bindung von CTLA-4 an die B7-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen die Kostimulation von T-Effektorzellen herabsetzen (108).

1.4 Tregs als therapeutischer Ansatz in der Behandlung des allergischen Asthmas

Die Effekte von Tregs in Bezug auf die allergische Atemwegserkrankung wurden in verschiedenen murinen Modellen untersucht. Eine Depletion $CD4^+CD25^+$ Tregs verursacht dabei eine Atemwegsinflammation und AHR (109), wohingegen der adoptive Transfer von Tregs eine bereits bestehende Entzündung bessern oder gar vollständig aufheben kann (110). Die Inhibition der Effektorfunktionen verschiedener T-Zellsubpopulationen durch Tregs fällt dabei unterschiedlich stark aus. In einem murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung wurde gezeigt, dass der adoptive Transfer von Tregs trotz vergleichbarer cAMP-Spiegel in beiden T-Zell-Subpopulationen Th1-induziertes Asthma stärker hemmt als Th2-induziertes (65). Th1-Zellen scheinen somit im Vergleich zu Th2-Zellen empfänglicher gegenüber der Treg-vermittelten Suppression zu sein.

Auch im Menschen sind $CD4^+CD25^+$ Tregs dazu fähig, T-Zellantworten zu hemmen (111). In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass die Ursache für die Entwicklung eines allergischen Asthmas in einem Ungleichgewicht in dem Verhältnis zwischen Tregs und Th2-Zellen liegt. In der Tat ergab die Analyse allergenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen des peripheren Blutes, dass in gesunden Individuen IL-10-sezernierende T-Zellen (als Kennzeichen für Tregs) die vorherrschende Population sind, während in allergischen Patienten IL-4-produzierende Th2-Zellen dominieren (112). Zum anderen wird vermutet, dass eine Beeinträchtigung der Treg-Funktion in asthmatischen Patienten ebenso zur Entstehung des Asthmas beitragen kann. Kinder mit allergischem Asthma zeigen eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen in der bronchoalveolären Lungenlavage. Die Tregs haben zudem eine eingeschränkte Kapazität, die T-Zellproliferation und die Synthese von Th2-Zytokinen zu unterdrücken (113). Auch bei erwachsenen Patienten konnte eine

reduzierte Funktion von Tregs nachgewiesen werden. Aus dem Blut isolierte CD4⁺CD25⁺ Zellen allergischer Patienten zeigen im Vergleich zu nicht allergischen Spendern eine signifikant reduzierte Suppressivität der Proliferation und IL-5-Produktion allergen-stimulierter CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (114).

Die Induktion von Tregs durch symbiotische Mikroorganismen im Darm spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunen Homöostase. Intestinale Bakterien regulieren Zahl und Funktion mukosaler Tregs (115). Auch zahlreiche mikrobielle Pathogene, darunter Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze sind mit der Induktion von Tregs assoziiert (116,117). Durch ihre lokale Anhäufung am Entzündungsort kontrollieren Tregs die Entzündung während einer Infektion und limitieren beispielsweise die Zerstörung des Gewebes. Die Komposition der intestinalen Mikroflora beeinflusst die Immunkompetenz. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe des Bakteriums Clostridium kurz nach der Geburt adulte Mäuse vor der Entwicklung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (Colitis) schützt und zu einer Verminderung der systemischen IgE-Antwort in Ovalbumin-sensibilisierten und -provozierten Mäusen führt (115). Auch die neonatale Infektion mit Heliobacter pylori, einem Bakterium, das bevorzugt den menschlichen Magen besiedelt, bewahrt die Tiere effizient vor allergen-induziertem Asthma und ist mit einem Anstieg hoch suppressiver Tregs in der Lunge korreliert (118).

Die Induktion von Tregs kann bereits unter der konventionellen Asthmatherapie beobachtet werden. Ein gängiges Therapeutikum für allergisches Asthma sind inhalative Steroide. Aus der Therapie resultiert eine erhöhte Anzahl an Tregs in der bronchoalveolären Lungenlavage (113). Das Prinzip der spezifischen Immuntherapie (SIT) ist ähnlich. Hierbei wird durch sublinguale oder subkutane Verabreichung des Allergens über einen sehr langen Zeitraum orale Toleranz ausgelöst, die mit einer Anhäufung IL-10-produzierender CD4⁺CD25⁺ Zellen im Blut allergischer Patienten einhergeht (119). Nach einer Immuntherapie konnten bei Wespenallergikern IL-10-produzierende Tregs nachgewiesen werden. Es zeigte sich außerdem eine verstärkte Th1-Antwort, die der Th2-vermittelten Immunität entgegenwirkte (120). Bei Hausstauballergikern kam es nach sublingualer Immuntherapie zur Suppression von T-Zellantworten. Dabei produzierten allergen-spezifische T-Zellen *in vitro* nach 12 Monaten tendenziell mehr TGF- β und nach 24 Monaten mehr IFN- γ und IL-10 (121).

IL-10 und TGF- β agieren innerhalb der Therapie als immunsupprimierende und toleranzinduzierende Zytokine. Sie unterdrücken allergen-spezifische Th2-Antworten, induzieren die Produktion von IgG4- und IgA-Antikörpern in B-Zellen und inhibieren Mastzellen, Basophile und Eosinophile (122).

Die angesprochenen Therapien beinhalten einige Limitationen. Ein großer Nachteil ist der lange Zeitraum (mehrere Jahre) über den sie anzuwenden sind. Dabei ist die Aussicht auf Heilungserfolg nicht garantiert. Häufig setzen nach Beendigung der Medikation erneut Beschwerden ein. Neue Therapieformen, die auf die Aktivierung von Tregs abzielen sind daher von großer Bedeutung.

1.5 Humanes Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) - Hüllprotein gp120

In den achtziger Jahren konnte als Ursache für das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS, „acquired immune deficiency syndrome“) eine Infektion mit HI-Viren identifiziert werden. Heute unterscheidet man zwei Subtypen des Retrovirus, HIV-1 und -2, die sich in molarer Masse und Nukleotidsequenzen unterscheiden. Das HI-Virus hat einen Durchmesser von 100-120nm und ist von einer Lipidhülle umgeben, in die sogenannte „Spikes“ (Dornen) eingelagert sind. Bei den Spikes handelt es sich um etwa 10nm große Hüllproteinkomplexe. Auf einem Virus kommen etwa 10-15 solcher Spikes vor. Die Spikes werden aus zwei Untereinheiten gebildet. Jeweils drei Moleküle des gp120 bilden die extrazelluläre Domäne auf der Oberfläche des Proteins. Diese ist nicht kovalent an die Transmembrandomäne gebunden, die aus drei Molekülen des gp41 Proteins besteht. (123,124).

Gp120 nimmt eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese von AIDS ein. Für den Vermehrungszyklus des Virus ist es unbedingt erforderlich, denn es bindet mit hoher Affinität an den CD4-Rezeptor auf T-Zellen und Makrophagen und initiiert damit das Einschleusen der viralen RNA in die Wirtszelle (125,126). Durch die Bindung an CD4 kommt es zu einer Konformationsänderung im gp120-Glykoprotein, durch die weitere Bindungsstellen für spezifische Chemokinerezeptoren freierwerden. Bei diesen Chemokinerezeptoren handelt es sich um die Rezeptoren CCR5 und CCR4, obligatorische sekundäre Rezeptoren, die an dem Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt sind (127). Die Analyse der antigenen Struktur des gp120 zeigt, dass fast die gesamte Oberfläche des Hüllproteins hochgradig glykosyliert ist und oligomere Okklusionen aufweist, die eine Erkennung durch das Immunsystem erschweren (128).

Das Glycoprotein gp120 steuert weitere pathologische Prozesse. Interessanterweise kommt es während einer HIV-Infektion zu einer Akkumulation des IgEs im Serum der Patienten, was auf eine Verschiebung des Th1 – Th2-Balance in Richtung einer Th2-Antwort hindeutet. Mehrere Forschungsgruppen untersuchten dieses Phänomen und fanden heraus, dass das Hüllprotein des HIV-1, gp120, Superantigen für humane B-Zellen, Mastzellen und Basophile darstellt. Diese Zellen zeichnen sich durch Expression des Fcε-Rezeptors I aus, an welchen sich membranständiges IgE

anlagert. Die V_H3-Region dieses membranständigen IgEs bildet den Liganden für gp120, eine Ligation stimuliert die IL-4- und IL-13-Produktion in den entsprechenden Zellen. Im Gegensatz dazu bleibt die Synthese der Th1-Zytokine wie z.B. IFN- γ und IL-12 aus. Da die Infektion mit HIV über die Schleimhäute erfolgt, werden unmittelbar nach der Ansteckung lokale Gewebemastzellen und basophile Granulozyten zur Produktion der Th2-Zytokine stimuliert. Die Th2-gerichtete Immunaktivierung unterdrückt die durch Th1-Zytokine begünstigte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, die für die Erkennung und Vernichtung des Virus essentiell wäre (129-131).

Es wurden verschiedene Effekte durch Bindung von gp120 an den CD4-Korezeptor auf konventionellen T-Zellen beschrieben, insbesondere Anergie und Apoptose (132,133). Untersuchungen der Effekte des Hüllproteins auf Tregs hingegen zeigten, dass gp120 auf diese Zellen aktivierend wirkt und ihre suppressive Funktion verstärkt. Verschiedene Forschungsarbeiten zeigten, dass die Bindung von gp120 mit dem CD4-Rezeptor von Tregs deren Suppressoraktivität um das 2- bis 5-fache anhebt und weiterhin die Expression der Treg-assoziierten funktionalen Moleküle CTLA-4, GITR und Foxp3 steigert. Die Interaktion des HIV-Hüllproteins mit CD4 fördert außerdem das Überleben der Tregs durch Hochregulation des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2. Die resultierende Expression bestimmter Homing-Rezeptoren bezweckt ein vermehrtes und schnelleres Auswandern der Regulatoren in die lymphoiden Gewebe, in denen sie Immunantworten gegen das HI-Virus supprimieren können (134,135). Becker und Kollegen untersuchten das Treg-aktivierende Potential von gp120 *in vitro* und *in vivo* in einem xenogenen „Graft versus host Disease“ (GvHD, Transplantat-Wirt-Reaktion)-Modell und beleuchteten zusätzlich den zu Grunde liegenden Mechanismus (136). In dem Modell wurde durch Transfer humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, „peripheral blood mononuclear cells“) in neugeborene immundefiziente Mäuse eine lethale GvHD verursacht. Die einmalige Verabreichung von gp120 reichte zur Prävention der GvHD aus, vorausgesetzt, die transferierten PBMCs enthielten Tregs. Die zuvor *in vitro* gezeigte funktionale Aktivierung humaner Tregs durch das HIV-Hüllprotein gp120 konnten somit auch *in vivo* bestätigt werden. Die Ergebnisse unterstreichen die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass die TCR-unabhängige Stimulation des CD4-Korezeptors für die Aktivierung von Tregs vollkommen ausreicht (98). Die Aktivierung der Tregs basiert dabei auf einer erhöhten cAMP-Produktion, die durch die Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase (Lck) initiiert wird. Verschiedene

Wirkmechanismen werden in diesem Zusammenhang postuliert. Eine Hypothese besagt, dass durch Bindung von gp120 an CD4 der Tregs Lck aktiviert wird und die cAMP-Produktion durch Adenylatcyclase anschaltet. Die Aktivierung der Adenylatcyclase erfolgt dabei vermutlich über die Interaktion mit einem G-Protein. cAMP diffundiert dann über „GAP junctions“ zellkontaktabhängig entlang eines Konzentrationsgradienten in T-Effektorzellen. In der Effektorzelle supprimiert cAMP die Effektorfunktionen durch den cAMP-Protein kinase A (PKA) Typ I-C-terminalen Src Kinase inhibitorischen Signalweg (Abbildung 1) (137). Erhöhte cAMP-Level und eine gesteigerte Aktivierung der PKA Typ I, welche die T-Zellproliferation signifikant inhibieren, konnten auch in HIV-Patienten nachgewiesen werden und unterstützen die oben beschriebene Hypothese (138).

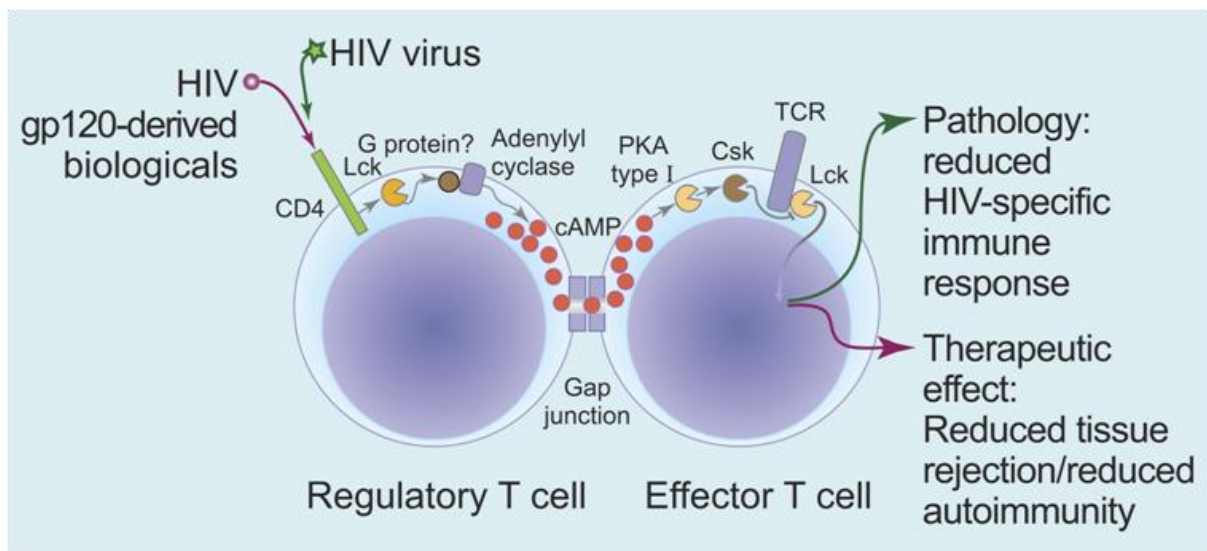


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Treg-vermittelten Immunsuppression durch cAMP nach Ligandierung von gp120 mit CD4.

(Quelle: Waking up regulatory T cells. K Taskén. Blood 6. 114: 1136)

1.6 Humanisierte Mausmodelle

Humanisierte Mausmodelle werden zunehmend für die Erforschung neuer Therapiemethoden eingesetzt. Im Gegensatz zum reinen Tiermodell können hier Effekte potentieller Wirkstoffe auf humane Zellen unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden. Humanisierte Mausmodelle können als Bindeglied zwischen Tierversuchsmodell und der klinischen Testung eines neuen Wirkstoffes an Probanden betrachtet werden. Ermöglicht werden sie durch manipulierte Mausstämme, deren eingeschränkte Immunität durch präzise Verpaarung immer ausgeprägter wurde. Heute nutzt man die Modelle für die Untersuchung humaner Erkrankungen wie Krebs, HIV, Autoimmunität und Allergie. Dabei gehören die Übertragung humaner hämatopoetischer Stammzellen, Gewebe oder die transgene Expression humaner Gene zu den gängigen Methoden.

Voraussetzung für den erfolgreichen Transfer humaner Zellen in die Maus ist deren eingeschränkte Immunität, welche die Abwehrreaktion der xenogenen Zellen eindämmt. Die Entdeckung der immundefizienten Scid-Mäuse („severe combined immunodeficiency“) 1983 war der Beginn für die Erforschung humaner Zellen unter *in vivo* Bedingungen (139). Die Scid-Mutation wurde erstmalig in CB17-Mäusen entdeckt. Tiere, die homozygot mutant sind, können keine B- und T-Zellen entwickeln. Die Mutation betrifft den Genlocus für eine Proteinkinase, die durch das Gen *Prkdc* („protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide“) codiert wird. Das *Prkdc*^{scid} Gen beinhaltet eine „nonsense“ Mutation durch die es zur Insertion eines Terminierungscodons kommt (140). Genauer ist die katalytische Untereinheit der Proteinkinase betroffen. Ohne intakte Proteinkinase ist die Umlagerung der V(D)J-Segmente bei der T- und B-Zellrezeptorentstehung nicht möglich, woraus die T- und B-Zelldefizienz resultiert. Weiterhin kommt es zu einer Beeinträchtigung der durch die Proteinkinase vermittelten DNA-Reparaturmechanismen (141).

Ein großer Nachteil der CB17-Scid Mäuse ist allerdings die Möglichkeit, dass sich mit zunehmendem Alter der Tiere spontan wieder B- und T-Zellen entwickeln können, ein Phänomen, welches als „Leakiness“ bezeichnet wird. Der Scid-Phänotyp in Assoziation mit fehlender B- und T-Zellentwicklung wurde wenig später auch durch die gezielte Mutation der Genloci *Rag1* und *Rag2* („recombination-activating gene 1, 2“) erreicht. Das Phänomen der Leakiness blieb dabei aus, was durchaus als

Verbesserung zum Prkdc^{scid}-Stamm angesehen werden konnte. Allerdings erschwerten intakte NK-Zellen und eine weitgehend funktionstüchtige angeborene Immunität die Akzeptanz fremder Zellen weiterhin (142-144). Ein weiterer Durchbruch gelang mit der Erschaffung des NOD („non-obese diabetic“, nicht fettleibig diabetisch) - Scid-Stammes, der zusätzlich zu der T- und B-Zelldefizienz Defekte in der angeborenen Immunität und eine verminderte NK-Zellaktivität zeigte, was die Akzeptanz xenogener Implantate erhöhte (145). Einschränkungen blieben aufgrund residualer angeborener Immunität, abgeschwächter aber dennoch vorhandener NK-Zellaktivität und herabgesetzter Lebenserwartung durch Lymphom-Entwicklung bestehen. Die Limitationen wurden mit der Mutation des Gens der IL-2 Rezeptor γ -Kette im NOD-Scid Stamm teilweise überwunden und somit ein neuer Stamm, der NOD-Scid γ c Stamm kreiert. Die IL-2 Rezeptor γ -Kette ist wesentlicher Bestandteil der Rezeptoren für die Zytokine IL-2, -4, -7, -9, und -15 und wird für die Signaltransduktion durch diese Rezeptoren benötigt (146). Das Fehlen der IL-2 Rezeptor γ -Kette beeinträchtigt die T- und B-Zellentwicklung und führt zu einem völligen Verlust von NK-Zellen (147).

Humanisierte Systeme für die Erforschung des allergischen Asthmas werden seit einigen Jahren eingesetzt und haben zu neuen Erkenntnissen geführt. Humanisierte Mausmodelle der allergischen Atemwegsentzündung können durch den intraperitonealen Transfer humaner PBMCs generiert werden (148-151). In den Mäusen ist nach Transfer und darauffolgender Allergenprovokation eine Atemwegsüberempfindlichkeit, humanes IgE und Atemwegsinflammation detektierbar. Die Modelle werden zunehmend für die Untersuchung neuer Therapiemethoden eingesetzt. Als Beispiel dafür sei eine kürzlich erschienene Studie genannt, in der gezeigt werden konnte, dass die Suppression der Th2-Zellproliferation und deren Zytokinproduktion durch Antikörper gegen das Membranprotein TIM-1 die asthmatische Antwort humanisierter Mäuse herunterreguliert (152).

1.7 Ziele der vorliegenden Dissertation

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Immunregulation allergischer Atemwegserkrankungen. In bisher durchgeführten Arbeiten konnte eine Effektivität von gp120 auf die Entstehung einer GvHD in einem humanisierten Modell nachgewiesen werden. Diese Effekte des gp120 waren abhängig von der Anwesenheit von Tregs (136).

Wesentliche Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Die Etablierung eines humanisierten Mausmodelles der allergischen Atemwegserkrankung
2. Die Evaluation einer Intervention bzw. Behandlung mit rekombinantem gp120
3. Die Untersuchung der Rolle von regulatorischen T-Zellen als Effektorzellen der gp120 Behandlung

Im Rahmen der Dissertation wurde eine allergische Atemwegsinfektion durch Injektion humaner PBMCs von Patienten mit allergischem Asthma und nachgewiesener Sensibilisierung gegen Birkenpollen in immundefiziente Mäuse gefolgt von der intranasalen Provokation der Atemwege induziert. Dafür wurden zuerst NOD-Scid Mäuse untersucht und anschließend NOD-Scid γc Tiere verwendet.

In der Etablierungsphase wurden adäquate Transferbedingungen durch verschiedene Zusätze wie Allergen und / oder humanes IL-4 ermittelt, welche die Vitalität der humanen Zellen in der Maus und eine möglichst ausgeprägte Atemwegsinfektion begünstigen. Weiterhin wurde die Notwendigkeit verschiedener Subpopulationen der in der Maus befindlichen humanen Zellen für die Entstehung der allergischen Atemwegsinfektion untersucht.

Nach Etablierung des Modelles wurden die Effekte einer gp120-Behandlung und die Abhängigkeit dieser Effekte von Tregs analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller/Vertrieb
Ausgießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek, USA
Autoklav	3150 EL	Tuttnauer, USA
Brutschrank	Hera cell 150	Thermo scientific, Dreieich
Depletionsmagnet für 15ml Röhrrchen	Dynal MPC™-15	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Digitalfeinwaage	Sartorius Analytic AC210S	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage	Sartorius BP310S	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage	Sartorius Acculab Vicon	Sartorius, Göttingen
Dispenser	Handys Step	Brand, Wertheim
Durchflusszytometer	Facs Calibur	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Einbettstation	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek, USA
Einsatzklammern Zytofuge	Shandon Cytoclip™ Slide Clip	Thermo electron corporation, Pittsburgh, USA
Gefrierschrank -80°C		Heraeus, Hanau
Halbautomatisches Rotationsmikrotom	Cut 5056	SLEE, Mainz
ImmunoCAP® Bluttestgerät		Phadia, Uppsala, Schweden
Kühlplatte	MPS/C	SLEE, Mainz

Gerät	Modell	Hersteller/Vertrieb
Lungenfunktionsmessgerät	flexiVent-System	Scyreq, Montreal, Kanada
MACS™-Magnetfeld	quadroMACS™ Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magnetrührer	IKAMAG®RH	IKA®-Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipette	30-300µl, 12 Kanäle	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mikroskop mit Kamera	Color view BX40	Olympus, Hamburg
Pasteurpipetten	150mm	Brand, Wertheim
pH-Meter	HI 221	VWR, Darmstadt
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparierbesteck	Feine Schere, Splitterpinzette, Gefäßschere mit Knopf, anatomische Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Probenkammern Zytofuge	Shandon TPX Sample Chamber	Thermo electron corporation, Pittsburgh, USA
Rüttler	VF2	IKA®-Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Anthos Lucy 2	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Sterilwerkbank	HS15	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Szintillationszähler	Betaplate® 1205	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg

Gerät	Modell	Hersteller/Vertrieb
Tischzentrifuge	Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Trockenschrank	T6030	Hereaus, Hanau
Tubus		Eigenherstellung
Wärmeplatte	MST	SLEE, Mainz
Waschgerät für Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno™ Wash 12	NUNC, Wiesbaden
Wasserbad	ED 5A	Julabo, Seelbach
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Handstückzähler	Roth, Karlsruhe
Zählkammer	0,100mm tief 0,0025mm ²	VWR, Darmstadt
Zellerntegerät	Semiautomatic Cell Harvester	Skatron AS, Norwegen
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 40R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zytofuge	Shandon Cytospin 4	Thermo electron corporation, Pittsburgh, USA
Zytofugen-Einsatzklammern	Shandon Cytoclip™ Slide Clip	Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, USA
Zytofugen-Probenkammern	Shandon TPX Sample Chamber	Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, USA

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Labor- und Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller/Vertrieb
Abdeckfolien für ELISA		Nunc, Wiesbaden
Alufolie		Roth, Karlsruhe
Braunüle	Venofix® Safety	Braun, Melsungen
Deckglas	24 x 32mm	Menzel, Braunschweig
Deckglas	24 x 24mm	Menzel, Braunschweig
Einmal- feindosierungsspritze	Omnican, 0,01ml-1ml	Braun, Melsungen
Einmalspritze	Discardit™ II, 10ml	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Einmalspritze	Discardit™ II, 20ml	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Einmalspritzen	Injekt® 0,01-1ml	Braun, Melsungen
ELISA-Mikrotiterplatte	96-Loch-Rundbodenplatte	Nunc, Wiesbaden
Entsorgungsbeutel		Brand, Wertheim
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
FACS-Röhrchen	0,6ml Poystyrene Rundbodenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Filtereinheit	MF75 VAKU, Nylon, 500ml, 0,2µm	Fisher Scientific GmbH, Schwerte (Geisecke)
Fixierpflaster	Leukosilk®S	Beiersdorf, Hamburg
Glasfaserfilter	102 x 258mm	Wallac, Turku, Finnland
Handschuhe	Nitril	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Human Albumin 20%		CSL Behring GmbH, Marburg

Material	Modell	Hersteller/Vertrieb
Kanüle	0,4mm x 12mm, Sterican	Braun, Melsungen
Kanüle	0,9mm x 40mm, MicrolanceTM III	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 6well, mit Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 12well, mit Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 24well, mit Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 48well, mit Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 96well, mit Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten	Falcon MultiwellTM 96well, ohne Deckel	Greiner, Frickenhausen
Kyroröhrchen	CRYO.STM	Greiner, Frickenhausen
MACS- Separationssäulen	LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
Multi-Adapter für S- Monovette		Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	76 x 26mm, Mattrand	Diagonal GmbH, Münster
Objektträger	76 x 26mm, Superfrost® Plus	Menzel, Saarbrücken
OP-Garn	Polyglatin 910	Johnson-Johnson, New Jersey, USA
Pasteurpipetten aus Glas	150mm	Braun, Melsungen

Material	Modell	Hersteller/Vertrieb
Petrischalen groß	Ø 90mm	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen klein	Ø 60mm	Greiner, Frickenhausen
Pipetten und dazugehörige Spitzen	1-10µl, 10-100µl, 50-200µl, 200-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Poypropylen-Röhrchen	15 / 50ml	Greiner, Frickenhausen
Präzisions Dispenser-Tips	2,5 / 50ml	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäß	1,5ml natur, grün, rot	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	2ml	Eppendorf, Hamburg
Schutzfolie	Parafilm N	Nationalcan™, Chicago, USA
Spritzenfilter, steril	0,22µm	Roth, Karlsruhe
Stabpipetten	5 / 10 / 25ml, Cellstar®, steril	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb	70µm BD Falcon™ Cell Strainer	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
Zytofugenfilter	Shandon Filter Cards, Thick, 0,5ml	Thermo Elektron Corporation / Pittsburgh, PA, USA

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
³ [H]-Thymidin	ICN, Irvine, CA, USA
Acetyl-β-Methylcholin (Methacholin)	Sigma, Deisenhofen
Alkopharm 70	Nedalco, Heilbronn
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt

Substanz	Hersteller
Antibiotic/Antimycotic mit 100µg/ml Streptomycin, 100U/ml Penizilin, 250ng/ml AmphotericinB	PAA, Cölbe
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Birke, (ALK-lyophilisiert ^{SQ} 108 Birke)	Alk-Abelló, Wedel
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
EMEM	Bio*Whittaker Europe, Viviers, Belgien
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Applichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ x Na ₂ x 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Ficoll 1.077	PAA, Cölbe
Forene (Isofluran)	Abbott AG, Schweiz
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
Heparin-Natrium-2500 (Liquemin [®])	Ratiopharm GmbH, Ulm
IMDM	PAA, Cölbe
Isopropanol (CH ₃ CH(OH)CH ₃)	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumdisulfid (SO ₂)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Microscopy Hemacolor [®] (IVD)-Kit	Merck, Darmstadt

Substanz	Hersteller
Narcoren® 160mg/ml (Pentobarbital-Natrium)	Merial, Halbermoos
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) –Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Paraffin, weiß, DAB	Pionier®, Hansen-Rosenthal, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA), 4%	Roth, Karlsruhe
PBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen
Salzsäure, 25% (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 1M	Roth, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit rotiszint eco	Roth, Karlsruhe
Tetanustoxoid	Behring-Werke, Marburg
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau, 0,4%	Sigma, Steinheim
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Applichem, Darmstadt
Wund- und Schleimhautantiseptikum	Schülke, Hamburg
X-Vivo 15	Bio*Whittaker Europe, Viviers, Belgien
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Enzym	Anwendung	Hersteller
Kollagenase Typ IA von Clostridium hystolyticum, 513U/mg	Verdau des Lungengewebes	Sigma, Steinheim
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	ELISA	BD, Heidelberg

2.1.5 Histologische Reagenzien

Tabelle 5: Histologische Reagenzien

Substanz	Hersteller
Entellan®	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Roti-Histofix® 4,5%	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Schnellfärbung	Merck, Darmstadt
Liquid-Barrierenmarker	Roth, Karlsruhe
Roti-Histokit®	Roth, Karlsruhe
Schiffs-Reagenz	Merck, Darmstadt

2.1.6 Zellseparationsantikörper

Tabelle 6: Zellseparationsantikörper

Magnetische Beads	Referenz
CD4 MicroBeads, human	Miltenyi, Bergisch Gladbach

Magnetische Beads	Referenz
Dynabeads [®] CD3, human	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Dynabeads [®] CD4, human	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Dynabeads [®] CD8, human	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Dynabeads [®] CD25, human	Invitrogen, Oslo, Norwegen

2.1.7 Humane Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Spezifität und Isotyp	Referenz	Bestellnummer
CD3-PerCP	SK7	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	345766
CD4-PE	RPA-T4	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555347
CD4-FITC	RPA-T4	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555346
CD8-FITC	RPA-T8	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555366
CD8-PE	RPA-T8	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555367
CD25-PE-Cy7	M-A251	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	557741
CD11c-APC	B-ly6	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	559877
CD14-PE	RMO52	Maus-IgG2a	Beckman Coulter, Krefeld	A07764
CD14-PE	M5E2	Maus-IgG2a κ	BD, Heidelberg	555398
CD29-APC	MAR4	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	559883
CD45-FITC	HI30	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555482
CD45-PerCP	T29/33	Maus	Biozol, Eching	DAK-PR70129
CD56-PE	B-A19	Maus-IgG1	Diaclone, Frankreich	852.702.010

Antikörper	Klon	Spezifität und Isotyp	Referenz	Bestellnummer
CD56-APC	B159	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	555518
Integrin β_7-APC	FIB504	Ratte-IgG2a κ	BD, Heidelberg	551082
CD15-PE	HI98	Maus-IgM κ	BD, Heidelberg	555402
CD15-APC	HI98	Maus-IgM κ	BD, Heidelberg	551376
CD19-PerCP-Cy5.5	SJ25C1	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	332780
Foxp3-APC	PCH101	Ratte IgG2a κ	eBioscience, Frankfurt	17-4776
CD127-PerCP-Cy5.5	hIL-7R-M21	Maus-IgG1 κ	BD, Heidelberg	560551

2.1.8 Antikörper und Standard für den Zytokin-ELISA

Tabelle 8: Antikörper für den Zytokin-ELISA

Antikörper	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Hersteller
IL-13	Purified Rat anti-human IL-13 Einsatz: 2 μ g/ml	Biotin Mouse Anti-Human IL-13 Einsatz: 1 μ g/ml	BD, Heidelberg

Für die Berechnung der Probenkonzentrationen wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des rekombinanten IL-13 Zytokin-Standards von R&D Systems, Wiesbaden eine lineare Regression ermittelt. Die Startkonzentration des IL-13-Standards betrug 2ng/ml in der ersten Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte.

2.1.9 Puffer, Medien und Zusätze

Die eingesetzten Puffer, Medien und Lösungen wurden, sofern vom Hersteller nicht anders empfohlen, bei 4°C aufbewahrt.

2.1.9.1 Zellkultur

X-Vivo 15

Fertiges Nährmedium wurde mit 1% Antibiotic/Antimycotic versetzt und für die Zellkultur verwendet.

Plasma

Autologes Plasma der Blutspender befand sich nach der PBMC-Aufreinigung (2.2.2.1) im oberen Bereich des Polypropylenröhrchens. Zur Eliminierung unerwünschter Antikörperaktivität wurde das Plasma bei 56°C im Wasserbad 30min hitzeinaktiviert, 5min bei 3000rpm zentrifugiert und bei 4°C (längerfristig bei -20°C) verwahrt.

IMDM

(„Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium“)

Gebrauchsfertiges glutaminhaltiges IMDM wurde mit 1% Antibiotic/Antimycotic versetzt und für die Zellkultur verwendet.

EMEM

(„Eagle´s minimal essential medium“)

Gebrauchsfertiges EMEM wurde mit 1% Antibiotic/Antimycotic versetzt und zum Waschen von Zellen verwendet.

Humane Zytokine für die Zellkultur

Die humanen Zytokine IL-4 (130-093-917, 10ng/ml), IL-1 β (130-093-899, 10ng/ml) und TNF- α (130-094-015, 10ng/ml) wurden von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach bezogen und in den angegebenen Konzentrationen in die Zellkultur eingesetzt (an erster Stelle in der Klammer angegeben ist die Bestellnummer). Prostaglandin E2 (Bestellnummer: 14010) wurde von Cayman chemical, Frankreich erworben und es wurde 1 μ g/ml eingesetzt. Eine Lagerung der Zytokinstocklösungen erfolgte bei -20 bis -80°C. Humanes rekombinates GM-CSF („Leukine“, Bayer AG, Leverkusen) wurde über die klinikinterne Apotheke bestellt und in einer Konzentration von 200U/ml verwendet.

2.1.9.2 Organpräparation, Zellaufarbeitung

PBS

Für die kurzzeitige Aufbewahrung von Organen, Zellen sowie die Lungenlavage wurde gebrauchsfertiges 1xPBS („phosphate buffered saline“) von Gibco, Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

HBSS

Die Aufbewahrung und Aufarbeitung von Lymphknoten erfolgte in HBSS („Hank’s Balanced Salt Solution“) von Invitrogen, Karlsruhe.

2.1.9.3 Zusammensetzung der Lysepuffer

Gey’sche Lyse

Die Erythrozytenlyse nach Organaufschluss erfolgte mit Gey’schem Lysepuffer:

10mM Kaliumhydrogencarbonat
155mM Ammoniumchlorid
100µM EDTA
In Aqua dest., pH 7,5

ACK-Lyse

Der ACK-Lysepuffer wurde für die Aufarbeitung des Blutes für die FACS-Analyse verwendet:

150µM Ammoniumchlorid
1mM Kaliumhydrogencarbonat
100µM EDTA
In Aqua dest., pH 7,3

EDTA-Puffer

Der EDTA-Puffer wurde gegen die Gerinnung eingesetzt.

1x PBS
30mM EDTA

2.1.9.4 Zusammensetzung der Puffer für ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)

ELISA-Waschpuffer

Der Waschpuffer enthält das Detergenz Tween, welches das Auswaschen unerwünschter Proteine begünstigt:

PBS Dulbecco (9,55g/l)
10l Aqua dest.
5ml Tween

ELISA-Beschichtungspuffer

Der ELISA-Beschichtungspuffer wurde für die Adsorption des Primär-Antikörpers an den Boden der ELISA-Platte benutzt:

0,1M Na₂HPO₄
In Aqua dest., pH 9 mit NaH₂PO₄

ELISA-Blockpuffer

Für die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der ELISA-Blockpuffer angewandt:

1xPBS
1% (w/v) BSA

ELISA-Puffer

Der ELISA-Puffer diente zur Verdünnung der Proben und des Standards:

1xPBS
0,1% (w/v) BSA

ELISA-Substratlösung

Als Substratlösung für die enzym-vermittelte Reaktion kam das TMB Substratreagenz-Set von eBioscience zum Einsatz.

ELISA-Stopplösung

Für das Abstoppen der enzymatischen Substratumsetzung wurde 1M Schwefelsäure eingesetzt.

2.1.9.5 Zusammensetzung der Puffer für die Blutaufreinigung

PBS, Liquemin, EDTA

Das Spenderblut wurde nach Erhalt in PBS, Liquemin, EDTA verdünnt:

1xPBS
0,4% (v/v) Liquemin
2mM EDTA

PBS, EDTA

Zum Waschen der PBMCs wurde PBS, EDTA benutzt:

1xPBS
1mM EDTA

2.1.9.6 Magnetische Zellseparation

MACS-Puffer

(„Magnetic Activated Cell Sorting“)

1xPBS
2mM EDTA
5% (v/v) FCS

Puffer für Dynalbead-Depletion

EMEM
2% (v/v) HSA

2.1.9.7 Puffer für die Durchflusszytometrie

FACS-Färbepuffer

PBS
1% (v/v) FCS
1% (v/v) Natriumazid

FACS-Fixierpuffer

PBS
4% (w/v) Paraformaldehyd

Foxp3-Färbepufferset

Das Foxp3-Färbepufferset wurde für den intrazellulären Proteinnachweis benutzt und gebrauchsfertig von eBioscience (Bestellnummer: 00-5523) bezogen.

2.1.9.8 Puffer für die Histologie

TRIS-Puffer, pH 7,6

6,1g TRIS
8,77g NaCl
200ml Aqua dest.
40ml HCl
Auffüllen auf 1l mit Aqua dest.

2.1.10 Antikörper für die polyklonale Stimulation von T-Zellen

Im Rahmen des Proliferationstest (2.2.2.6) wurden T-Zellen durch Antikörper gegen CD3 (0,5µg/ml, Klon UCHT1, R&D Systems) und CD28 (1µg/ml, Klon CD28.2 NA/LE, BD Bioscience) unspezifisch zur Proliferation angeregt (Positivkontrolle).

2.1.11 Allergene

Als Allergene kamen Birkenpollenextrakt (ALK-Abelló, Wedel) und Tetanustoxoid (Behring-Werke, Marburg) zum Einsatz. Die Allergene wurden unkonserviert in lyophilisierter Form bezogen und vor Gebrauch in PBS gelöst.

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und Blutentnahme

Die humanen PBMCs für die Humanisierung der immundefizienten Mäuse wurden aus 200ml Vollblut freiwilliger Spender gewonnen. Die totalen und spezifischen IgE-Titer im Serum der Allergiker sowie jene der gesunden Spender wurden mit Hilfe des ImmunoCAP Bluttestgerätes der Firma Phadia bestimmt. Phadia kategorisiert die Stärke der Allergie nach Höhe der spezifischen IgE-Antikörperkonzentration im Serum der Patienten und teilt sie in die Klassen 1-6 ein, wobei die Allergie nach einer Einteilung in die Klassen 4, 5 und 6 besonders stark ausgeprägt ist und mit einer gesteigerten IgE-Konzentration korreliert. Für die Experimente wurden ausschließlich Allergiker mit hohen spezifischen IgE-Titern gegen das Birken-Allergen ausgewählt (CAP-Klasse 4-6). Die Charakteristika der allergischen Spender sind in Tabelle 9 aufgeführt. Das Blut wurde zunächst in 20ml Spritzen gesammelt, die zuvor (unter sterilen Bedingungen) mit etwa 50µl Heparin versetzt wurden, um der schnell einsetzenden Blutgerinnung entgegenzuwirken. Die Aufreinigung der humanen PBMCs erfolgte unverzüglich nach Blutentnahme (2.2.2.1).

Tabelle 9: Totales und Birken-spezifisches IgE der Birkenpollenallergiker

Patient	Geschlecht	Alter	Total-IgE (kU/l)	Birken- spezifisches IgE (kU/l)	CAP Klasse
1	weiblich	30	1175	>100	6
2	männlich	58	719	50,3	5
3	männlich	44	953	89	5
4	weiblich	48	2741	84,2	5
5	weiblich	43	339	>100	6
6	männlich	43	451	53,8	5
7	männlich	55	153	51	5

Patient	Geschlecht	Alter	Total-IgE (kU/l)	Birken- spezifisches IgE (kU/l)	CAP Klasse
8	männlich	28	641	>100	6
9	weiblich	54	489	24,8	4

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Sowohl die Aufreinigung als auch die Kultivierung von Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Arbeiten wurden an sterilen Werkbänken vollzogen wobei ausschließlich sterile Gebrauchsmaterialien verwendet wurden. Die Materialien wurden entweder steril vom Hersteller geliefert oder vor Gebrauch im laboreigenen Autoklaven sterilisiert. Festkörper und Flüssigkeiten wurden bei 121°C bei 3bar für 20min autoklaviert. Flüssigkeiten wurden alternativ mit sterilen Spritzenfiltern oder unter Verwendung von Filtereinheiten sterilisiert. Die Sterilisation gläserner Gebrauchsmaterialien erfolgte für 3 Stunden bei 180°C. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C im Brutschrank unter 5% CO₂-Begasung in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre verwahrt.

2.2.2.1 Gewinnung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll

Die PBMCs wurden aus 200ml frischem peripherem Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bei der Dichtezentrifugation werden Zellen abhängig von ihrer Dichte in verschiedenen Bereichen stabilisiert. Zu Beginn wurde das Blut auf 8 50ml-Röhrchen verteilt, die zuvor mit 10ml vorgewärmtem PBS, Liquemin, EDTA befüllt wurden. Das Blut-Puffer-Gemisch wurde dann vorsichtig mit 10ml Ficoll unterschichtet, wobei ein Vermischen der beiden Phasen vermieden wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 2.000rpm für 20min bei Raumtemperatur (RT), nach welcher deutlich die unterschiedlichen Phasen zu sehen waren (siehe Abbildung 2).

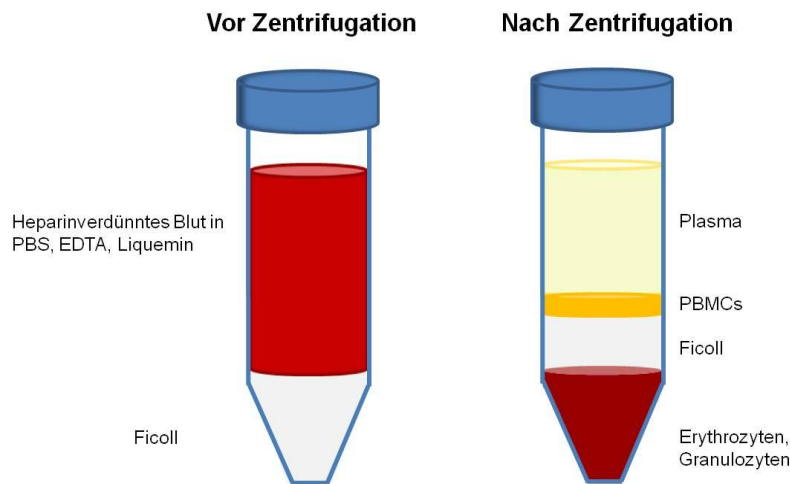


Abbildung 2: Isolierung humaner PBMCs mit Ficoll

Im oberen Bereich des Röhrchens sammelte sich aufgrund seiner geringen Dichte in Folge der Zentrifugation der flüssige Bestandteil des Blutes, das Blutplasma, in dem auch die leichten Thrombozyten verblieben. Unter dem Blutplasma über dem Ficoll befanden sich in einem dünnen Ring die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), vorwiegend Lymphozyten und Monozyten. Am Boden des Röhrchens sammelten sich Erythrozyten und Granulozyten. Aus jedem Röhrchen wurden einige ml des Serums entnommen, in einem frischen Röhrchen vereint und hitzeinaktiviert (2.1.9.1). Zur Gewinnung der PBMCs wurden diese nun vorsichtig mit einer Stabpipette aufgenommen und in ein neues Röhrchen, in welches bereits etwas PBS, EDTA vorgelegt worden war, überführt. Um restliche Thrombozytenanteile auszuwaschen, wurden die PBMCs nun solange mit PBS, EDTA gewaschen (Zentrifugation bei 1.400rpm, 5min), bis die Trübung des Überstandes deutlich nachließ. Zu beachten ist, dass das Zellpellet nach dem ersten Waschschrift noch nicht fest ist, weshalb nicht die gesamte Flüssigkeit abgeschüttet werden sollte. Nach adäquaten Waschschriften wurde die Zellzahl ermittelt.

2.2.2.2 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension 1:2, 1:5 oder 1:10 in Trypanblau verdünnt. Die gut resuspendierte Verdünnung wurde dann in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Trypanblau durchdringt die Zellmembran toter Zellen und bindet an Proteine des Zytoplasmas. Tote Zellen werden somit unter dem Mikroskop durch ihre blaue Färbung von lebenden Zellen differenzierbar. In der Zählkammer von Neubauer befinden sich vier größere

Quadrate, bestehend aus 16 Kleinquadraten. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde mindestens eines der vier Kleinquadrate ausgezählt, wobei die toten, blau gefärbten Zellen ausgelassen wurden. Die Zellzahl konnte dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\begin{aligned} & \text{Zellzahl der 16 Kleinquadrate} / \text{Anzahl größere Quadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \\ & \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)} \\ & = \text{Zellzahl / ml} \end{aligned}$$

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Überschüssige PBMCs oder zu einem späteren Zeitpunkt für *in vitro* Ansätze benötigte Zellen wurden bei -80°C kryokonserviert. In einem Kryoröhrchen konnten bis zu 1×10^8 Zellen eingefroren werden. Dafür wurden die Zellen zentrifugiert und in 450µl X-Vivo15 aufgenommen. Dazu wurden 450µl autologes Plasma pipettiert. Nach Zugabe von 100µl DMSO wurde das Röhrchen invertiert und unverzüglich bei -80°C gelagert. DMSO wirkt als Gefrierschutz, der die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellen zerstören würden, verhindert. Aufgrund seiner Toxizität ist das sofortige Einfrieren nach Zugabe unverzichtbar.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen kurz (ca. 1 min) bei 37°C im Wasserbad erhitzt und dann in 30ml PBS gegeben. Die Zellen wurden 5min bei 1.400rpm zentrifugiert, um das DMSO auszuwaschen. Das Waschen der Zellen wurde durch Zugabe von 20ml PBS und Zentrifugation noch einmal wiederholt. Anschließend konnten die Zellen in Puffer oder Medium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt werden.

2.2.2.4 Separation von CD4⁺ Zellen mit magnetischen Beads

Die Isolation von humanen CD4⁺ Zellen entweder direkt aus den PBMCs oder aus den Milzzellen humanisierter NOD-Scid γ c Mäuse an Tag 24 nach der Rekonstitution mit den humanen Zellen erfolgte mit einer magnetischen Separationstechnik von Miltenyi (MACS, „Magnetic Activated Cell Sorting“). Bei den dabei verwendeten Mikro-Beads („MACS MicroBeads“) handelt es sich um spezifische Antikörper gegen CD4 auf der Oberfläche von humanen T-Helferzellen, die an superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 50nm gekoppelt sind. Sie sind von einer

biologisch abbaubaren Matrix umgeben, was ein Entfernen der Beads nach Separation unnötig macht. Die Bindung der Beads an die separierten Zellen hat nachweislich keinen Einfluss auf deren Funktion oder Aktivität. Die MACS MicroBeads werden zusammen mit den MACS-Säulen angewandt, die in einem MACS-Separator platziert werden. Der MACS-Separator erzeugt ein hoch-gradientes Magnetfeld, das Zellen, an die magnetische Beads gebunden wurden, in der Säule zurückhält. Nicht-gebundene Zellen passieren die Säule. Durch die Platzierung der Säule außerhalb des Magnetfeldes können schließlich die markierten Zellen eluiert werden. Je nach Menge der zu separierenden Zellen können LS- oder MS-Säulen verwendet werden. Mit der MS-Säule können bis zu 1×10^7 magnetisch markierte Zellen aus einer Gesamtmenge von 2×10^8 Zellen isoliert werden. Die Kapazität einer LS-Säule ist größer und erlaubt die Separation von bis zu 1×10^8 magnetisch markierten Zellen aus einer Gesamtmenge von 2×10^9 Zellen.

Für die Separation von $CD4^+$ Zellen aus PBMCs wurden diese gezählt und bei 1.400rpm bei $4^\circ C$ für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PBMCs wurden in MACS-Puffer und MACS MicroBeads in einem Verhältnis von 5:1 aufgenommen. Dabei wurden 25 μ l MACS MicroBeads pro 1×10^8 Zellen eingesetzt. Das Zell-Bead-Gemisch wurde gut resuspendiert und anschließend bei $4^\circ C$ gelagert. Nach 25min wurden überschüssige MACS MicroBeads durch Zugabe von 20ml PBS und Zentrifugation (1.400rpm, 5min, $4^\circ C$) ausgewaschen. Zur Vermeidung von Zellverlust wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in MACS-Puffer aufgenommen (500 μ l MACS-Puffer für eine Gesamtzellzahl bis zu 1×10^8 Zellen; bei höheren Zellzahlen wurde das Puffervolumen angepasst).

Vor Zugabe der Zellen wurde die MACS-Säule in den MACS-Separator eingefügt und durch Zugabe von MACS-Puffer aktiviert (MS: 500 μ l; LS: 3ml). Nach Durchlauf des MACS-Puffers wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde unterhalb der Säule in einem 15ml Röhrchen aufgefangen. Nachdem die Zellsuspension die Säule vollständig passiert hatte, wurde sie 3-mal durch Zugabe von MACS-Puffer gewaschen (MS: 3 x 500 μ l; LS: 3 x 3ml), dabei wurde erst neuer Puffer hinzugefügt, wenn das Säulenreservoir vollständig leer gelaufen war. Nach den Waschsritten wurde die Säule aus dem MACS-Separator entfernt und auf einem neuen 15ml Röhrchen platziert. Zur Elution wurde MACS-Puffer auf die Säule pipettiert (MS: 1ml; LS: 5ml) und mit dem Stempel durch die Säule gedrückt. Die Reinheit der $CD4^+$ Zellen wurde mittels FACS-Färbung überprüft.

2.2.2.5 Generierung von dendritischen Zellen (DCs)

Humane DCs wurden aus der CD4-negativen Fraktion der MACS-Separation (2.2.2.4) generiert. Die Vorläufer dendritischer Zellen befinden sich in Form von Monozyten im Blut und können aufgrund ihrer Eigenschaft, an Kunststoffoberflächen zu adhären einfach von den übrigen Zellen des Blutes getrennt werden.

Die Generierung dendritischer Zellen erfolgte in 12-Loch- oder, bei größeren Zellzahlen, in 6-Loch-Platten. Pro Vertiefung wurde 1ml (2ml) IMDM mit 3% autologem Plasma vorgelegt. Im Anschluss wurden 5×10^6 (10×10^6) CD4-negative Zellen in einem Volumen unter 500 μ l hinzugefügt. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen wurde durch leichtes Schwenken der Platte gewährleistet. Während der folgenden 45-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank adhärten die Monozyten an den Boden der Kulturplatte. Eine Anlagerung von B-Zellen wurde dabei durch das im Medium vorhandene autologe Plasma verhindert. Anschließend wurde der Überstand in den Vertiefungen der Platte abgesaugt und 1,5ml (3ml) vorgewärmtes PBS hinzugegeben. Jede Vertiefung wurde dann vorsichtig 3-mal durch Aufziehen und Ablassen des PBS gespült und der Überstand abgesaugt. Auf diese Weise wurden alle nicht-adhären Zellen entfernt. Zurück blieben die fest am Boden haftenden Monozyten. Es wurde noch 2 weitere Male PBS hinzugegeben und abgesaugt, wobei jedoch kein mehrmaliges Spülen der Vertiefung erfolgte.

Für die Generierung der DCs wurden die Monozyten in 1,5ml (3ml) X-Vivo aufgenommen, das 1-2%ig mit autologem Plasma versehen wurde. Weiterhin wurde das Medium der Zellkultur mit den DC-spezifischen humanen Wachstumsfaktoren GM-CSF (200U/ml) und IL-4 (10ng/ml) versetzt, die eine Differenzierung der Monozyten in unreife DCs fördern. Nach 3 Tagen wurden am oberen Flüssigkeitsrand 400 μ l (800 μ l) Medium entnommen und ersatzweise 500 μ l (1000 μ l) frisches X-Vivo inklusive 1-2% autologem Plasma, 200U/ml GM-CSF und 10ng/ml IL-4 hinzupipettiert. Nach 6 Tagen wurden die immaturren DCs ausgereift. Hierzu wurde zunächst wieder verbrauchtes Medium entnommen. Dem frischen Medium wurden zusätzlich zu GM-CSF, IL-4 und 1-2% autologem Plasma die proinflammatorischen Zytokine IL-1- β (10ng/ml), TNF- α (10ng/ml) und Prostaglandin PGE₂ (1 μ g/ml) hinzugefügt. Zu beachten war hierbei, dass sich die jeweilige Konzentration der neuen Supplemente nun auf das Gesamtvolumen anstatt nur auf die ersetzte Menge bezog. An dieser Stelle wurde der DC-Kultur auch Allergen in einer Konzentration

von 20µg/ml (Birke) bzw. 1µg/ml (Tetanustoxoid) beigefügt. Die Maturierung der DCs wurde an Tag 8 abgeschlossen. Da mit der Ausreifung der Zellen eine herabgesetzte Adhärenz einhergeht, konnten die überwiegend im Medium befindlichen Zellen leicht abgenommen werden. Die restlichen DCs wurden durch mehrmaliges Abspülen mit kaltem PBS gelöst. Zum Schluss wurden die DCs zentrifugiert (1.200rpm, 10min, 4°C), zur Auswaschung überschüssiger Zytokinreste erneut in 10ml PBS resuspendingiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte nach Zugabe von 300-500µl Medium.

2.2.2.6 Proliferationsassay

Dieser Test wurde dazu verwendet, die Proliferationsraten humaner CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen zu ermitteln. Die Kokultur mit DCs und T-Zellen wurde in 96-Lochplatten (flacher Boden) durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 10⁴ DCs und 10⁵ T-Zellen in 200µl X-Vivo (1% Antibiotic/Antimycotic, 5% autologes Serum) eingesetzt (Triplikatansätze).

Die Proliferationsrate wurde durch Zugabe radioaktiv markierter DNA-Nukleotide nachgewiesen. Diese werden bei der Replikation der DNA vor einer Zellteilung in die neusynthetisierte DNA eingebaut und aufgrund des semikonservativen Replikationsmechanismus auf Mutter- und Tochterzellen übertragen. Die Proliferationsrate kann im Anschluss durch Detektion der Strahlung ermittelt werden. Als radioaktives DNA-Nukleotid wurde Thymidin ([³H]-TdR) verwendet. Dieses wurde nach 5-7 Tagen Zellkultur in einer Konzentration von 1µCi/Vertiefung hinzugegeben und die Zellkultur für weitere 8 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der 8 Stunden wurden die Platten bei -20°C eingefroren. Für die Messung der Interkalation des [³H]-TdR in die DNA wurde ein Flüssigkeits-Szintillationszähler verwendet. Nach dem Auftauen der Platte wurden Flüssigkeit und Zellen mittels eines Zellerntegerätes aufgesaugt und über einen Glasfaserfilter geleitet, welcher die DNA bindet. Überschüssiges [³H]-TdR sowie restliche Zellfragmente wurden dann durch Spülen mit Wasser entfernt und die Filtermembran für mindestens 15min bei 100°C getrocknet. Die an den Glasfaserfilter gebundene DNA wurde im Anschluss im Szintillationsmessgerät detektiert. Die Filtermembran wurde dazu in einer Plastikfolie mit 10ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Diese Flüssigkeit verstärkt die schwache β-Strahlung des [³H]-TdR, indem es die die Strahlung absorbiert und somit auf ein höheres energetisches Niveau gelangt. Bei Rückkehr in den Grundzustand

werden Lichtquanten emittiert, die mit Hilfe des Szintillations-Messgerätes erfasst werden können. Das Gerät detektiert dabei die Anzahl der gemessenen Lichtquanten pro Minute (cpm, „counts per minute“). Mittels der erfassten Lichtquanten kann die Proliferationsrate in dem entsprechenden Ansatz ermittelt werden.

Bei Bedarf konnten vor Zugabe des [³H]-TdR 150µl Überstand / Vertiefung für die Zytokinbestimmung separiert werden. Der Verlust wurde durch 150µl frisches Kulturmedium ersetzt.

2.2.2.7 Depletion von Zellpopulationen mit Dynabeads

Zur Depletion verschiedener T-Zellsubtypen wurde die Dynabead-Technik von Invitrogen (Darmstadt) genutzt. Das Verfahren eignete sich hervorragend für die negative Selektion verschiedener Zellsubpopulationen, wobei die Zielzellen gebunden und entfernt wurden und die restlichen Zellen unversehrt blieben.

Die Depletion erfolgte dabei mittels magnetischer Dynabeads mit verschiedenen Spezifitäten. Dynabeads sind magnetische Beads mit einem Durchmesser von 4,5µm. Sie sind mit einem spezifischen Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül besetzt. Die an die Dynabeads gebundenen Zellen werden durch ein Magnetfeld sichtbar an den Rand des sie beinhaltenden Röhrchens gedrängt und nicht gebundene Zellen können mit einer Pipette aufgenommen und separiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Dynabeads mit einer Spezifität gegen die auf T-Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ und CD25⁺ eingesetzt. Nach der Isolierung der PBMCs über Ficoll und anschließender Zellzahlbestimmung wurden diese bei 4°C unter Rotation in 4ml EMEM, 2% HSA mit den Dynabeads inkubiert. Für die Depletion von CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen wurde ein bead pro PBMC eingesetzt, für die CD25-Depletion 0,5 beads pro Zelle (bead-Konzentration: 400x10⁶/ml). Nach Ablauf von 20min wurden zusätzlich 3ml EMEM, 2% HSA hinzugegeben und die Inkubation für weitere 10min fortgesetzt. Im Anschluss wurde das Röhrchen mit der Zell-Bead-Suspension für 2min in dem Magnetfeld des Depletionsmagneten platziert. Die Überstände wurden gesammelt. Überschüssige Beads wurden 3-mal durch Resuspension der Zellen in EMEM, 2% HSA und erneuter 2-minütiger Platzierung im Magnetfeld herausgewaschen. Für einen effizienteren Depletionserfolg wurde der Vorgang mindestens 1-mal wiederholt.

2.2.3 Experimentelle Abläufe

2.2.3.1 NOD-Scid

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde die Zellzahl der zu transferierenden humanen PBMCs für den NOD-Scid Stamm auf 80×10^6 festgelegt. Um die günstigsten Bedingungen für den Erhalt der humanen Zellen in der Maus zu ermitteln, wurden zu Beginn der Experimente verschiedene Bedingungen ausgetestet. PBMCs wurden ohne Zusätze in PBS oder mit $50 \mu\text{g}$ Birkenallergen oder 10ng des humanen rekombinanten IL-4 oder Birke und IL-4 intraperitoneal in die Mäuse injiziert. An Tag 7 wurde die Gabe des Allergens und oder IL-4 entsprechend der Behandlung an Tag 0 wiederholt. Alternativ wurde den Tieren nach PBMC-Gabe ohne Zusätze PBS injiziert. Die intranasale Provokation der Atemwege erfolgte nach Isofluranbetäubung (2.2.5) an den Tagen 20 bis 22 einmal täglich. 48h nach der letzten intranasalen Behandlung erfolgte die Analyse der Tiere.

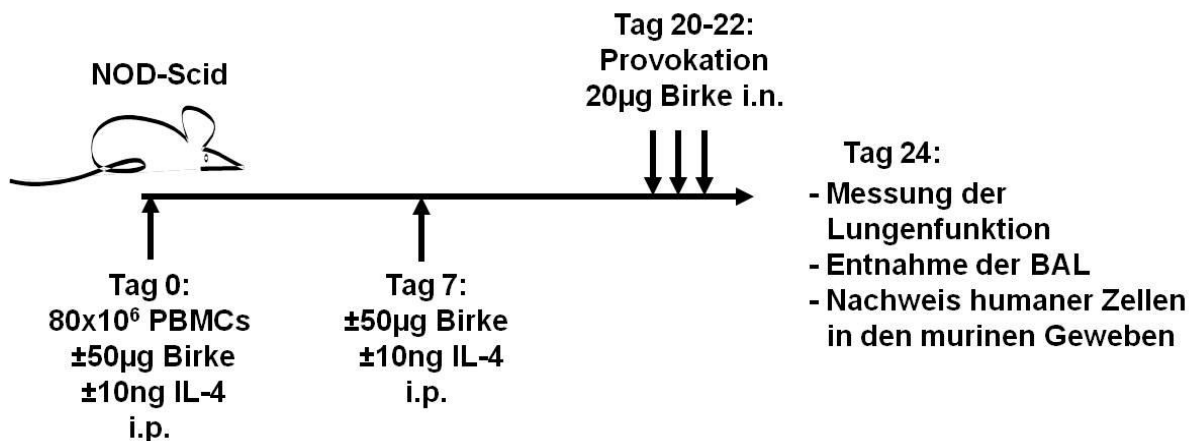


Abbildung 3: Experimenteller Ablauf der Humanisierung des NOD-Scid Stammes.

(i.p. intraperitoneal, i.n. intranasal)

2.2.3.2 NOD-Scid γc

Für den NOD-Scid γc Stamm konnte im Verlauf des experimentellen Parts dieser Dissertation eine adäquate Transferzahl von 5×10^6 PBMCs evaluiert werden. Auch in den NOD-Scid γc Mäusen wurden wie zuvor im NOD-Scid Stamm unterschiedliche Bedingungen für einen möglichst erfolgreiche Humanisierung in Assoziation mit einer ausgeprägten Atemwegsinflammation getestet. Die PBMCs wurden ohne Zusätze, mit Birke, IL-4 oder Birke und IL-4 injiziert. An Tag 7 wurden die Mäuse wie bei Zelltransfer behandelt. Tiere, die nur PBMCs erhielten, wurden mit PBS behandelt.

Die Provokation mit dem Birken-Allergen erfolgte an den Tagen 20-22 und die Analyse 48h nach der letzten intranasalen Behandlung.

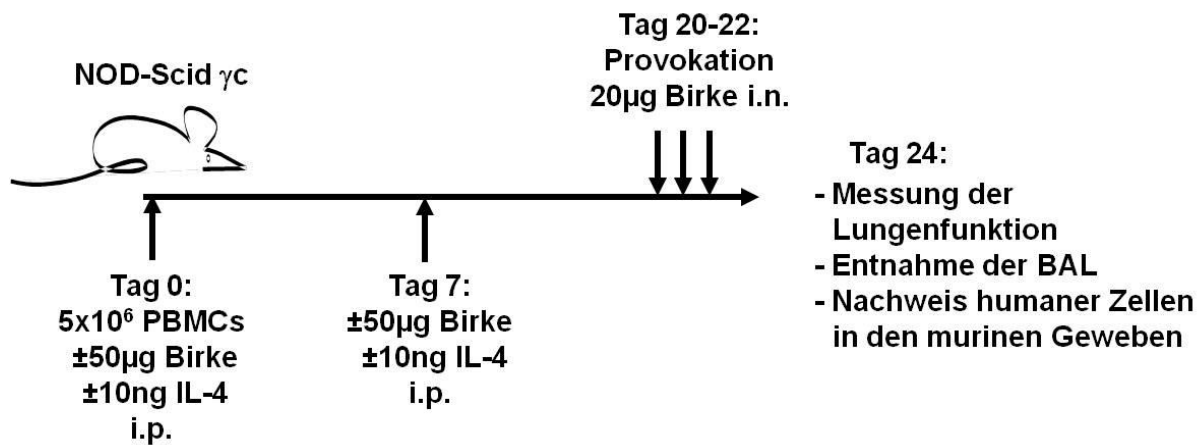


Abbildung 4: Experimenteller Ablauf der Humanisierung des NOD-Scid γ c Stammes.

(i.p. intraperitoneal, i.n. intranasal)

2.2.4 Behandlung mit gp120

In den ersten Experimenten wurden die Tiere an Tag 0 bei Zellgabe mit $20 \mu\text{g}$ gp120 behandelt. Das gp120 wurde freundlicherweise von Böhlinger Ingelheim zur Verfügung gestellt und über Christian Becker, Mitarbeiter der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz, bezogen. Um die therapeutische Wirkung des Proteins zu erfassen, wurde gp120 an Tag 18 appliziert. Das gp120 wurde hierbei in einem Gesamtvolumen von $250 \mu\text{l}$ PBS intraperitoneal injiziert. Die gp120-Behandlung wurde bei Mäusen angewandt, welche die humanen PBMCs in Kombination mit Birke und IL-4 erhielten.

2.2.5 Intranasale Provokation der Atemwege – Betäubung mit Forene

Für die intranasale Behandlung der Mäuse wurden 2-5ml Forene in den unteren Teil eines Exsikkators gegeben und die zu behandelnde Maus auf die Siebplatte gesetzt. Die Behandlung wurde durchgeführt, sobald die Tiere den Stellreflex verloren und eine gleichmäßige ruhigere Atmung einsetzte.

2.2.6 Narcoren-Gebrauchslösung

Zur Messung der Lungenfunktion wurden die Tiere mit Narcoren anästhesiert. Dieses wurde 1:5 in PBS verdünnt. Den Tieren wurden 100µl pro 20g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht.

2.2.7 Zelltransfer in immundefiziente Mausstämmen

Nach Ermittlung der Lebendzellzahl wurden die Zellen in PBS aufgenommen und in einem Gesamtvolumen von 250µl intraperitoneal appliziert. Sofern weitere Zusätze (Allergen, IL-4) appliziert wurden, wurden deren Volumina von der PBS-Menge subtrahiert, so dass nicht mehr als 250µl in die Mäuse injiziert wurden.

2.2.8 Lungenfunktion

Die Überempfindlichkeit der Atemwege infolge krankhafter Veränderungen der Lunge gehört zu den Symptomen des allergischen Asthmas und kann in der Klinik anhand einer Lungenfunktionsmessung am Patienten aufgedeckt werden. Dabei erfolgt die aerosole Provokation der Atemwege mit Bronchokonstriktoren wie z.B. Methacholin. Bei asthmatischen Patienten kommt es in Folge der Methacholinprovokation zur Atemwegsverengung korreliert mit der Obstruktion des Atemflusses. Die daraus resultierenden Druckveränderungen können anhand der Lungenfunktionsmessung in einem Plethysmographen erfasst werden und geben Aufschluss über die Schwere der Erkrankung.

Im Tiermodell kann die Lungenfunktion nicht-invasiv wie oben beschrieben in einem Plethysmographen gemessen werden oder auch invasiv durch Intubation der Trachea. Bei der nicht-invasiven Lungenfunktionsmessung werden die Mäuse in die Kammer eines Ganzkörper-Plethysmographen gesetzt und diese wird luftdicht verschlossen. Vor Zufuhr steigender Dosen des Bronchokonstriktors wird der Atemstrom der Mäuse nach Inhalation von PBS erfasst und als Basislinie festgehalten. Anschließend erfolgt die Messung der Lungenfunktion unter Methacholin-Gabe. Die Versuchstiere werden dabei etappenweise steigenden Methacholindosen ausgesetzt. Das Methacholin wird dazu aerosolisiert und in die Kammern geleitet. Zwischen den Dosen erfolgt eine mehrminütige Pause. Durch In-

und Expiration der Tiere wird der Innendruck der Kammer ständig komprimiert und gedehnt. Die Druckänderungen werden durch ein Potentiometer verstärkt und an einen Computer weitergeleitet. Dieser berechnet aus Maximaldruck bei In- und Expiration im Verhältnis zur Zeitspanne zwischen früher und später Ausatmung den dimensionslosen Parameter „enhanced Pause“. Während jeder Dosis wird eine gewisse Anzahl von Lungenfunktionswerten erfasst, aus denen nach der Messung der Mittelwert berechnet wird. Neben dem großen Vorteil mit der nicht-invasiven Lungenfunktionsmessung ein Tier mehrmals analysieren zu können, birgt diese Methode leider zahlreiche Nachteile. Zum einen konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gegenüber äußeren Einflüssen wie Zeitpunkt der Begasung, Temperatur des Inhalationsmediums oder Hyperoxie nachgewiesen werden. Zum anderen garantiert die Methode keinen genauen Einblick in die Lungenmechanik, da der gemessene Atemwegswiderstand durch Einfluss der nasalen Kompartimente oder der Kehlkopfföffnung verfälscht werden kann.

2.2.8.1 Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem FlexiVent-System

In der vorliegenden Arbeit wurde die invasive Methode für die Analyse der Lungenfunktion genutzt. Diese umgeht die Beeinträchtigung durch äußere Einflüsse und ermöglicht in Folge der Intubation die lokale Analyse der Lungenfunktion. Die invasive Messung der Lungenfunktion erfolgte mit dem FlexiVent System. Das Prinzip der Lungenfunktionsmessung mit dem FlexiVent System beruht auf Kontrolle der mechanischen Ventilation des Tieres und Erfassung der Lungenmechanik. Für die Lungenfunktionsmessung wurden die Mäuse anästhesiert und intratracheal intubiert, d.h. es wurde ein Tubus in die Trachea eingeführt. Der Tubus wurde mit OP-Garn luftdicht umwickelt und an das Lungenfunktionsmessgerät angeschlossen. Anhand des FlexiVent-Systems werden pulmonaler Widerstand (R_L) und dynamische Compliance (C_{dyn}) mit der sogenannten „Forced oscillation technique“ (FOT) ermittelt. Die FOT wurde erstmalig 1956 beschrieben (153). Bei der FOT werden die Schwingungseigenschaften des respiratorischen Systems durch Applikation eines oszillierenden Signals in die Lunge analysiert, wodurch Rückschlüsse auf den Gesamtwiderstand des respiratorischen Traktes geschlossen werden können. Der Gesamtwiderstand wird dabei auch als Atemwegsimpedanz bezeichnet. Das oszillierende Signal wird von einem computergesteuerten Kolben erzeugt, wodurch in der Lunge ein charakteristisches Schwingungsmuster resultiert. Durch

computergesteuerte Ventilation wird das Lungenvolumen definiert, Druckänderungen werden durch Sensoren detektiert. Die Impedanz kann aus dem Verhältnis der absoluten Druckänderung zur absoluten Volumenänderung errechnet werden. Sie setzt sich aus den Parametern Widerstand und Reaktanz der Atemwege zusammen. Durch Konfrontation mit dem Bronchokonstriktor Methacholin erhöhen sich in Folge der Atemwegsverengung bei asthmatischen Tieren Druck und damit auch Impedanz. Durch Anwendung einer komplexen Lungenfunktionsgleichung, dem Konstante-Phase-Modell, können anhand der FOT geringste Änderungen der Lungenmechanik berechnet werden.

Der pulmonale Widerstand ist ein Maß für die Verengung der Atemwege und Gasfluss im Lungengewebe und setzt sich aus der Summe des Atemwegswiderstandes (R_{aw}) und des Gewebewiderstandes (R_{ti}) zusammen. Der pulmonale Widerstand kann aus dem Quotient der transpulmonalen Druckdifferenz (ΔP_{TP}) zur Flussdifferenz (ΔF) errechnet werden:

$$R_L = \Delta P_{TP} / \Delta F$$

Die dynamische Compliance ist ein Maß für die elastische Dehnbarkeit der Lunge und kann aus dem Quotient der Änderung des Lungenvolumens (ΔV) zur transpulmonalen Druckdifferenz (ΔP_{TP}) errechnet werden:

$$C_{dyn} = \Delta V / \Delta P_{TP}$$

Für die Bestimmung des pulmonalen Widerstandes (R_L) und der dynamischen Compliance (C_{dyn}) werden transpulmonaler Druck (P_{TP}) und Fluss (F) gemessen. Unter Berücksichtigung des Tidalvolumens (V_T) und des Tidalatemflusses (F_T) können Lungenwiderstand und dynamische Compliance errechnet werden:

$$P_{TP} = F_T \times R_L + V_T / C_{dyn}$$

2.2.8.2 Praktischer Ablauf der Lungenfunktionsmessung

Die Durchführung der Lungenfunktionsmessung erfolgte mit Hilfe der FlexiVent Software, die den Experimentator instruiert, die Steuerung der Messung ermöglicht und die Aufzeichnung der Messdaten bewerkstelligt. Nach einer 5minütigen Aufwärmphase, durch die eine stabile Druckübertragung gewährleistet wird, wurden die Ventilationsparameter eingestellt und eine geeignete Vorlage („template“), die auf

Elektrokardiogramm (EKG), Blutdruck und Körpertemperatur von Mäusen abgestimmt ist, ausgewählt. Im Anschluss wurde einmalig für alle Messungen eine Kalibrierung des Zylinder- und Atemwegsdruckmessers durchgeführt. Für die Kalibrierung wurden mit Hilfe eines Barometers, das an das FlexiVent-Gerät angeschlossen wurde, zwei Druckpunkte vorgegeben. Der erste Messpunkt lag bei 0cmH₂O, der zweite bei 20cmH₂O. Die folgende Eichung des Tubus wurde nach Beendigung der Lungenfunktionsanalyse eines Tieres vor Messung der nächsten Maus wiederholt, um durch den Tubus bedingte Widerstände auszuschließen. Nach Ergänzung weiterer Angaben wie Name des Experimentators, Versuchsidentifizierung, Stamm, Gruppe, Gewicht, Geschlecht und Kommentar war die Apparatur nun messbereit.

Nach wirkender Anästhesie erfolgte die Intubation der Versuchstiere. Das für die Narkose gewählte Pentobarbital schaltet das Schmerzempfinden aus und unterdrückt die Eigenatmung, welche Lungenfunktionsanalyse mit dem FlexiVent-System behindern würde. Nach Platzierung und Fixierung des Tubus wurde das Tier über diesen an das Lungenfunktionsgerät angeschlossen. Die künstliche Beatmung erfolgte mit einer Frequenz von 120 Atemzügen/min und 10ml/kg Tidalvolumen. Der positive endexpiratorische Druck wurde auf 5cm/H₂O festgelegt. Die Ermittlung des pulmonalen Widerstandes sowie der dynamischen Compliance erfolgte alle 15 Sekunden mit der „Snapshot-150“-Analyse und wurde beendet, sobald eine Plateauphase erreicht wurde. Eine erste Verneblung wurde mit 1ml PBS durchgeführt, der in den Vernebler gegeben wurde. Anschließend wurden die Atemwege mit steigenden Dosen Methacholin verdünnt in PBS provoziert (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50mg/ml). Vor Gabe des Bronchokonstriktors wurde die Beatmungsfrequenz auf 60 Atemzüge/min vermindert und das Tidalvolumen auf 30ml/kg erhöht. Anschließend wurde die Lunge kurz gebläht und das Tier vernebelt. Nach 10 Sekunden wurde das System wieder auf Standardbeatmung umgesetzt und pulmonaler Widerstand und dynamische Compliance bis zum Erreichen der Plateauphase ermittelt. Der Vernebler wurde nach jeder Messung mit Aqua dest. gesäubert und mittels Druckluft getrocknet. Zur Vorbeugung von Messfehlern wurde die beim Verneblungsprozess anfallende Kondensationsflüssigkeit während der Messung regelmäßig aus dem Vernebler entfernt.

Eine Auswertung der Lungenfunktionsmessung erfolgte mit Hilfe von Excel. Dabei wurde der maximale Wert des pulmonalen Widerstandes bzw. der kleinste Wert der

dynamischen Compliance bei PBS-Gabe und bei den einzelnen Methacholindosen ausgewählt. Anhand der erwählten Werte wurde dann der prozentuale Anstieg (R_L) bzw. Abfall (C_{dyn}) bei Methacholinprovokation im Vergleich zur PBS-Verneblung ermittelt.

2.2.9 Mauspräparation

2.2.9.1 Aufarbeitung des Blutes

Die Maus wurde ventral aufgeschnitten und das Zwerchfell durch einen Schnitt in Höhe des Herzens eingestochen und aufgetrennt. Die Blutung der Maus erfolgte durch Durchtrennung von Bauchaorta und Vena cava caudalis.

Serum

Für die Serumgewinnung wurde das Blut mit einer 1ml Spritze aufgesogen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur belassen. Durch die Lagerung setzte die Blutgerinnung ein und es bildete sich ein Blutkuchen aus Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin. Dieser wurde entnommen und es folgte ein Zentrifugationsschritt (10.000rpm, 10min, RT), wodurch die restlichen zellulären Bestandteile sedimentierten. Das Serum wurde als Überstand entnommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen und bei -20°C eingefroren.

FACS-Färbung des Blutes

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 4-5 Tropfen des Blutes in EDTA-Puffer (30mM) überführt, das Reaktionsgefäß wurde kurz geschüttelt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation (1.200rpm, 10min, 4°C) wurde der Überstand mit der Pipette abgenommen und das Zellsediment in 4ml ACK-Puffer in 15ml Rörchen überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit 1ml ACK-Puffer gespült und der Puffer anschließend zu dem restlichen ACK-Puffer gegeben. Die 15ml Rörchen wurden auf Eis gestellt. Nach 10min wurden die Rörchen mit PBS auf 15ml aufgefüllt und zentrifugiert (1.200rpm, 10min, 4°C). Nach einem zweiten Waschschritt mit FACS-Waschpuffer wurde der Überstand abgesaugt und Rücklauf mitsamt Zellen für die FACS-Färbung in 96-Lochrundbodenplatten oder FACS-Rörchen übertragen.

Messung der Konzentration der Alanin-Aminotransferase–Konzentration im Serum humanisierter NOD-Scid γ c Mäuse

Das Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) kommt überwiegend in der Leber vor und ist dort als Katalysator für die Bildung von Pyruvat essentiell. Die Konzentration des Enzyms gilt als Indikator einer GvHD-Reaktion, in deren Verlauf Hepatozyten von xenogenen T-Zellen zerstört werden und das Enzym ins Serum gelangt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ALT-Konzentrationen freundlicherweise von der zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gemessen. Die Messung erfolgte mit einem speziellen Gerät (Reflovet Plus System, Scil Animal Care Company, Viernheim, Deutschland).

2.2.9.2 Gey´sche Lyse

Erythrozyten stören Zellzählung, FACS-Analyse und Zellkultur und wurden deshalb durch Lyse aus homogenisierten Lungen- und Milzzellsuspensionen eliminiert. Für die Lyse der Erythrozyten wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1.200rpm, 10min, 4°C) und das Zellsediment auf dem Rüttler aufgelockert. Dann wurde 1ml Gey´scher Lysepuffer hinzupipettiert und das Röhrchen nochmal manuell geschüttelt. Nach genau einer Minute wurde die Lyse durch Zugabe von 10ml PBS abgestoppt und die Zellen wurden unverzüglich zentrifugiert um den Lysepuffer auszuwaschen.

2.2.9.3 Aufarbeitung der Milz

Die Milz, die sich linksseitig im hinteren Bauchraum befindet wurde mit einer Pinzette entnommen und in PBS auf Eis gelagert. Ein Zellsieb wurde in eine große Petrischale gelegt, diese mit 5ml PBS befüllt und die Milz hinzugegeben. Nun wurde die Milz mit dem Stempel einer 10ml Spritze zerrieben, wodurch die Milzzellen das Zellsieb passierten. Der Stempel wurde in die Spritze gedrückt und die Flüssigkeit mit der Spritze aufgenommen. Das Zellsieb wurde auf ein 50ml Falconröhrchen aufgesetzt und die Flüssigkeit aus der Spritze über das Sieb in das Röhrchen ausgedrückt. Die Petrischale wurde mit 10ml PBS gespült, die ebenfalls über das Sieb in die Petrischale übertragen wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1.200rpm, 10min, 4°C), die Überstände wurden verworfen. Das Zellpellet wurde kurz gerüttelt und damit aufgelockert. Nun erfolgte die Gey´sche Lyse (2.2.9.2), die mit der Zugabe von 10ml PBS abgestoppt wurde. Der Lysepuffer wurde durch 3-malige Zentrifugation (wie oben) herausgewaschen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt

wurden die Zellen gezählt und nach dem dritten auf 2×10^7 Zellen pro ml je nach weiterem Vorhaben in FACS-Waschpuffer, MACS-Puffer oder Medium eingestellt.

2.2.9.4 Gewinnung der bronchoalveolären Lavarge (BAL)

Die Analyse der BAL erlaubt einen Einblick in die Zellzusammensetzung der in der Lunge befindlichen Zellen. Zur Gewinnung der BAL wurde ein Trachealschnitt der narkotisierten Maus angefertigt und die Trachea intubiert, wobei der Tubus mit OP-Garn fixiert wurde. Anschließend wurde unter Verwendung einer Spritze 1ml kaltes PBS langsam in die Lunge gedrückt und unverzüglich wieder aufgezogen. Auf diese Weise konnten 800-900µl PBS aus der Lunge wiedergewonnen werden. Das PBS wurde in einem 1,5ml Eppendorfgefäß gesammelt und auf Eis verwahrt. Nach einer Zentrifugation (1.200rpm, 10min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und bei -80°C gelagert. Das Zellsediment wurde in 200µl PBS aufgenommen.

2.2.9.5 Aufarbeitung der Lunge

Nach Entnahme von BAL und Serum wurde der Brustkorb vorsichtig mit der Knopfschere geöffnet und entfernt oder zur Seite geklappt, um die darunter befindliche Lunge präparieren zu können. Dabei wurde streng darauf geachtet Verletzungen des empfindlichen Lungengewebes zu vermeiden. Anschließend wurde die Lunge durch Punktierung der rechten Herzkammer unter Verwendung einer 10ml Spritze und aufgesetzter Kanüle (0,4x12mm) mit PBS gespült, wodurch Erythrozyten aus den Lungenarterien entfernt wurden. Das Lungengewebe blähte sich dabei sichtlich auf. Anschließend wurde der linke Oberlappen der Lunge mit OP-Garn zunächst abgebunden und dann abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung für die FACS-Färbung in PBS auf Eis gelagert. Die restliche Lunge wurde über einen in der Trachea fixierten Tubus gekoppelt an eine 10ml Spritze mit Histofix gespült. Die Trachea wurde unterhalb des Tubus mit einer Pinzette zusammengeklemmt, um ein Auslaufen des Histofix zu verhindern und die Lunge wurde aus dem Brustkorb geschnitten und bis zur Anfertigung der Gewebeschnitte (2.2.13) in einem 15ml Röhrchen verwahrt.

Der linke Lungenlappen wurde in einer Petrischale durch Schnitte mit einer spitzen Schere sorgfältig zerkleinert und in ein 50ml Röhrchen übertragen. Die Petrischale wurde mit 2,5ml PBS gespült und die Flüssigkeit in das Röhrchen gegeben. Im

Anschluss kamen 2,5ml Kollagenase verdünnt in PBS (1mg/ml) hinzu. Das Endvolumen im Röhrchen betrug somit 5ml und die Endkonzentration Kollagenase 0,5mg/ml. Nun erfolgte der Verdau der Lunge im Wasserbad bei 37°C, wodurch das Gewebe aufgeschlossen und die Zellen zugänglich gemacht wurden. Nach einer Stunde wurde das Zellgemisch mehrmals durch eine Kanüle (0,9x40mm) an einer 10ml Spritze gezogen, wodurch eine homogene Zellsuspension entstand. Zum Ausschluss größerer Gewebefragmente wurde die Zellsuspension über ein 70µm Sieb in ein neues 50ml Röhrchen überführt. Die Lungenzellen wurden zentrifugiert (1.200rpm, 10min, 4°C) und mit Gey'schem Lysepuffer lysiert (2.2.9.2). Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurde die Zellzahl ermittelt, erneut zentrifugiert und die Zellen für die FACS-Färbung auf 2×10^7 Zellen pro ml mit FACS-Waschpuffer eingestellt.

2.2.10 Differenzierung der BAL-Zellen - Anfertigung von Zytospins

Um eine morphologische Differenzierung der BAL-Zellen durchführen zu können wurden diese auf einem Objektträger fixiert und angefärbt. Die Zellen der BAL wurden nach Zentrifugation in einem Gesamtvolumen von 200µl PBS aufgenommen (2.2.9.4). Davon wurden 100µl entnommen und in die trichterförmigen Zytofugen-Probenkammern überführt. Die Probenkammern waren zuvor auf ein gestanztes Filterpapier und einen darunter befindlichen Objektträger in Zytofugen-Einsatzklammern eingespannt und in der Zytofuge platziert worden. Durch 10minütige Zentrifugation bei 900rpm (RT) wurden die Zellen auf den Objektträger übertragen und über Nacht bei RT getrocknet. Die Fixierung und Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Microscopy Hemacolor® (IVD)-Sets von Merck (Darmstadt). Der Objektträger wurde dabei 5-mal für 1 Sekunde zunächst in Lösung 1 (Fixierlösung), anschließend in Lösung 2 und abschließend in Lösung 3 getaucht. Nach jeder Lösung wurde der Objektträger auf Papiertüchern abgetupft, um eine Verunreinigung der folgenden Lösung zu vermeiden. Nach Behandlung mit den Färbelösungen wurde der Objektträger mit sogenanntem Puffer nach Weise abgespült. Durch lichtmikroskopische Betrachtung konnten im Anschluss Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten differenziert werden. Pro Objektträger wurden um die 200 Zellen ausgezählt. Die Ermittlung der prozentualen und absoluten Zellanteile erfolgte mit Excel 2007.

2.2.11 Zytokin-ELISA

Die in Serum, BAL und Zellkulturüberständen befindlichen humanen Zytokine wurden unter Anwendung des ELISA („Enzyme-linked Immunosorbant Assay“) nachgewiesen. Das Prinzip des ELISA beruht auf Bindung spezifischer Antikörper an die zu detektierenden Proteine, Kopplung des Antikörpers an ein Substrat und anschließend dessen enzymatische Umsetzung, die mit einem Farbumschlag einhergeht.

Bei dem hier angewandten „Sandwich“-ELISA wurde zunächst der primäre Antikörper („Capture Antibody) an den Boden einer polymeren Mikrotiterplatte adsorbiert. Dies geschah über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde die Platte 2-mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und abschließend auf flüssigkeitsabsorbierenden Tüchern ausgeschlagen. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden 200µl ELISA-Blockpuffer in jedes Loch der 96-Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37°C zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten 2-mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Darauffolgend wurde eine serielle Verdünnung des Standards über zehn Löcher der Platte vollzogen sowie die zu analysierenden Proben aufgetragen. In Vorversuchen konnten nur sehr geringe Konzentrationen humaner Zytokine vor allem in BAL und Serum der humanisierten Mäuse festgestellt werden, weswegen auf eine Verdünnung der Proben verzichtet wurde. Das Endvolumen in den Löchern betrug dabei 100µl pro Loch, für die Standardverdünnungen wurde ELISA-Puffer benutzt. Nach Verweilen der Platten über Nacht bei 4°C im Kühlschrank wurden sie 4-mal gewaschen und mit biotinyliertem Detektionsantikörper (100µl / Loch) versetzt. Die Inkubation des Detektionsantikörpers erfolgte bei 37°C für 1,5-2 Stunden im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Platten 4-mal gewaschen und die restliche Flüssigkeit wurde ausgeschlagen. Nun wurden 50µl des Enzyms Rettich-Peroxidase (1:1000) pro Vertiefung der Mikrotiterplatte hinzugegeben und die Platte bei Raumtemperatur belassen. In diesem Versuchsschritt bindet das an Streptavidin gekoppelte Enzym an das Biotin des Detektionsantikörpers. Die chromogenen Substratlösungen A und B wurden zwecks erforderlicher Raumtemperatur aus dem Kühlschrank genommen. Nach einer Stunde wurde die ELISA-Platte 5- bis 8-mal gewaschen. Substratlösung A und B wurden 1:2 vermischt und 50µl pro Vertiefung der 96-Lochplatte ausgeteilt. Bei dem eingesetzten Substrat handelt es sich um

Tetramethylbenzidin (TMB), das in Gegenwart von Peroxidase-markierten Substanzen eine lösliche, tiefblaue Farbe entwickelt. Der langsam einsetzende Farbumschlag wurde aufmerksam beobachtet und nach 5 bis 10min mit Schwefelsäure abgestoppt (50µl / Loch), wodurch sich die blaue Farbe in ein leuchtendes Gelb verwandelte.

Nun konnte die optische Dichte in den einzelnen Vertiefungen mit dem Photometer bei 450nm gemessen werden und die Zytokinkonzentration durch Berechnung der linearen Regression anhand der Standardkonzentrationen mit Excel 2007 ermittelt werden.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die auch als FACS-Analyse („Fluorescent activated cell sorting“) bezeichnet wird, können Fluoreszenz-markierte Zellen detektiert und Subpopulationen unterschieden werden. Neben der Markierung von Oberflächenstrukturen bei der extrazellulären FACS-Färbung können Proteine in der Zelle durch die intrazelluläre FACS-Färbung nachgewiesen werden.

Des Weiteren analysiert das Durchflusszytometer Größe und Granularität der Zellen und ermöglicht somit auch eine grobe Differenzierung unmarkierter Zellen.

Bei der FACS-Messung werden die Zellen von einer Kapillare angesaugt und passieren daraufhin einzeln einen Laser, was zur Emission von optischen Signalen führt. Diese Signale werden von verschiedenen Fluoreszenzkanälen erfasst. Die Streuung des Lichts durch eine Zelle wird von deren Größe und Granularität beeinflusst und durch zwei Parameter wiedergegeben. Die Beugung des Lichts durch eine Zelle wird als Vorwärtsstreulicht (FSC, „Forward Scatter“) detektiert und von der Zellgröße bestimmt. Die Granularität beeinflusst die Brechung des Lichts im 90°-Winkel zur Laserachse und wird als Seitwärtsstreulicht (SSC, „Sideward Scatter“) erfasst.

Eine genauere Analyse der Zellzusammensetzung wird durch die spezifische Bindung von extra- oder intrazellulären Komponenten durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper ermöglicht. Dabei werden häufig verschiedene Farbstoffe zusammen eingesetzt. Bei Anregung der Fluorochrome durch monochromatisches Laserlicht wird ein Teil des Lichtes absorbiert und ein weiterer Teil emittiert. Die emittierten

Wellenlängen werden in einem aufwendigen System aus Filtern, Spiegeln und Linsen getrennt und in verschiedenen Fluoreszenzkanälen detektiert. Bei Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome ist zu beachten, dass es zu Überlappungen des Emissionsspektrums kommen kann. Dadurch können Fluoreszenzsignale auch in einen nicht für sie vorgesehenen Kanal gelangen. Diese Verfälschung lässt sich durch Subtraktion der überlappenden Fluoreszenzanteile rechnerisch korrigieren. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet und sollte vor jeder Messung durchgeführt werden.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte in der „FACS Core Facility“ der Universität Mainz. Für die Erfassung der Messdaten stand die Cell Quest pro Software zur Verfügung, eine genaue Auswertung erfolgte mit FlowJo (Tree Star).

2.2.12.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Durch die extrazelluläre FACS-Färbung lassen sich Zellpopulationen anhand der Markierung zellspezifischer Oberflächenmoleküle in den verschiedensten Geweben differenzieren. In dieser Arbeit wurden Zellen aus BAL, Lunge, Milz, Blut und Lymphknoten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die FACS-Färbung wurde entweder in 5ml FACS-Röhrchen oder bei größeren Ansätzen in 96-Loch-Rundbodenplatten durchgeführt. Für eine Färbung wurden 1×10^6 Zellen verwendet. Vor der FACS-Färbung wurden die Zellen auf 2×10^7 /ml mit FACS-Waschpuffer eingestellt. Nach dem Übertragen von 50 μ l der Zellsuspension in das FACS-Röhrchen bzw. die 96-Lochplatte wurden die Zellen zunächst einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen (5ml FACS-Röhrchen: Zugabe von 1ml, 96-Lochbodenplatte: Zugabe von 100 μ l FACS-Waschpuffer). Dazu erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 1.800rpm und 4°C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und die Fluoreszenz-markierten Antikörper verdünnt in FACS-Waschpuffer in einem Volumen von 100 μ l pro Ansatz hinzugegeben. Für einen schnelleren Ablauf wurden unmittelbar vor der Färbung ein „Mastermix“ der gewünschten Antikörper hergestellt, der die notwendigen Antikörperkonzentrationen/100 μ l beinhaltet. Die optimale Verdünnung der Antikörper wurde in Vorversuchen durch deren Titration ermittelt. Die Ansätze wurden geschüttelt und für 15min bei 4°C im Dunkeln verwahrt. Nach der Verwahrung wurden die Antikörper wie oben beschrieben 2-malig ausgewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen

durch Zugabe von 50-100µl FACS-Fixierpuffer fixiert. Bis zur Messung mit dem Durchflusszytometer erfolgte die Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

2.2.12.2 Intrazelluläre FACS-Färbung

Die intrazelluläre FACS-Färbung wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Foxp3 Färbepufferset von ebioscience durchgeführt. Mit der Färbung wurde die für Tregs charakteristische Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 in humanen PBMCs nach Ficoll-Aufreinigung und *ex vivo* nachgewiesen. Für die genaue Identifizierung der Tregs wurde vor der Intrazellulärfärbung eine Oberflächenfärbung von CD4, CD25 und teilweise auch CD127 durchgeführt.

Die Oberflächenfärbung erfolgte wie unter 2.2.12.1 beschrieben. Nach Auswaschen der Oberflächenantikörper erfolgte eine 30minütige Einwirkzeit mit frisch angesetztem Fixierungs/Permeabilisierungspuffer bei 4°C im Dunkeln. Wurde die intrazelluläre Färbung in 96-Lochrundbodenplatten vollzogen, wurden die empfohlenen Volumina dem kleinen Fassungsvermögen der 96-Lochbodenplatte angepasst. Nach 2-maligem Waschen mit 1x Permeabilisierungspuffer wurde der APC-konjugierte Foxp3-Antikörper verdünnt in Permeabilisierungspuffer für mindestens 30min (4°C, Dunkel) hinzugegeben. Nach Zugabe des Antikörpers wurden die Ansätze kurz geschüttelt. Das Gesamtvolumen der Färbelösung betrug 100µl. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 100µl FACS-Fixierpuffer aufgenommen und bis zur Messung im Durchflusszytometer bei 4°C dunkel gelagert.

Am FACS-Gerät wurden mindestens 10.000, überwiegend jedoch 100.000 Zellen aufgenommen.

Zur Veranschaulichung der gewonnenen Daten mittels Punkt- und Balkendiagrammen wurden die mit Hilfe des Programmes FlowJo gewonnenen prozentualen Anteile verschiedener Zellsubpopulationen genutzt. Bei Bedarf wurden diese relativen Werte dazu verwendet, die absoluten Anteile der Zelluntergruppen zu errechnen. Dazu wurden nach ihrer Aufarbeitung stets die Zellzahlen der verschiedenen Organe ermittelt. Die absoluten Werte der jeweiligen Zellsubpopulation wurden dann durch Multiplikation der Gesamtzellzahl mit dem relativen Anteil der Zellsubpopulation (%) ermittelt.

2.2.13 Histologie

Histologische Färbungen geben Aufschluss über pathologische Veränderungen eines Gewebes und bieten die Möglichkeit eine Erkrankung zu quantifizieren. Diese Möglichkeit wurde in dieser Arbeit vor allem für die Bewertung des Schweregrades der Atemwegsinfektion genutzt. Des Weiteren wurden Gewebeschnitte von Lunge, Haut, Leber, Milz und Darm angefertigt.

2.2.13.1 Fixierung der Gewebe

Die Fixierung schützt die Gewebe vor Zersetzungsprozessen und konserviert die Gewebestruktur. Vor der Entnahme der Lunge für die histologische Verarbeitung wurde diese durch eine mit Histofix befüllte 10ml Spritze gespült, wobei sich das Lungengewebe idealerweise aufblähte. Die Spritze wurde dazu an einen in die Trachea eingeführten und fixierten Tubus angebracht. Das Aufblähen der Lunge ist für eine homogene Sicht auf die Gewebestruktur unerlässlich und wirkt dem Einfallen des Gewebes entgegen. Histofix enthält Formaldehyd, ein Fixativ, das Zellstrukturen konserviert indem es die Vernetzung von Proteinen auslöst. Nach dem Spülvorgang wurde die Trachea unterhalb des Tubus mit der Pinzette zusammengedrückt und die Lunge mit der Schere aus dem Brustkorb gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Lunge in ein mit Histofix befülltes 15ml Röhrchen gegeben, ein Auslaufen des Histofix in der Lunge wurde dabei durch die umgebende Flüssigkeit verhindert. Auch ein Stück des Darmes wurde entnommen, mittels Spritze und Tubus mit Histofix aufgeblasen und in ein 15ml Röhrchen gegeben. Milz, Haut und sowie ein Leberlappen wurden entnommen und bis zur Anfertigung der Schnitte separat in Histofix verwahrt.

2.2.13.2 Einbetten der Organe

Für die Herstellung der feinen Gewebsschnitte mussten die Organe zunächst in ein festes Medium integriert werden. Dazu wurden die fixierten Organe oder Teile davon auf eine perforierte Eindeckkapsel gelegt und über Nacht entwässert. Nach der Entwässerung wurde das Organ mitsamt Eindeckkapsel auf einer Wärmeplatte platziert und eine Ausgießform mit warmem flüssigem Paraffin bedeckt. Unverzüglich wurden Eindeckkapsel und Organ in das Paraffin gedrückt, wobei das Paraffin durch die Löcher der Eindeckkapsel drang und das Gewebe durchtränkte und ummantelte.

Die Aushärtung des Paraffins erfolgte auf einer Kälteplatte bei -20°C. Nach 30min konnte das Paraffinblöckchen aus der Eindeckkapsel genommen und überschüssiges Paraffin entfernt werden.

2.2.13.3 Herstellung von Gewebeschnitten

Vor Einspannen der Paraffinblöcke in das Rotationsmikrotom wurden diese für 30min auf einer Kühlplatte bei -15°C abgekühlt. Bis zu dem Erreichen einer geeigneten Schnittebene wurden die Blöckchen mit einem Vorschub von 20µm geschnitten. Dann wurden die Blöckchen erneut einige Minuten abgekühlt, der Vorschub wurde auf 4µm vermindert und die Schnitte angefertigt. Diese wurden zwecks Streckung anschließend in ein 45°C warmes Wasserbad überführt und auf einen Objektträger überschwemmt. Auf jedem Objektträger wurden zwei Schnitte eines Organes angelegt. Eine erste Trocknung der Objektträger erfolgte für 30min bei 50°C auf einer Wärmeplatte, eine zweite bei 60°C für 20min im Trockenschrank. Die Trocknung gewährleistet die Haftung der Schnitte auf dem Objektträger.

2.2.13.4 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Um die angefertigten Schnitte färben zu können, müssen diese zunächst entparaffiniert werden, da das Paraffin aufgrund seiner Hydrophobie ein Eindringen der Färbelösung verhindert. Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte 2-mal für 5min in Xylol gegeben und anschließend in einer alkoholischen Reihe (2x2min 100%iger Alkohol, 2x2min 96%iger Alkohol, 2x2min 70%iger Alkohol) gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte 1x2minütig in Aqua dest. gewaschen.

2.2.13.5 Histologische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin (H&E-) Färbung

Die H&E-Färbung ermöglicht eine morphologische Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen und wurde für die Färbung der verschiedenen Organe genutzt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der während des Färbeverfahrens zum basischen Hämalaun umgewandelt wird. Dieses färbt dann basophile Strukturen wie Zellkerne und Desoxyribonukleinsäure blau.

Das synthetische Eosin färbt alle acidophilen Strukturen wie Zellplasmaproteine rot an.

Für die Färbung wurden die Schnitte nach Entparaffinierung im Färbegestell in Hämalaun Lösung (1:5 verdünnt in Aqua dest.) platziert, in der sie 5 bis 7min verweilten. Im Anschluss wurden die Schnitte 5min mit Aqua dest. gewaschen und dann in Eosin (Stammlösung + 6 Tropfen Eisessig) gegeben. Nach 40 Sekunden wurden die Objektträger erneut mit Aqua dest. abgespült und daraufhin in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (70%, 96%, 100% Isopropylalkohol, 100% Ethanol). Nach kurzem 2-maligem Eintauchen in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

PAS-Reaktion („Periodic acid-Schiff reaction“)

Durch die PAS-Färbung werden Glykogen, Cellulose, Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine sowie Glykolipide rötlich gefärbt. In histologischen Schnitten des Lungengewebes können dadurch mukusproduzierende Becherzellen sichtbar gemacht werden. Die PAS-Färbung besteht aus zwei Komponenten. Die Perjodsäure oxidiert freie Hydroxylgruppen der im Mukus enthaltenen Glykoproteine zu Aldehydgruppen. Das Schiff-Reagenz beinhaltet fuchsinschwefelige Säure, welche die gebildeten Aldehydgruppen bindet. Aus der Bindung resultieren im Mikroskop deutlich sichtbare rot-violette Komplexe.

Zur Färbung von entparaffinierten Lungenschnitten wurden diese für 10min in 2%iger Perjodsäure gelagert. Die Schnitte wurden kurz mit Aqua dest. abgespült und dann für 2min in Aqua dest. gelegt. Daraufhin wurden die Objektträger in einen Färbeglasbehälter mit Schiff-Reagenz gegeben. Nach 20min wurden die Schnitte 2-mal eine Minute lang mit SO₂-Wasser gewaschen, dann 10min unter fließendes Wasser gehalten und im Anschluss 2min in Aqua dest. gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte für 45 Sekunden in Hämalaun positioniert und unter fließendem Wasser gebläut. Nach der Entwässerung (2x2min 100%iger Alkohol, 2x2min Xylol) wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

Die gefärbten mukusproduzierenden Becherzellen wurden mit dem Programm „analysis“ (Olympus Soft Imaging SoftwareTM) ausgewertet, wobei die Anzahl der über 75% gefärbten Zellen pro mm Basalmembran bestimmt wurde. Auf jedem Lungenschnitt wurden auf diese Weise drei Regionen analysiert.

Histologischer Nachweis humaner CD45⁺ Zellen in der Maus

Für die histologische Färbung der unterschiedlichen Organe wurden die Schnitte zunächst 20min im Dampfgarer mit Target Retrieval Solution von Dako (Hamburg) demaskiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluss 2-mal mit TRIS-Puffer abgespült. Anschließend wurden die Schnitte für 30min in eine Färbekammer mit Primär-Antikörper gegeben. Nach 2-maligem Spülen mit TRIS-Puffer wurden die Schnitte 20min dem biotinylierten Sekundär-Antikörper ausgesetzt, worauf wieder 2-malig mit TRIS-Puffer gespült wurde. Nach einer 30minütigen Einwirkzeit mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase und 2-maligem Spülen mit TRIS-Puffer wurden die Schnitte für 5min in die Substrat-Chromogen-Lösung gegeben. Alle verwendeten Substanzen wurden von Dako (Hamburg) bezogen. Im Anschluss erfolgte noch eine Gegenfärbung mit Hämalaun (1min) nach welcher der Lungenschnitt 10min unter fließendem Wasser gebläut wurde. Nach 2-maligem kurzen Verweilen zunächst in 100%igem Isopropanol und anschließend Xylol wurden die Schnitte in Entellan eingebettet.

2.2.14 Mäuse

Die immundefizienten Mausstämme NOD-Scid (offizielle Bezeichnung: NOD.CB17-Prkdc scid) und NOD-Scid γ c (offizielle Bezeichnung: NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm 1 Wjl/SzJ) wurden von den Jackson Laboratorien (Sulzfeld) bezogen. Die Scid-Mutation („severe combined immune deficiency“, auch als Prkdc scid bezeichnet), entstand spontan in einer Kolonie von C.B-17-Mäusen. Den Mäusen fehlen T- und B-Lymphozyten. Lymphoide Organe wie Milz, Lymphknoten und Thymus der Tiere sind nur rudimentär vorhanden. Die Immunglobulin-Spiegel im Serum der Tiere sind aufgrund der fehlenden B-Lymphozyten gering. Beim NOD-Scid γ c Stamm ist die Defizienz der NK-Zellen durch den vollständigen Verlust der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors noch ausgeprägter als beim NOD-Scid Stamm (139,145,147). Es kommt zu einer erweiterten Akzeptanz allogener Transplantate, die u.a. den Transfer humaner Immunkomponenten ermöglicht. Für die Experimente wurden Tiere im Alter von 8-10 Wochen ausgewählt. Die Tiere wurden unter spezifischen pathogen-freien (SPF) Bedingungen in Anlehnung an das Tierschutzgesetz gehalten.

2.2.15 Statistische Analyse

Die in den Experimenten erhobenen Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) oder mit dem studentischen t-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert.

2.2.16 Software

Tabelle 10: Analyseprogramme

Programm	Zweck
Flojo	Auswertung der FACS-Messungen
Olympus	Aufnahme histologischer Färbungen
Adap	Zytokinelisaauswertung
Cell Quest, Becton Dickinson	Am FACS-Gerät installiertes Programm zum Auswerten der FACS-Messung

3. Ergebnisse

Am Anfang der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines humanisierten Mausmodells allergischer Atemwegserkrankungen, welches für die Analyse neuer Therapieansätze zur Behandlung der allergischen Atemwegsentzündung genutzt werden sollte. Als Modellallergen für das zu generierende Testsystem wurde das standardisierte Allergenpräparat Birke (ALK ABELLÓ) ausgewählt. Passend dazu wurden Allergiker mit einer starken Sensibilisierung gegen Birkenpollen für die Isolierung der PBMCs ausgesucht. Die allergische Atemwegsentzündung sollte durch den intraperitonealen Transfer der humanen Zellen in immundefiziente Mäuse und anschließende allergene Provokation der Atemwege erreicht werden.

Für die Humanisierung wurden zu Beginn NOD-Scid Mäuse verwendet. Als Kontrollgruppe wurden NOD-Scid Mäuse, die mit PBMCs nicht-allergischer Spender injiziert wurden, mitgeführt. Als weitere Kontrollgruppe wurden in allen Experimenten unbehandelte Mäuse, die keinerlei Zellen oder Behandlung erhielten, herangezogen. Später wurden anstatt der NOD-Scid Tiere NOD-Scid γ c Mäuse verwendet, in denen wesentlich geringere Zellzahlen humaner PBMCs für die Etablierung des Modells ausreichten.

3.1 Analyse der mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten PBMCs

Vor Transfer der humanen PBMCs in die immundefizienten Mäuse wurden die Subpopulationen der über Ficoll aufgereinigten PBMCs mittels FACS-Analyse näher charakterisiert. Eine Analyse der humanen Zellen ergab, dass diese neben T-Zellen und B-Zellen auch Monozyten und NK-Zellen beinhalteten. Die im Blut enthaltenen Granulozyten hingegen waren im Verlauf des Isolierungsverfahrens eliminiert worden. Mit einer FACS-Färbung gegen zellspezifische Oberflächenmarker konnten verschiedene Subpopulationen der gewonnenen PBMCs identifiziert werden. Die Anteile der verschiedenen Subpopulationen zeigten zwischen den verschiedenen Spendern eine gewisse Variabilität. Nach Eingrenzung der lebenden Zellen betrug der Anteil an Monozyten $19,1 \pm 3,4\%$, der Anteil an NK-Zellen $10,5 \pm 1,85\%$ und jener der B-Zellen $6,98 \pm 1,73\%$ (n=6). Den Hauptanteil der PBMC-Suspension machten T-Zellen aus, die durch das TCR-assoziierte Rezeptormolekül CD3

detektiert werden konnten. In den meisten Spendern waren $CD4^+$ T-Zellen die vorherrschende Population. Die Frequenzen der $CD8^+$ T-Zellen waren hingegen geringer. In wenigen Ausnahmefällen waren die Frequenzen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen annähernd gleich. Eine exemplarische FACS-Analyse der PBMCs eines allergischen Spenders ist in Abbildung 5 dargestellt.

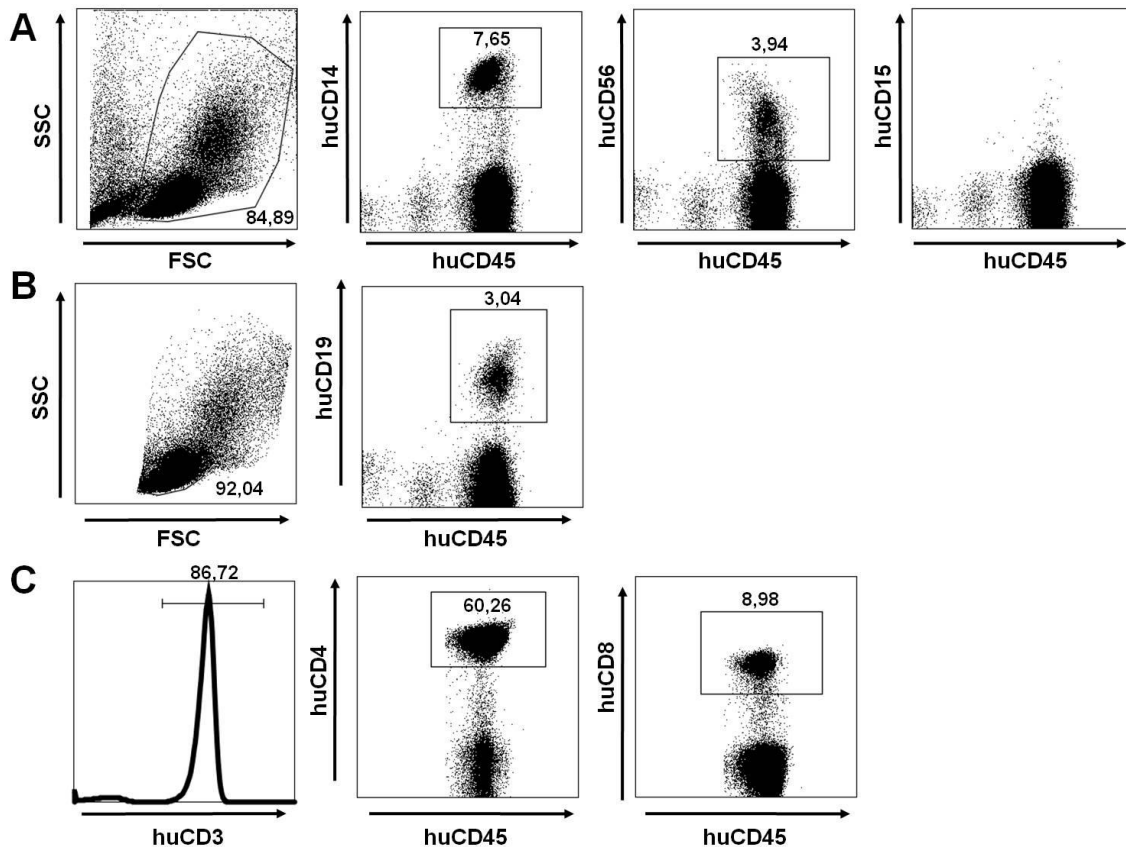


Abbildung 5: FACS-Analyse der humanen Zellen nach Isolierung aus dem Blut von Probanden mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD45, CD14, CD56, CD15, CD19, CD3, CD4 und CD8.

Nach Blutentnahme wurden die PBMCs mittels Dichtezentrifugation über Ficoll aufgereinigt und vor Transfer in die Mäuse durch FACS-Färbung analysiert. Zur Auswertung der FACS-Messung wurden die lebenden Zellen eingegrenzt. **A)** Der Anteil lebender Zellen betrug 84,89%. Innerhalb der eingegrenzten lebenden Zellen ist die kleinere, wenig granuläre Lymphozytenpopulation deutlich von den größeren Monozyten unterscheidbar. Die übrigen Dot plot Diagramme geben die prozentualen Anteile der Monozyten (CD14) und NK-Zellen (CD56) an den lebenden Zellen an. Die verschiedenen Oberflächenmarker wurden zusammen mit CD45, einem für humane Leukozyten spezifischen Antikörper eingesetzt. Granulozyten (CD15) konnten nicht detektiert werden. **B, C)** Zur Ermittlung der Anteile von B- und T-Zellen wurden die Lymphozyten eingegrenzt. B-Zellen wurden durch einen fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen CD19, T-Zellen durch Antikörper gegen CD3, CD4 und CD8 detektiert. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die prozentualen Anteile der jeweiligen Population an den lebenden Zellen. (SSC *sideward scatter* (Zell-Granularität), FSC *forward scatter* (Zell-Größe), hu *human*)

3.2 Etablierung des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid Mäusen

Nach ausführlicher Literaturrecherche themenbezogener Publikationen wurde die Menge der zu transferierenden PBMCs auf 80×10^6 Zellen festgelegt. Die Mäuse wurden wie in Material und Methode beschrieben (2.2.3.1) behandelt. Um die Entzündung in der Lunge zu optimieren, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Die PBMCs der allergischen Spender wurden transferiert und die Tiere erhielten dazu eine Injektion mit PBS, Birkenallergen oder IL-4 oder die Kombination Birkenallergen und IL-4. Eine 2. Injektion mit den beschriebenen Möglichkeiten erfolgte an Tag 7 (Abbildung 3). Die nasale Provokation der Atemwege mit Birkenallergen erfolgte einmal täglich an den Tagen 20-22. 48 Stunden nach der letzten intranasalen Provokation erfolgte die Messung der Lungenfunktion und die Aufarbeitung der Organe zur genaueren Ergründung der Entzündung.

3.2.1 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid Mäusen

3.2.1.1 Analyse der Lungenfunktion in NOD-Scid Mäusen

Die Lungenfunktionsmessung der mit 80×10^6 PBMCs transferierten NOD-Scid Mäuse ergab, dass ein Transfer der Zellen zusammen mit der zusätzlichen Gabe der Kombination aus Birkenallergen und IL-4 am effizientesten eine Atemwegsüberempfindlichkeit induzierte. Nach Gabe der humanen Zellen ohne Zusatz oder separat mit Birke oder IL-4 resultierte ein moderater Anstieg des Atemwegswiderstands nach Inhalation von Methacholin, der mit einer entsprechenden Verminderung der dynamischen Compliance assoziiert war (Abbildung 6). Die Gabe der Kombination aus Birkenallergen und IL-4 erbrachte im Vergleich dazu bei einer Provokation der Atemwege mit den höheren Methacholindosen 25 und 50mg/ml eine deutlich gesteigerte AHR in Verbindung mit dem höchsten Atemwegswiderstand und der geringsten Atemwegselastizität.

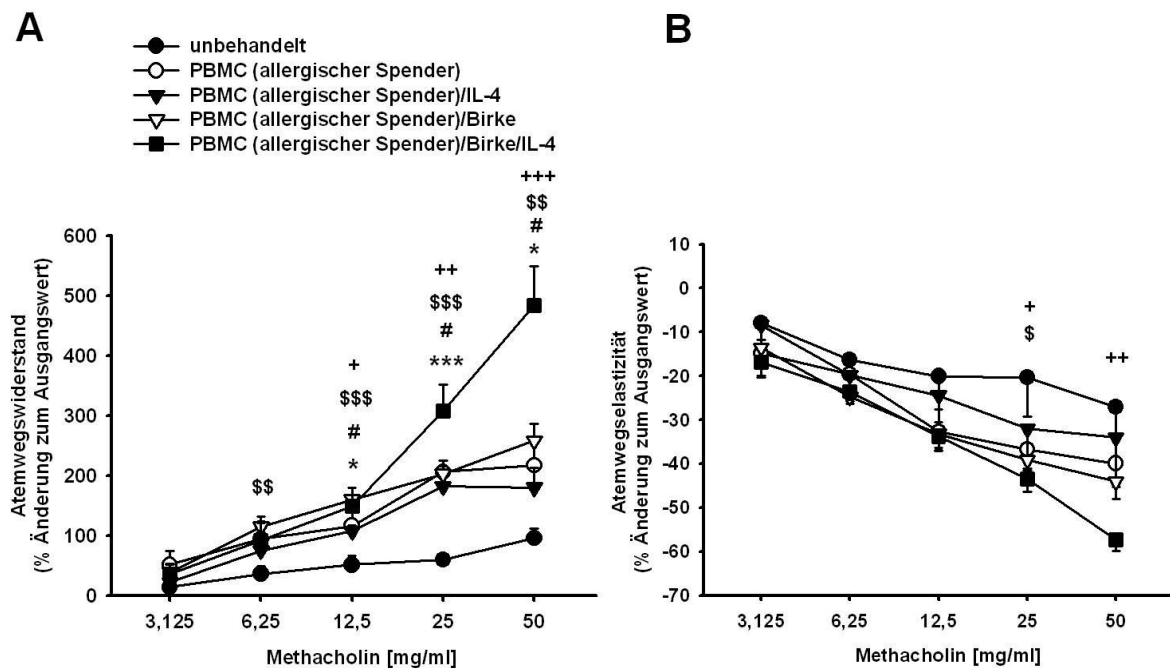


Abbildung 6: Messung der Lungenfunktion unter ansteigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin. Die i.p. Gabe von PBMCs allergischer Spender und folgende i.n. Provokation der Atemwege führt zu AHR in NOD-Scid Mäusen.

NOD-Scid Mäuse wurden mit 80×10^6 PBMCs allergischer Spender i.p. humanisiert. Die PBMCs wurden ohne Zusätze, zusammen mit humanem IL-4, zusammen mit dem Allergen Birke oder mit Birke und IL-4 behandelt. Eine erneute i.p. Applikation der Zusätze oder PBS erfolgte an Tag 7. Alle PBMC-transferierten Tiere wurden i.n. mit Allergen provoziert. 48 Stunden nach der letzten i.n. Provokation wurde die Lungenfunktion gemessen. **A)** Atemwegwiderstand (R_L). Dieser ist nach Gabe der PBMCs mit Birke und IL-4 im Vergleich zu allen übrigen Gruppen am höchsten. **B)** Entsprechend A dynamische Compliance (C_{dyn}). Dargestellt sind zusammenfassend die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten von denen Mittelwerte \pm SEM gezeigt sind. $n=3-8$. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und PBMC- (*), PBMC/IL-4- (#), PBMC/Birke- (\$) und PBMC/Birke/IL-4-transferierten (+) Tieren. *, #, \$, + $p < 0,05$; \$\$, ++ $p < 0,01$; ***, \$\$\$, +++ $p < 0,001$. (i.p. *intraperitoneal*, i.n. *intranasal*, AHR *Atemwegsüberempfindlichkeit*)

Um die Relevanz der allergischen Komponente in dem System zu ergründen, wurden in Kontrollansätzen neben PBMCs allergischer Spender auch PBMCs gesunder Spender transferiert. Die PBMCs gesunder Spender wurden entweder ohne Zusatz oder zusammen mit der Kombination von Birke und IL-4 injiziert. Es zeigte sich, dass nach Gabe nichtallergischer PBMCs und anschließender intranasaler Provokation der Atemwege keine AHR resultierte. Dies war sowohl nach Injektion der nichtallergischen PBMCs ohne Zusätze (nicht gezeigt) sowie nach Transfer der Zellen zusammen mit Birke und humanem IL-4 der Fall (Abbildung 7).

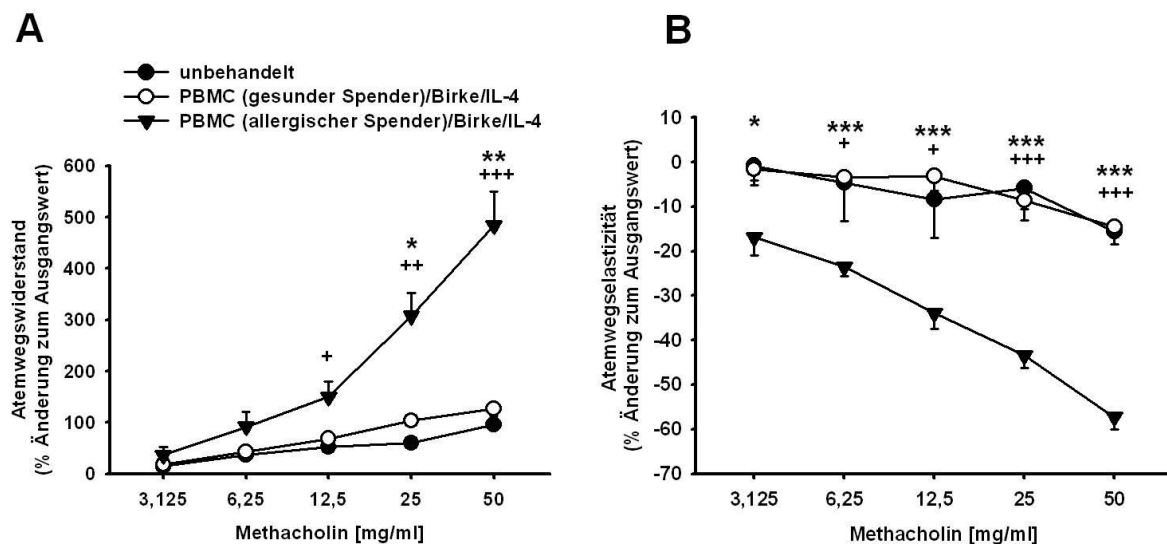


Abbildung 7: Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholinkonzentration. Nach intraperitonealer Injektion von PBMCs nicht-allergischer Spender und folgender nasaler Allergenprovokation bleibt die Entwicklung einer AHR aus.

Nach Transfer von 80×10^6 PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 und Allergenprovokation war nur dann eine AHR nachweisbar, wenn die humanen PBMCs von Birkenallergikern stammten. Wurden hingegen PBMCs gesunder Spender mit Birke und IL-4 injiziert konnte keine AHR festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus zwei unterschiedlichen Experimenten. $n = 3-7$. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und PBMC (allergischer Spender)/Birke/IL-4 – transferierten (+) sowie PBMC (allergischer Spender)/Birke/IL-4 – und PBMC (gesunder Spender)/Birke/IL-4 – transferierten (*) Mäusen. +, * $p < 0,05$; ++, ** $p < 0,01$; +++, *** $p < 0,001$. (AHR Atemwegsüberempfindlichkeit)

3.2.1.2 Untersuchung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Eine Analyse der Zellen in der BAL Flüssigkeit ergab den höchsten Influx von Zellen nach Gabe der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4. Dieser war im Vergleich zu unbehandelten Tieren oder Tieren, die mit den Zellen nicht-allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 transferiert wurden jedoch nicht signifikant. In allen Gruppen waren Alveolarmakrophagen die dominierende Population der in der Lunge nachweisbaren Zellen. Auch der Transfer der allergischen PBMCs in Kombination mit Birkenallergen erhöhte den Einstrom an Zellen in den bronchoalveolären Raum. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren oder den Mäusen, die mit gesunden PBMCs transferiert wurden, war die Anzahl der Zellen leicht erhöht (Abbildung 8). Eine FACS-Analyse der Zellen aus der BAL gestaltete sich aufgrund der geringen Zelldichte schwierig. Die FACS-Färbung gegen den humanen Leukozytenmarker CD45 war überwiegend negativ und ließ darauf schließen, dass es sich bei den in

der BAL befindlichen Monozyten um Zellen murinen Ursprungs handelte. Vereinzelt konnten schwachen Frequenzen humaner CD45-positiver Zellen in der BAL mittels FACS nachgewiesen werden. Eine positive Doppelfärbung gegen humanes CD3 identifizierte diese Zellen als humane T-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

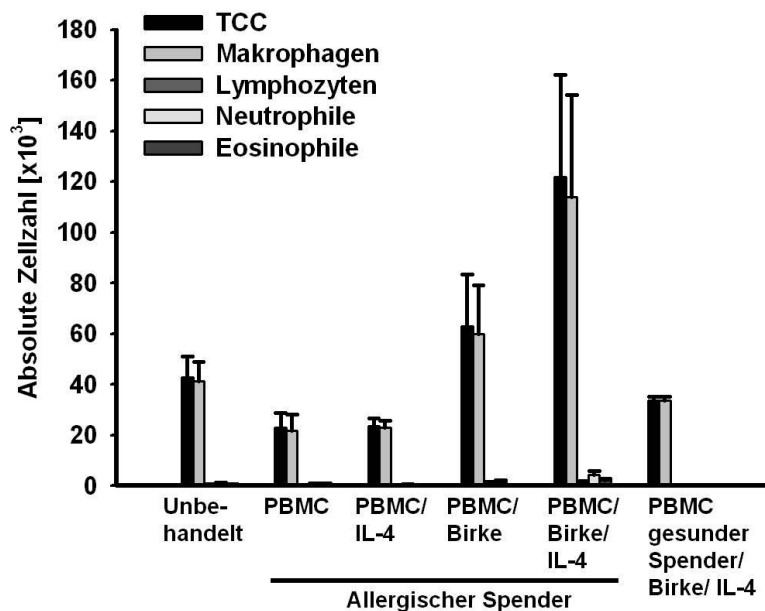


Abbildung 8: Absolute Anteile verschiedener Zellsubpopulationen in der BAL humanisierter NOD-Scid Mäuse. Der Transfer von 80×10^6 PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 erhöht den Einstrom muriner Makrophagen in die Lunge.

Der Transfer von PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 führt nach intranasaler Provokation zu einer erhöhten Anzahl an Zellen im bronchoalveolären Raum. Auch nach Gabe der PBMCs zusammen mit Allergen war die Zahl der Zellen in der BAL erhöht. Nach Transfer der PBMCs ohne Zusatz oder zusammen mit IL-4 lag die Anzahl der Zellen auf dem Niveau der unbehandelten oder mit gesunden PBMCs transferierten Kontrolltiere. Die schwarzen Balken gewähren einen Überblick über die Gesamtzellzahl der BAL (TCC), die sich überwiegend aus Makrophagen zusammensetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Experimenten \pm SEM. $n=4-10$. (BAL *Bronchoalveoläre Lavage*)

Die Anzahl der für eine allergische Entzündung typischen Zellen wie eosinophile und neutrophile Granulozyten war insgesamt gering. Dennoch zeigte sich nach Transfer allergischer PBMCs mit Birke und IL-4 eine erhöhte Anzahl sowohl an neutrophilen als auch an eosinophilen Granulozyten (Abbildung 9).

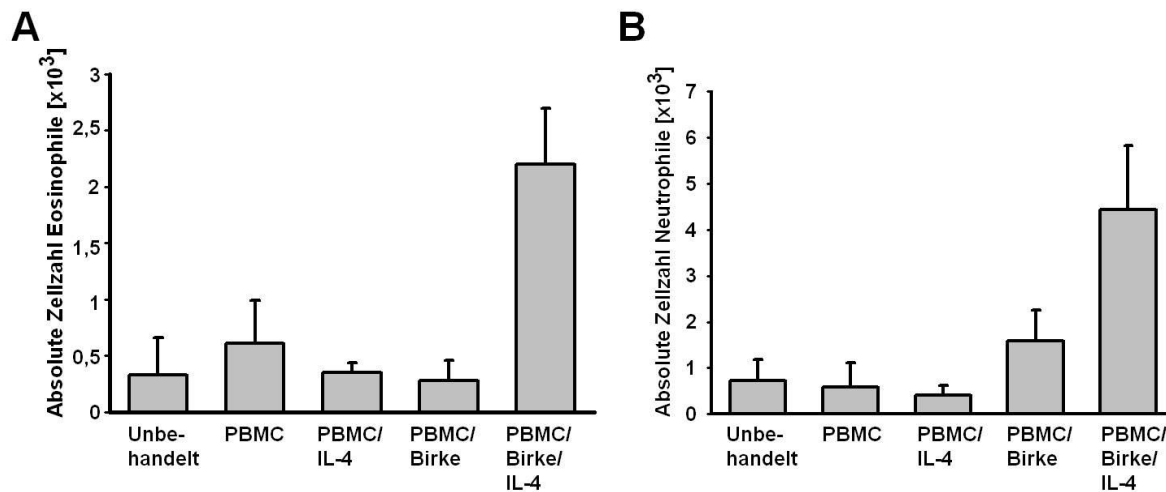


Abbildung 9: Absolute Anteile eosinophiler und neutrophiler Granulozyten in der BAL humanisierter NOD-Scid Mäuse. Die Injektion allergischer PBMCs mit Birke und IL-4 erhöht die Anzahl an Granulozyten.

Nach dem Transfer von 80×10^6 PBMCs allergischer Spender zusammen mit Allergen und IL-4 und folgender Allergenprovokation kam es im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu einem gesteigerten Einstrom eosinophiler (A) und neutrophiler (B) Granulozyten in die Lungen der NOD-Scid Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten \pm SEM. $n=4-10$. (BAL Bronchoalveoläre Lavage)

3.2.1.3 Analyse der humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid Tiere

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die in die Lungen der humanisierten Mäuse eingewanderten humanen Zellen näher untersucht. Geklärt werden sollte, welche humanen Zellsubpopulationen nach drei Wochen in der Maus noch nachweisbar und somit maßgebend an der Entzündung beteiligt waren.

Nach Verdau und Aufbereitung der humanisierten Lungen 24 Tage nach dem intraperitonealen Transfer der humanen PBMCs wurden Antikörper-Färbungen gegen verschiedene Zellpopulationen durchgeführt, um die humanen Zellen wiederzufinden und Subpopulationen zu identifizieren. Es wurde deutlich, dass es sich bei den humanen $CD45^+$ Zellen in den Lungen der NOD-Scid Mäuse in allen Gruppen im Wesentlichen um $CD3^+$ T-Zellen handelte. Monozyten, NK-Zellen und B-Zellen, die Bestandteil der an Tag 0 injizierten PBMC-Zellsuspension waren (Vergleich Abbildung 5), konnten nicht detektiert werden. In Abbildung 10 ist exemplarisch die FACS-Analyse der Lungenzellen einer Maus nach Transfer von allergischen PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 dargestellt.

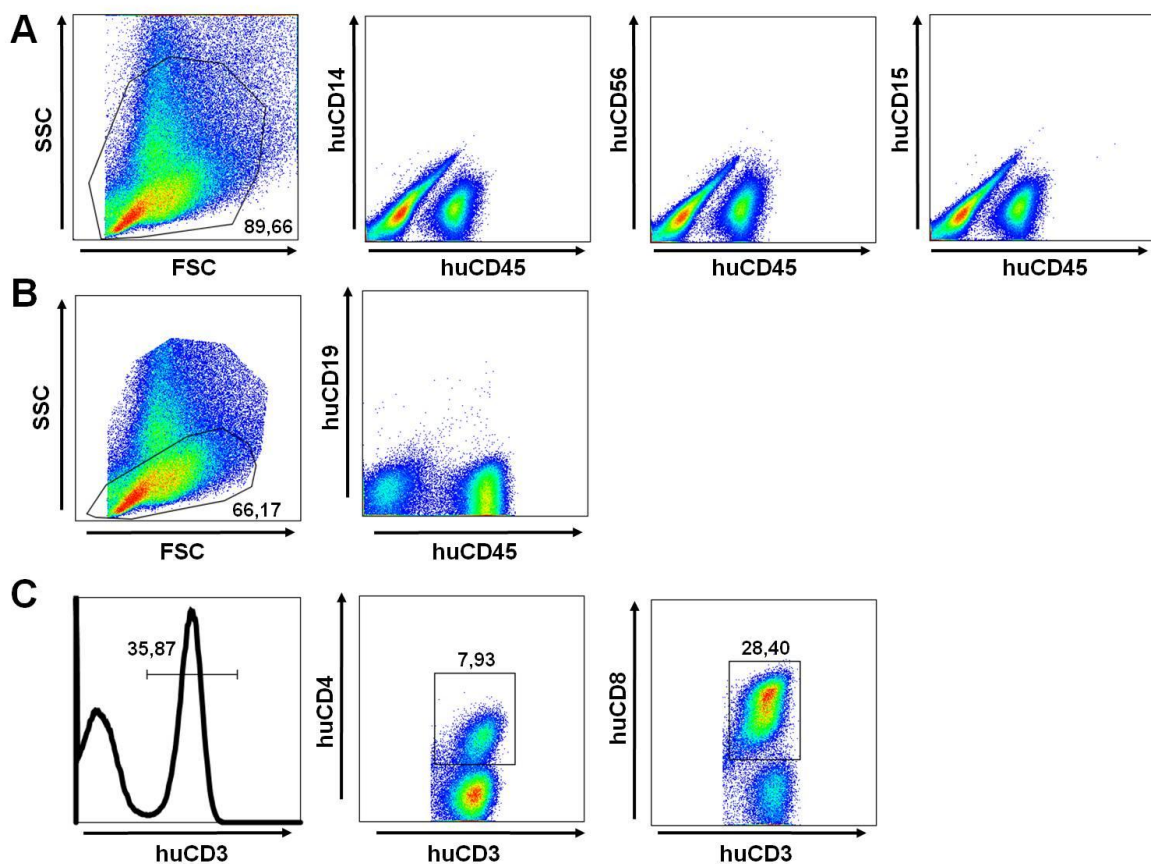


Abbildung 10: FACS-Analyse homogenisierter Lungensektionen humanisierter Mäuse mit humanen Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD45, CD14, CD56, CD15, CD19, CD3, CD4 und CD8.

NOD-Scid Mäuse wurden mit 80×10^6 PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 humanisiert. An Tag 7 wurden erneut Birke und IL-4 i.p. verabreicht. 48h nach der letzten i.n. Provokation mit dem Birkenallergen wurden die Lungen entnommen, verdaut und mit humanen FACS-Antikörpern gefärbt. **A)** Die lebenden Zellen wurden eingegrenzt und analysiert. Es waren keine Monozyten (CD14), NK-Zellen (CD56) oder Granulozyten (CD15) vorzufinden. Die Färbungen wurden stets in einem doppelten Ansatz mit CD45, dem für humane Leukozyten spezifischen Marker, vorgenommen. **B)** Zur Detektion von B-Zellen mit dem für humane B-Zellen spezifischen Antikörper CD19 wurden die Lymphozyten eingegrenzt. Bei den CD45-positiven Zellen in der Lunge handelte es sich nicht um B-Zellen, was anhand der negativen Färbung gegen CD19 ersichtlich wird. **C)** Eine Färbung mit dem T-Zell-spezifischen Antikörper CD3 verdeutlichte, dass die detektierten Zellen T-Zellen waren (dargestellt sind Lymphozyten wie unter B angegeben. Die Werte geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Population an den lebenden Zellen an). Veranschaulicht ist exemplarisch die FACS-Analyse einer PBMC/Birke/IL-4-transferierten Maus. Die Prozentwerte geben den Anteil der jeweiligen Zellsubpopulation an den lebenden Zellen an. (SSC *sideward scatter* (Zell-Granularität), FSC *forward scatter* (Zell-Größe), hu *human*, i.p. *intraperitoneal*, i.n. *intranasal*)

Des Weiteren zeigte sich, dass nach einem Transfer der allergischen PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 der Influx an T-Zellen in die Lungen am stärksten war. Dieses Ergebnis wurde durch histologische Färbungen der Gewebeschnitte der Lunge mit einem humanen Leukozytenmarker (CD45) untermauert.

Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrolltiere, die PBMCs nicht-allergischer Spender erhielten, vergleichsweise eine deutlich geringere Anzahl an humanen Leukozyten (Abbildung 11).

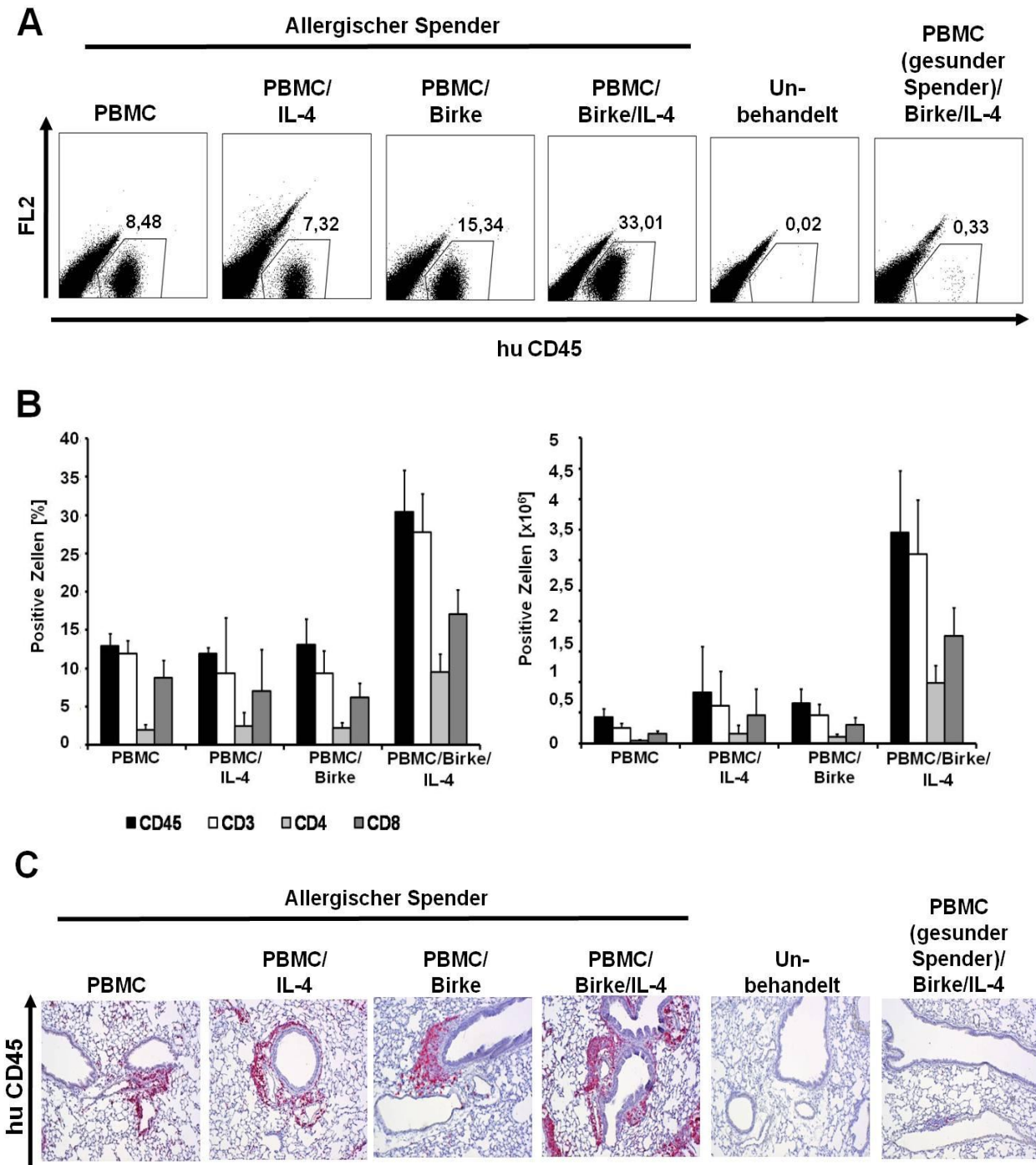


Abbildung 11: Die zusätzliche Gabe von IL-4 und Birke steigert den Einstrom humaner CD45⁺ Zellen in das Lungengewebe humanisierter NOD-Scid Mäuse.

NOD-Scid Mäuse wurden mit 80×10^6 PBMCs allergischer Spender transferiert. Es wurden verschiedene Transferbedingungen getestet. Die PBMCs wurden an Tag 0 ohne Zusätze, mit IL-4 oder Birke oder IL-4 und Birke injiziert. Entsprechend der Behandlung bei Zellgabe an Tag 0 erhielten die PBMC-transferierten Tiere an Tag 7 intraperitoneal PBS, die PBMC/IL-4-transferierten IL-4, die

PBMC/Birke-transferierten Birke und die PBMC/Birke/IL-4-behandelten Mäuse Birke und IL-4. 48h nach der dritten nasalen Provokation der Atemwege wurden die Tiere analysiert. **A, B)** FACS-Analyse der humanen Zellen in den Lungen der humanisierten Mäuse. Sowohl die exemplarische Darstellung der Antikörper-Färbung (repräsentativ eine Lunge aus jeder Gruppe) mit dem humanen Leukozytenmarker CD45 (**A**) als auch die im Balkendiagramm mit eingeschlossenen T-Zell-spezifischen Färbungen (CD3, 4, 8) mehrerer Tiere (**B**) zeigen in allen Gruppen einen Einstrom humaner T-Zellen in das Lungengewebe, der jedoch nach systemischer Addition von Birke und IL-4 deutlich gesteigert ist. Balkendiagramm n = 4-10, Mittelwerte \pm SEM aus 2 unterschiedlichen Experimenten. **C)** Histologische Färbung von Lungenschnitten mit einem histologischen Antikörper gegen humanes CD45 (100x). Die unter **A** angegebenen Werte stellen die prozentualen Anteile der eingegrenzten CD45⁺ Population an den lebenden Zellen dar. (hu *human*, FL2: *zweiter Fluoreszenzkanal*)

3.2.2 Detektion humaner Zellen in weiteren Organen humanisierter NOD-Scid Tiere

Neben der ausführlichen Untersuchung der Entzündung in der Lunge wurden weitere murine Gewebe wie Milz und Blut auf humane Zellen hin untersucht. Die Tiere erhielten dazu zu Beginn 80×10^6 PBMCs von allergischen Spendern mit und ohne Zusätze (IL-4, Birke) und erneut an Tag 7 entsprechend der anfänglichen Behandlung intraperitoneal PBS, Birke und / oder IL-4 und wurden schließlich an drei aufeinanderfolgenden Tagen intranasal mit dem Allergen provoziert.

3.2.2.1 Detektion humaner CD45⁺ 3⁺ Zellen im Blut der humanisierten NOD-Scid Tiere

Die FACS-Analyse der humanen Zellen im Blut der humanisierten NOD-Scid Tiere verdeutlichte ein im Vergleich zu den übrigen Gruppen verstärktes Einwandern humaner Zellen nach Transfer der humanen PBMCs zusammen mit Birke und IL-4. Mittels der positiven Doppelfärbung gegen CD45 und CD3 konnten die humanen Zellen eindeutig als T-Zellen identifiziert werden (Abbildung 12).

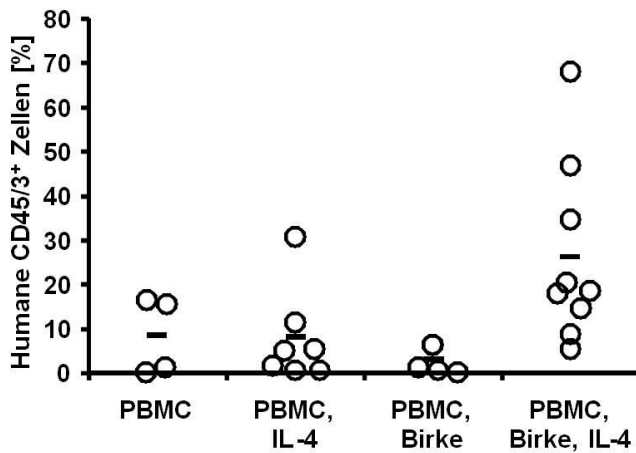


Abbildung 12: Frequenzen humaner CD45/3 doppelt positiver Zellen im Blut humanisierter NOD-Scid Mäuse. Die additive Gabe des Allergens Birke und IL-4 verstärkt die Frequenz humaner Zellen im Blut der humanisierten Mäuse.

Die FACS-Analyse der humanen Zellen im Blut der NOD-Scid Tiere detektiert ein verstärktes Vorkommen von T-Zellen nach Transfer der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4. Im Punktdiagramm sind die prozentualen Anteile der CD45/3⁺ Zellen aller lebenden Zellen dargestellt, wobei ein Punkt die Frequenz der humanen Zellen im Blut einer Maus veranschaulicht. Die Balken geben die Mittelwerte jeder Gruppe an. n=4-9.

3.2.2.2 Detektion humaner CD45⁺ Zellen in den Milzen humanisierter NOD-Scid Tiere

Die Untersuchung der humanen Zellen in den Milzen der humanisierten NOD-Scid Tiere bestätigte die bisherigen Ergebnisse. Es konnten nach Transfer der humanen Zellen in allen Gruppen humane Zellen wiedergefunden werden, wobei nach einer Behandlung der Tiere mit Birke und IL-4 die stärksten Frequenzen humaner Zellen nachweisbar waren. Auch hier zeigte die Doppelfärbung gegen den humanen Leukozytenmarker CD45 und das für humane T-Zellen typische Rezeptormolekül CD3, dass es sich bei den Zellen hauptsächlich um humane T-Zellen handeln musste (Abbildung 13).

Neben T-Zellen konnte in den Milzen der NOD-Scid Tiere auch ein geringer Anteil an humanen B-Zellen detektiert werden. Dieser lag in den PBMC/Birke/IL-4-transferierten Zellen unter 1% (Daten nicht gezeigt).

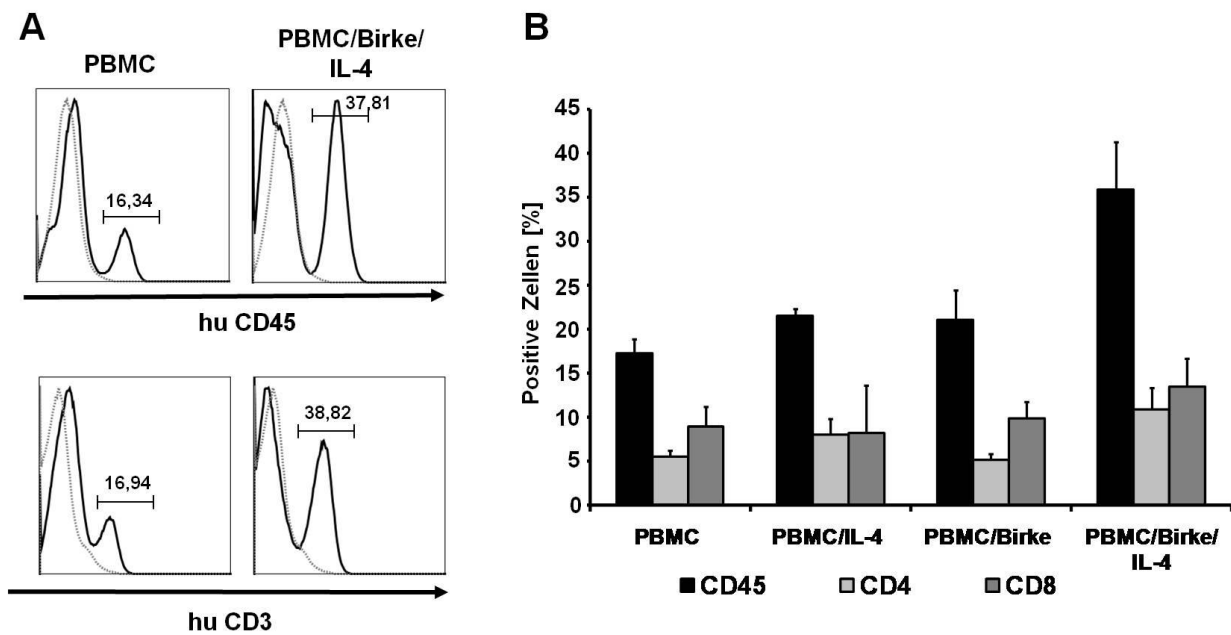


Abbildung 13: FACS-Analyse der humaner CD45/3⁺ Zellen in den Milzen humanisierter NOD-Scid Mäuse.

Die Milzen der mit 80×10^6 PBMCs allergischer Spender humanisierten NOD-Scid Tiere wurden mit FACS-Antikörper gegen humane Leukozyten sowie humane T-Zellen gefärbt. In allen Gruppen konnten humane Zellen wiedergefunden werden, wobei nach Gabe der Zellen zusammen mit Allergen und IL-4 die stärksten Raten humaner T-Zellen detektiert wurden. **A)** Veranschaulichende Histogramme der Färbungen mit hu CD45 bzw. hu CD3 einer PBMC-transferierten und einer PBMC/Birke/IL-4 transferierten Maus. **B)** Zusammenfassung der FACS-Daten aus 2 verschiedenen Experimenten, $n=4-6$. Mittelwerte \pm SEM. (hu *human*)

3.2.3 Effekte von gp120 in dem etablierten humanisierten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Das im NOD-Scid Stamm etablierte humanisierte Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung wurde im Folgenden dazu genutzt, den Einfluss des HIV-1 Hüllproteins gp120 auf die allergische Erkrankung zu analysieren. Aufgrund der hohen AHR und starken Symptome nach dem Transfer der humanen Zellen zusammen mit dem Birkenallergen und IL-4, wurde in den folgenden Experimenten stets diese Transferbedingung gewählt.

In anfänglichen Experimenten wurden die Effekte des gp120 zum Zeitpunkt der Initiierung der allergischen Atemwegsentzündung in den Mäusen an Tag 0 (d0) erforscht. Das Protein wurde demnach zusammen mit den Zellen sowie Birke und IL-4 intraperitoneal injiziert. Da in diesen Experimenten bereits kurative Effekte durch gp120 festgestellt werden konnten, wurden die Tiere in darauffolgenden Experimenten an Tag 18 (d18) mit gp120 behandelt. In diesem Ansatz sollte die therapeutische Wirkung auf die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung untersucht werden.

Eine Verabreichung des gp120 zusammen mit den Zellen an Tag 0 führte zu einer deutlichen Verminderung der asthmatischen Symptome. Dies zeigte sich zum einen in einer Reduktion der AHR sowie zum anderen in einem abgeschwächten Einstrom an Zellen, hauptsächlich Makrophagen in die Lungen der humanisierten und allergenbehandelten Tiere (Abbildung 14 A, B). Ähnliche Resultate zeigten sich nach der intraperitonealen Applikation von gp120 an Tag 18 in dem therapeutischen Ansatz. Auch hier waren AHR und die Frequenzen der Zellen in der bronchoalveolären Lavage vermindert.

Weiterhin wurden Effekte des gp120 auf die humanen T-Zellen in der Lunge untersucht. Die Behandlung mit gp120 verursachte eine moderate nicht signifikante Reduktion der CD3⁺ T-Zellen in der Lunge (Abbildung 14 C).

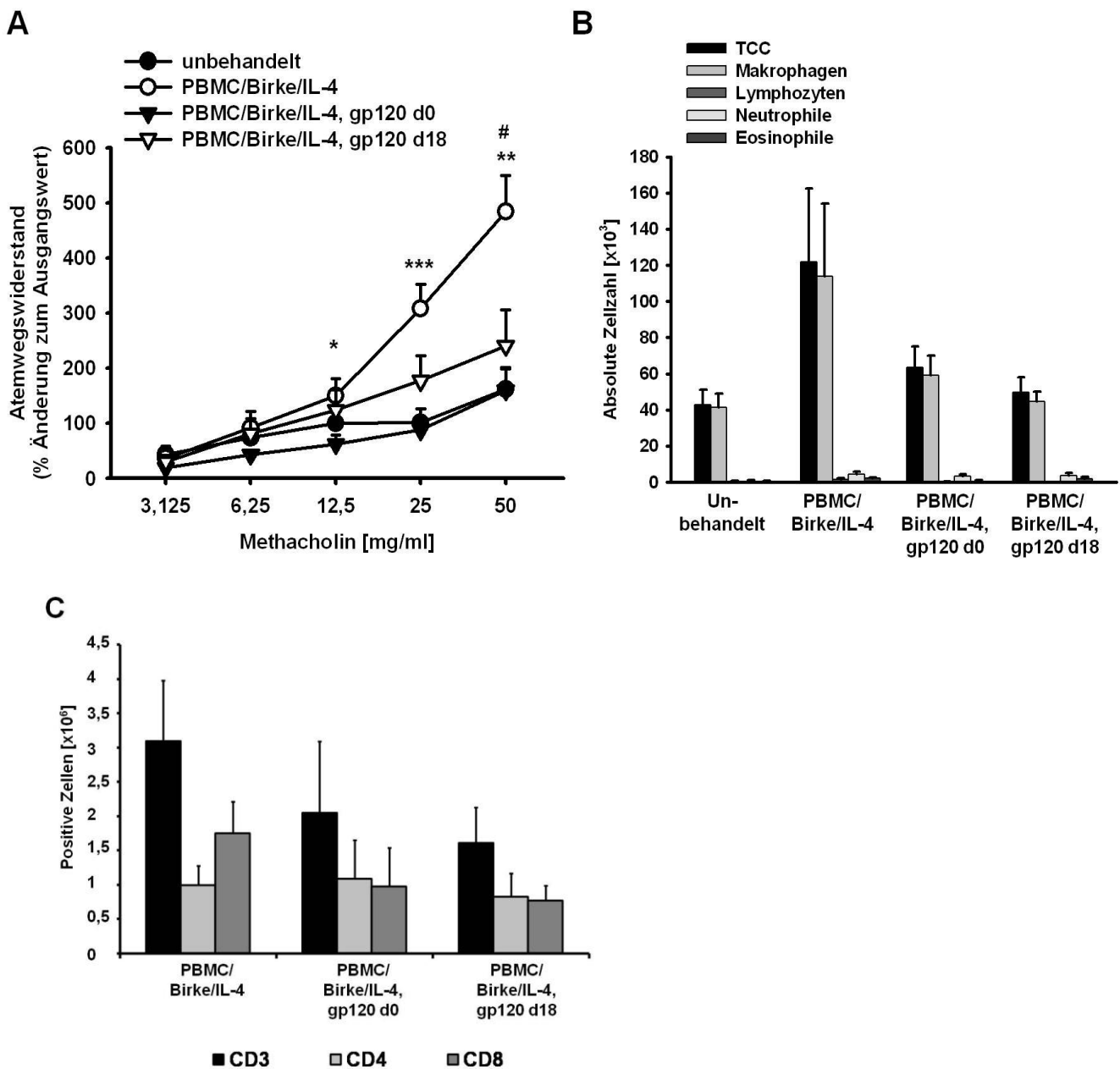


Abbildung 14: Die Behandlung mit gp120 vermindert AHR und Einstrom von Makrophagen in den bronchoalveolären Raum und reduziert die Frequenzen humaner T-Zellen in den Lungen humanisierter NOD-Scid Tiere.

NOD-Scid Mäuse wurden mit 80×10^6 PBMCs allergischer Spender mit Zugabe von Allergen und IL-4 humanisiert. Die Tiere wurden gruppenweise an Tag 0 (d0) oder Tag 18 (d18) mit gp120 behandelt. Die Applikation von gp120 verminderte die allergen-induzierte Inflammation. Eine Behandlung mit gp120 führte zur Reduktion von AHR (**A**), zum verminderten Einstrom von Makrophagen in die Lunge (detektiert via BAL) (**B**) sowie zu einer Reduktion von humanen T-Zellen in den Lungen der NOD-Scid Mäuse (**C**). $n=4-10$, Mittelwerte \pm SEM. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen PBMC/Birke/IL-4-transferierten und den an Tag 0 (*) oder Tag 18 (#) mit gp120 behandelten Mäusen. *, # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (TCC Gesamtzellzahl der BAL, AHR Atemwegsüberempfindlichkeit, BAL Bronchoalveoläre Lavage)

3.3 Etablierung des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid γ c Mäusen

Der bis zu diesem Zeitpunkt verwendete NOD-Scid Stamm birgt eine Reihe von Nachteilen. Die Humanisierung der Tiere gestaltete sich beispielsweise aufgrund der vorhandenen residualen Immunität des Stammes schwierig. Die transferierten humanen Zellen wurden häufig von der Maus eliminiert und das entsprechende Experiment war unbrauchbar. Außerdem war für die Initiierung des Asthma-Modells im NOD-Scid Stamm eine große Zahl humaner PBMCs notwendig (80×10^6).

Der Stamm NOD-Scid γ c überwindet die benannten Limitationen. Hier kommt es durch die Mutation des Genes für die γ -Kette des IL-2 Rezeptors zu einer Defizienz der murinen NK-Zellen, welche die Übertragung der humanen Zellen in die Maus erleichtert. Das etablierte Modell sollte daher nun auf den NOD-Scid γ c Stamm übertragen werden, der ab sofort verfügbar war.

3.3.1 NOD-Scid γ c Mäuse entwickeln eine GvHD nach Transfer von 80×10^6 PBMCs

Anfängliche Versuche machten schnell deutlich, dass 80×10^6 PBMCs zu viele Zellen für die Humanisierung des NOD-Scid γ c Stammes waren. Es kam zur Ausprägung einer GvHD in den NOD-Scid γ c Mäusen, die in Verbindung mit den typischen phänotypischen Merkmalen wie Gewichtsverlust, ruppiges Fell und Apathie auftrat. Während nach Transfer von 80×10^6 PBMCs eines nicht-allergischen Spenders in den NOD-Scid Stamm an Tag 24 nach Humanisierung keine humanen Zellen in Organen wie Lunge und Milz vorzufinden waren, kam es in den Tieren des NOD-Scid γ c Stammes zur starken Proliferation der humanen Zellen die weiterhin sämtliche murine Gewebe infiltrierten und heftige Entzündungen hervorriefen. Ein direkter Vergleich der humanen Zellen in den Lungen von NOD-Scid und NOD-Scid γ c Tieren verdeutlicht die ungleichen Entwicklungen nach Transfer der gleichen PBMC-Zahl nicht-allergischer Spender (80×10^6) in beiden Mausstämmen (Abbildung 15).

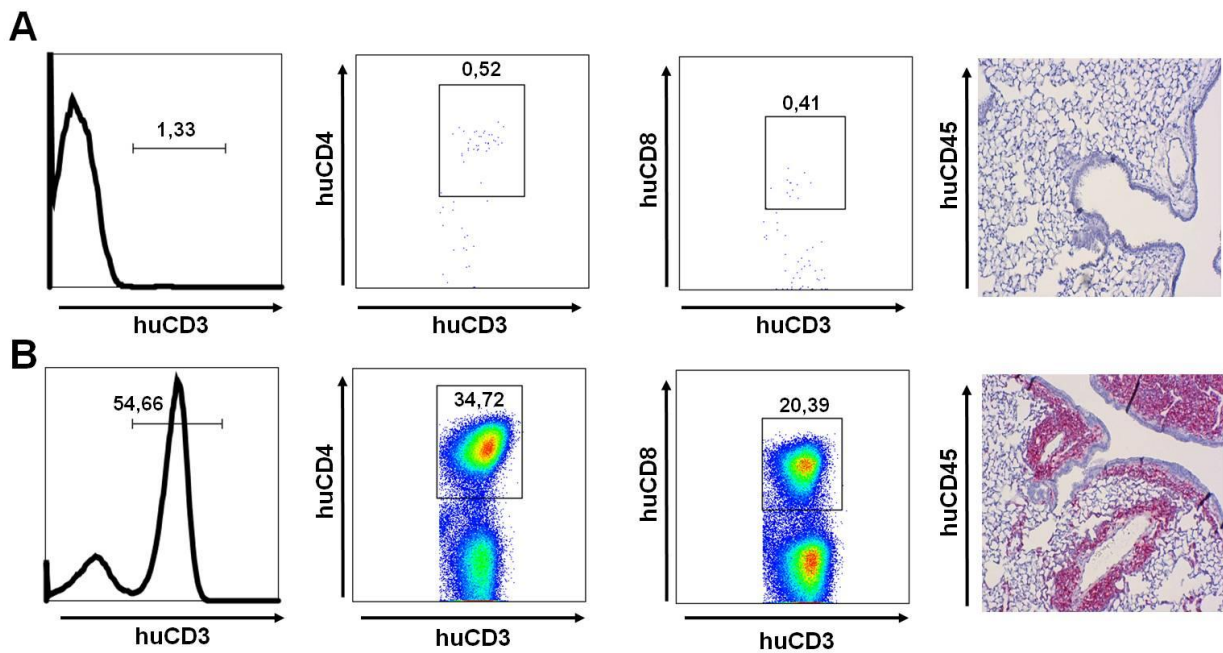


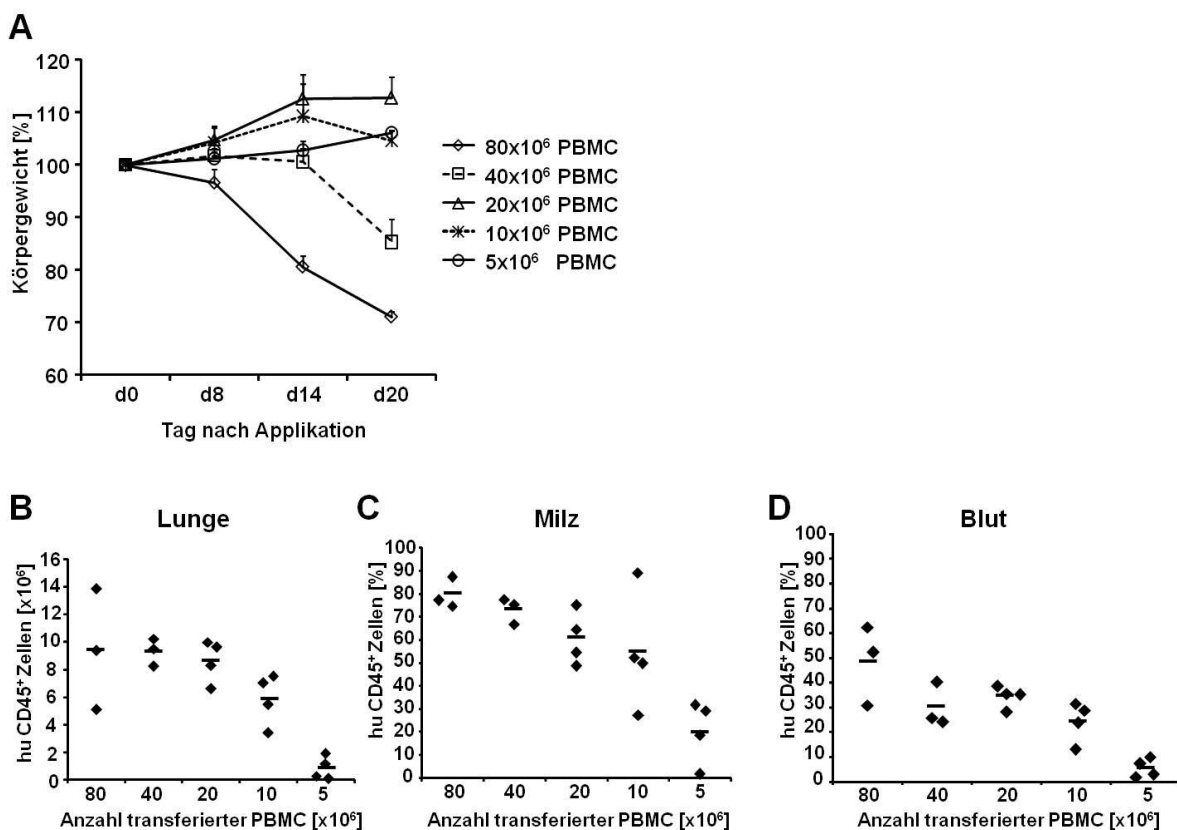
Abbildung 15: Vergleich der Frequenzen humaner T-Zellen in NOD-Scid und NOD-Scid γ c Lungen nach Gabe von 80×10^6 PBMCs mittels FACS-Färbung mit Antikörpern gegen humanes CD3, CD4 und CD8.

NOD-Scid und NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit 80×10^6 PBMCs eines nicht-allergischen Spenders an Tag 0 humanisiert. Eine Analyse der Tiere erfolgte ohne weitere Allergenbehandlung 21-24 Tage später. Während in den Lungen der NOD-Scid Mäuse an Tag 24 nach Humanisierung nur eine sehr geringe Frequenz humaner T-Zellen detektierbar war (**A**), war die Anzahl humaner T-Zellen in den Lungen der NOD-Scid γ c Mäuse sehr hoch (**B**). Die Abbildungen A und B veranschaulichen die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, $n=6$. Dargestellt ist die Färbung von Lungenzellen mit FACS-Antikörpern gegen humane T-Zellen sowie die Färbung histologischer Lungenschnitte mit Antikörpern gegen humane $CD45^+$ Zellen (100x). Bei der FACS-Analyse sind die prozentualen Anteile der eingegrenzten Population an den lebenden Zellen angegeben. (hu *human*)

3.3.2 Evaluation der adäquaten Zellzahl für das Modell der allergischen Atemwegsentzündung im NOD-Scid γ c Stamm

Für die Etablierung des Asthma-Modells in den NOD-Scid γ c Tieren musste in den folgenden Experimenten zunächst einmal eine adäquate Zellzahl humaner PBMCs für die Humanisierung evaluiert werden, bei der die Entstehung einer GvHD ausgeschlossen werden konnte.

Um die für den NOD-Scid γ c Stamm geeigneten Bedingungen herauszufinden, wurden PBMCs nicht-allergischer Spender seriell von 80 bis auf $1,25 \times 10^6$ titriert und in NOD-Scid γ c Mäuse injiziert. Ein Transfer von 80 und 40×10^6 humanen PBMCs verursachte eine GvH-Reaktion in den Tieren. Einige Tiere aus diesen Gruppen verstarben. Nach Gabe von 20×10^6 und 10×10^6 Zellen war eine abnehmende GvHD-Symptomatik zu verzeichnen. Bei einer Humanisierung mit 5×10^6 PBMCs und weniger waren keine Anzeichen einer GvHD mehr vorzufinden. Die Tiere behielten über den Versuchszeitraum von 24 Tagen ihr Gewicht und die Frequenzen humaner Zellen in unterschiedlichen Geweben der Mäuse blieben auf sehr geringem Niveau. Auch äußerlich waren keine Anzeichen einer xenogenen Reaktion mehr vorzufinden (Abbildung 16).



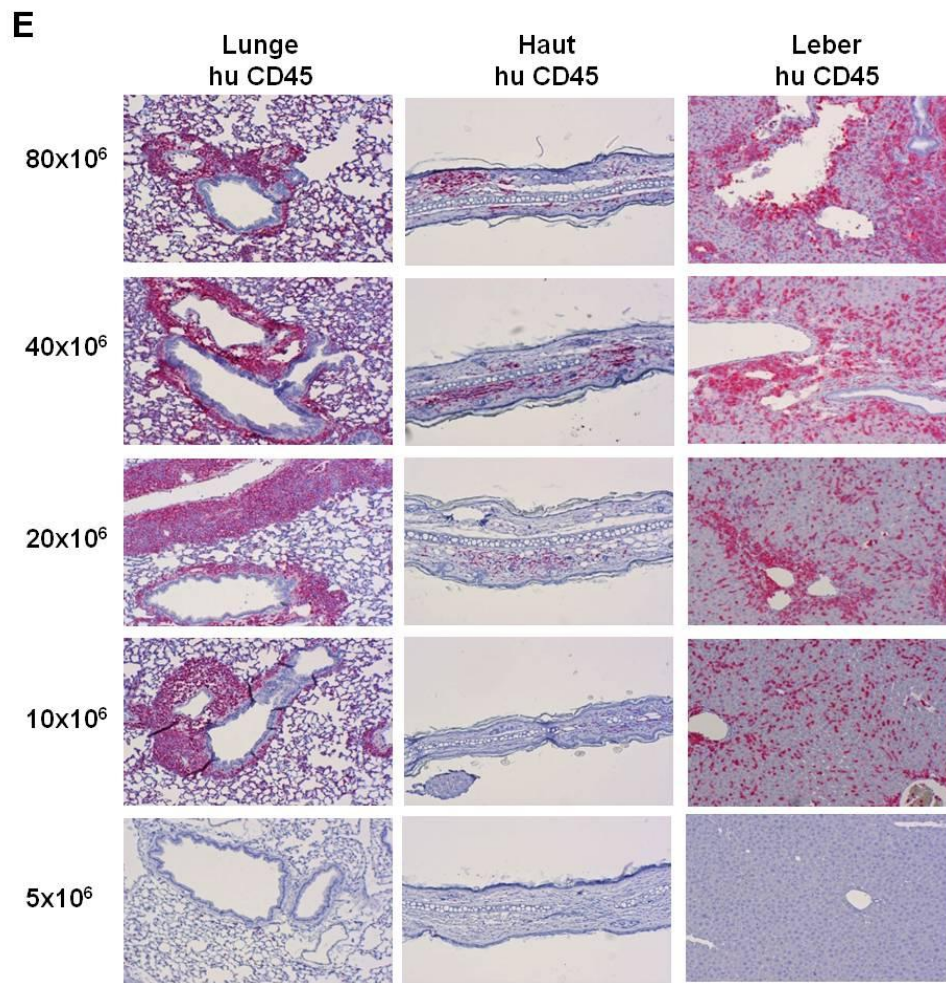


Abbildung 16: Titration der PBMCs nicht-allergischer Spender vor Transfer in NOD-Scid γ c Mäuse. Nach Transfer von 5×10^6 PBMCs ist keine GvH-Symptomatik mehr detektierbar.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit abnehmenden Zellzahlen ($80-2,5 \times 10^6$) humaner PBMCs nicht-allergischer Spender transferiert. Die Analyse der Mäuse erfolgte an Tag 24. **A)** Aufzeichnung des Gewichts der humanisierten Mäuse über einen Zeitraum von 20 Tagen. Nach Transfer von 80 und 40×10^6 Zellen entwickelten die Tiere eine GvHD, was unter anderem anhand ihres Gewichtsverlustes ersichtlich wurde. Ab einer Transferzahl von 20×10^6 PBMCs war kein Gewichtsverlust mehr zu verzeichnen. Mittelwerte \pm SEM. Erfassung der Frequenz humaner Leukozyten mittels FACS-Färbung mit einem Antikörper gegen den humanen Oberflächenrezeptor CD45 in Lunge (**B**), Milz (**C**) und Blut (**D**) der Mäuse. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus. Nach Applikation von 5×10^6 PBMCs waren in den verschiedenen Geweben keine humanen Zellen mehr detektierbar. Die Balken veranschaulichen die Mittelwerte. **E)** Auch die Histologie von Lunge, Haut und Leber verdeutlicht eine ausbleibende GvH-Reaktion nach Transfer von 5×10^6 PBMCs (100x). Die Ergebnisse veranschaulichen zwei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche, $n=3-4$. (hu *human*, GvH *Graft versus Host*, GvHD *Graft versus Host Disease*)

3.3.3 Messung des ALT-Spiegels als weiteres Ausschlusskriterium einer GvHD im NOD-Scid γ c Stamm

Ein weiteres Kriterium einer GvHD-Reaktion stellt die Konzentration des Enzyms ALT im Serum humanisierter Mäuse als Hinweis für eine gestörte Leberfunktion dar. Eine Erhöhung dieses Spiegels resultiert im Falle einer GvH-Reaktion aus der Zersetzung der Leber in Folge einer übermäßigen Reaktion der transferierten humanen Zellen gegen die murinen Gewebe. Im folgenden Experiment wurden die ALT-Spiegel zwischen unbehandelten und PBMC (allergisch und nicht-allergisch) - transferierten Tieren verglichen. Wie in Abbildung 17 dargestellt, waren die GPT-Spiegel in den verschiedenen Gruppen vergleichbar. Unabhängig davon, ob die Tiere keine Zellen oder PBMCs mit oder ohne Zusätze erhielten befanden sich die GPT-Spiegel auf einem ähnlichen Niveau. Die Ergebnisse bestätigen das Ausbleiben der Entwicklung einer GvHD nach einer Humanisierung mit 5×10^6 PBMCs.

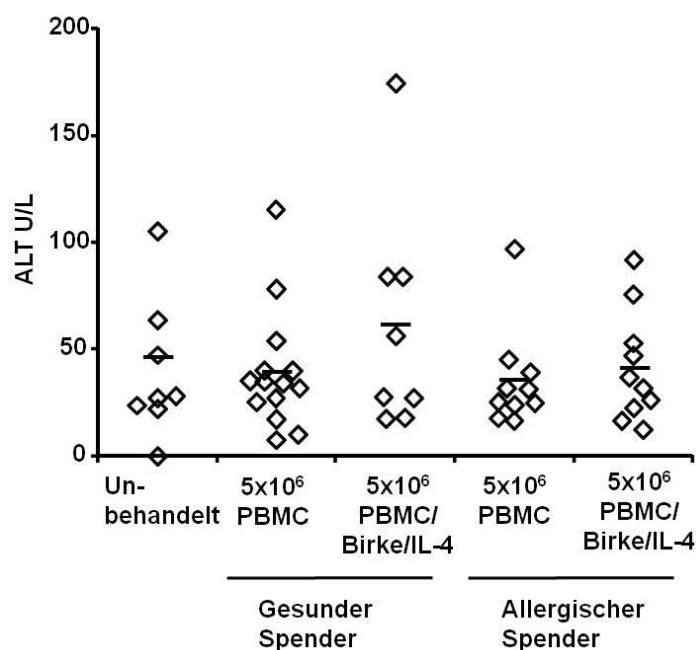


Abbildung 17: Erfassung der ALT-Spiegel humanisierter Mäuse als Ausschlusskriterium einer GvH-Reaktion. Nach dem Transfer von 5×10^6 PBMCs können keine Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrolltieren und PBMC-transferierten Mäusen detektiert werden.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden an Tag 0 mit 5×10^6 PBMCs allergischer oder gesunder Spender humanisiert. Die Zellen wurden ohne Zusätze oder mit Birke und IL-4 transferiert und die Mäuse entsprechend an Tag 7 mit PBS oder erneut mit beiden Zusätzen behandelt. Die Konzentrationen des Enzyms waren in allen Gruppen vergleichbar. Jeder Punkt repräsentiert die ALT-Konzentration einer Maus. Die Balken veranschaulichen die Mittelwerte jeder Gruppe. (ALT Alanin-Aminotransferase; GvH Graft versus Host)

3.3.4 Evaluation der geeigneten Transferbedingungen für das humanisierte Asthmodell in NOD-Scid γ c Mäusen

Fortan wurden 5×10^6 PBMCs für die Humanisierungen der NOD-Scid γ c Mäuse verwendet. Nachdem die geeignete Zellzahl für diesen Stamm durch die vorangegangenen Titrationsversuche ermittelt worden war, sollten nun wie zuvor im NOD-Scid Stamm die Transferbedingungen für eine möglichst ausgeprägte asthmatische Antwort ermittelt werden. Dazu wurden wie zuvor im NOD-Scid Stamm PBMCs alleine, oder zusammen mit Birke oder IL-4 oder beiden Komponenten transferiert.

3.3.5 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in NOD-Scid γ c Mäusen

Die Ergebnisse der Analyse der allergischen Atemwegsentzündung im NOD-Scid γ c Stamm ähnelten den Resultaten, die zuvor aus den NOD-Scid Mäusen gewonnen wurden. Auch in den NOD-Scid γ c Mäusen kam es nach Transfer der PBMCs der atopischen Spender zusammen mit Birke und IL-4 zu einer ausgeprägten AHR begleitet von humanen Infiltraten in der Lunge sowie einem Anstieg der Zellen in der BAL Flüssigkeit.

Als Kontrollen dieser Experimente wurden neben unbehandelten, naiven Tieren ebenso Mäuse, die mit PBMCs nicht-allergischer Spender transferiert wurden, herangezogen. Letztere wurden entsprechend den Mäusen, die mit atopischen PBMCs transferiert wurden, intraperitoneal mit Birke und IL-4 behandelt und an den Tagen 20-22 einer intranasalen Allergenprovokation unterzogen.

3.3.5.1 Analyse der Lungenfunktion im NOD-Scid γ c Stamm

Nach Gabe der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Atemwegswiderstandes verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Auch der Transfer von PBMCs ohne Zusätze oder PBMCs zusammen mit Birke oder IL-4 erhöhte den Atemwegswiderstand. Die Erhöhung in diesen Gruppen war jedoch im Vergleich zu den Tieren, die PBMCs zusammen mit Allergen und IL-4 erhielten weniger stark ausgeprägt.

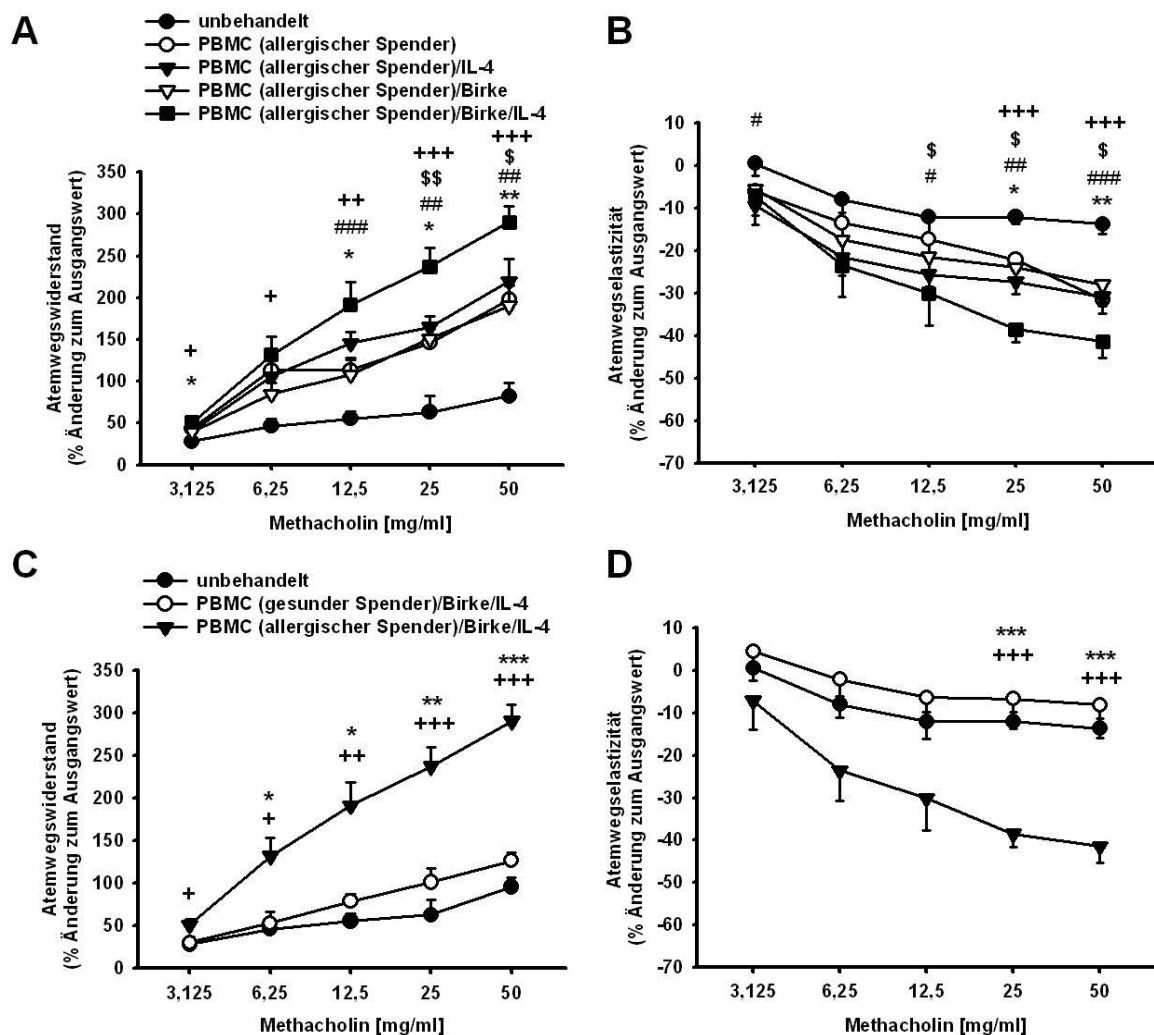


Abbildung 18: Analyse der Lungenfunktion in Mäusen des NOD-Scid γ c Stammes nach Gabe der PBMCs unter verschiedenen Transferbedingungen. Mäuse, die mit PBMCs atopischer Spender rekonstituiert wurden, entwickeln eine AHR.

NOD-Scid γ c Tiere wurden mit 5×10^6 PBMCs allergischer und gesunder Spender unter Zugabe verschiedener Komponenten humanisiert. Die Applikation der Zusätze wurde an Tag 7 wiederholt. Die Analyse der Lungenfunktion erfolgte 48h nach der letzten nasalen Provokation der Atemwege an Tag 24. **A)** Analyse des Atemwegwiderstandes. Dieser war nach Gabe von PBMCs allergischer Spender mit Sensibilisierung gegen das Birkenallergen ohne Zusätze oder zusammen mit Birke oder IL-4 moderat erhöht. Der höchste Atemwegwiderstand resultierte nach Transfer der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4. **B)** Atemwegselastizität entsprechend A. **C)** Zusätzlich zu dem Kontrollansatz unbehandelte Tiere wurden in einer weiteren Kontrolle Tiere mit PBMCs gesunder Spender transferiert. Trotz additiver Gabe von Allergenen und IL-4 kam es in diesem Ansatz zu keiner signifikanten Erhöhung des Atemwegwiderstands. **D)** Atemwegselastizität entsprechend C. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. $n=5-10$. **A, C)** Die Symbole kennzeichnen Unterschiede zwischen unbehandelten und PBMC- (*), PBMC/IL-4- (#), PBMC/Birke- (\$) und PBMC/Birke/IL-4-transferierten (+) Mäusen. **B, D)** Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und PBMC/Birke/IL-4-transferierten (+) sowie Signifikanzen zwischen mit atopischen und nicht-atopischen PBMCs (*) humanisierten Mäusen. *, #, \$, + $p < 0,05$; **, ##, \$\$, ++ $p < 0,01$; ***, ###, +++ $p < 0,001$. (AHR Atemwegsüberempfindlichkeit)

In einem Kontrollexperiment wurde die Lungenfunktion der mit PBMCs gesunder Spender transferierten Tiere mit und ohne Allergen und IL-4 erfasst. Wie im NOD-Scid Stamm zeigte sich auch hier, dass trotz Zusatz von Allergen und IL-4 nach Transfer gesunder Zellen und anschließender allergener intranasaler Provokation eine signifikante Erhöhung des Atemwegswiderstandes ausblieb (Abbildung 18).

3.3.5.2 Untersuchung der BAL in humanisierten NOD-Scid γc

Eine Analyse der Zellen der BAL-Flüssigkeit ergab auch hier, dass überwiegend murine alveolare Makrophagen nachweisbar waren. Die Anzahl an Zellen in der BAL war nach Gabe allergischer PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 verglichen mit allen anderen Gruppen erhöht. Dieser Anstieg war aber statistisch nicht signifikant. Nach Transfer gesunder humaner Zellen zusammen mit Allergen und IL-4 blieb eine Erhöhung der Zellen in der BAL aus. Auch in den NOD-Scid γc Mäusen war die Frequenz der für eine asthmatische Entzündung typischen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sehr gering, doch eine genauere Betrachtung zeigte auch hier eine im Vergleich zu allen weiteren Gruppen eine erhöhte Anzahl dieser Zellen in der BAL nach Transfer der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 (Abbildung 19).

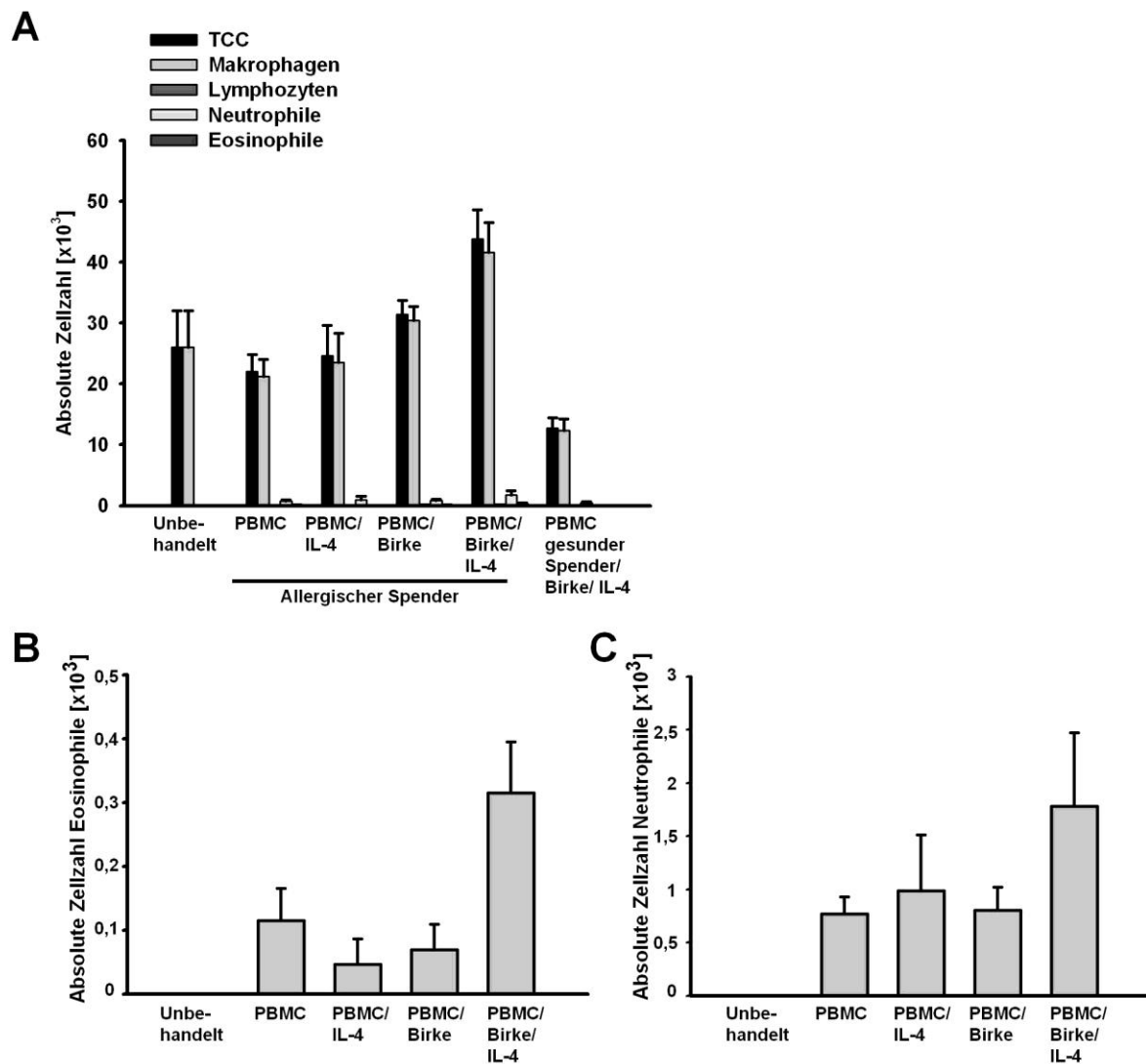


Abbildung 19: Quantifizierung der BAL-Zellen nach Transfer von 5×10^6 PBMCs in NOD-Scid γ c Mäuse. Aus dem Transfer der humanen Zellen atopischer Spender mit Birke und IL-4 resultiert eine erhöhte Zellfrequenz im bronchoalveolären Raum.

NOD-Scid γ c Tiere wurden mit 5×10^6 PBMCs allergischer und nicht-allergischer Spender in Kombination mit Allergenen und IL-4 humanisiert, an Tag 7 erneut mit Birke und IL-4 und entsprechend des Protokolls vor Versuchsende i.n. provoziert. Am Versuchstag wurde unter anderem die BAL-Flüssigkeit entnommen und auf Entzündungszellen hin analysiert. **A)** Überblick über die verschiedenen Zellpopulationen in der BAL. Der Vergleich zwischen der Gesamtzellzahl (TCC) und den Makrophagen verdeutlicht, dass diese Population den überwiegenden Teil der in der BAL befindlichen Zellen ausmacht. **B)** Absolute Zellzahl der Eosinophilen in der BAL. **C)** Entsprechend B, Neutrophile. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (i.n. *intranasal*, BAL *Bronchoalveoläre Lavage*)

3.3.5.3 Analyse der humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid γc

Eine detaillierte Untersuchung der humanen Zellen die sich nach dem Versuchszeitraum in den Lungen der NOD-Scid γc Mäuse befanden, zeigte, dass auch in diesem Stamm hauptsächlich T-Zellen nachweisbar sind. Monozyten, NK-Zellen oder Granulozyten konnten mittels FACS-Analyse der humanen Zellen in der Lunge nicht detektiert werden. Der Anteil an B-Zellen war gering. Er betrug nach Transfer allergischer PBMCs mit Birke und IL-4 $0,4 \pm 0,08\%$ (n=10).

Die Frequenzen der humanen T-Zellen in den Lungen der humanisierten NOD-Scid γc Mäuse waren in allen Gruppen vergleichbar hoch. In Kontrollansätzen wurden Tiere mit PBMCs nicht-allergischer Spender zusammen mit Allergen und IL-4 humanisiert. Im Vergleich zu den mit atopischen PBMCs transferierten Mäusen zeigte sich nach Gabe der nicht-allergischen PBMCs eine verminderte Migration der humanen Zellen in die Lungen (Abbildung 20).

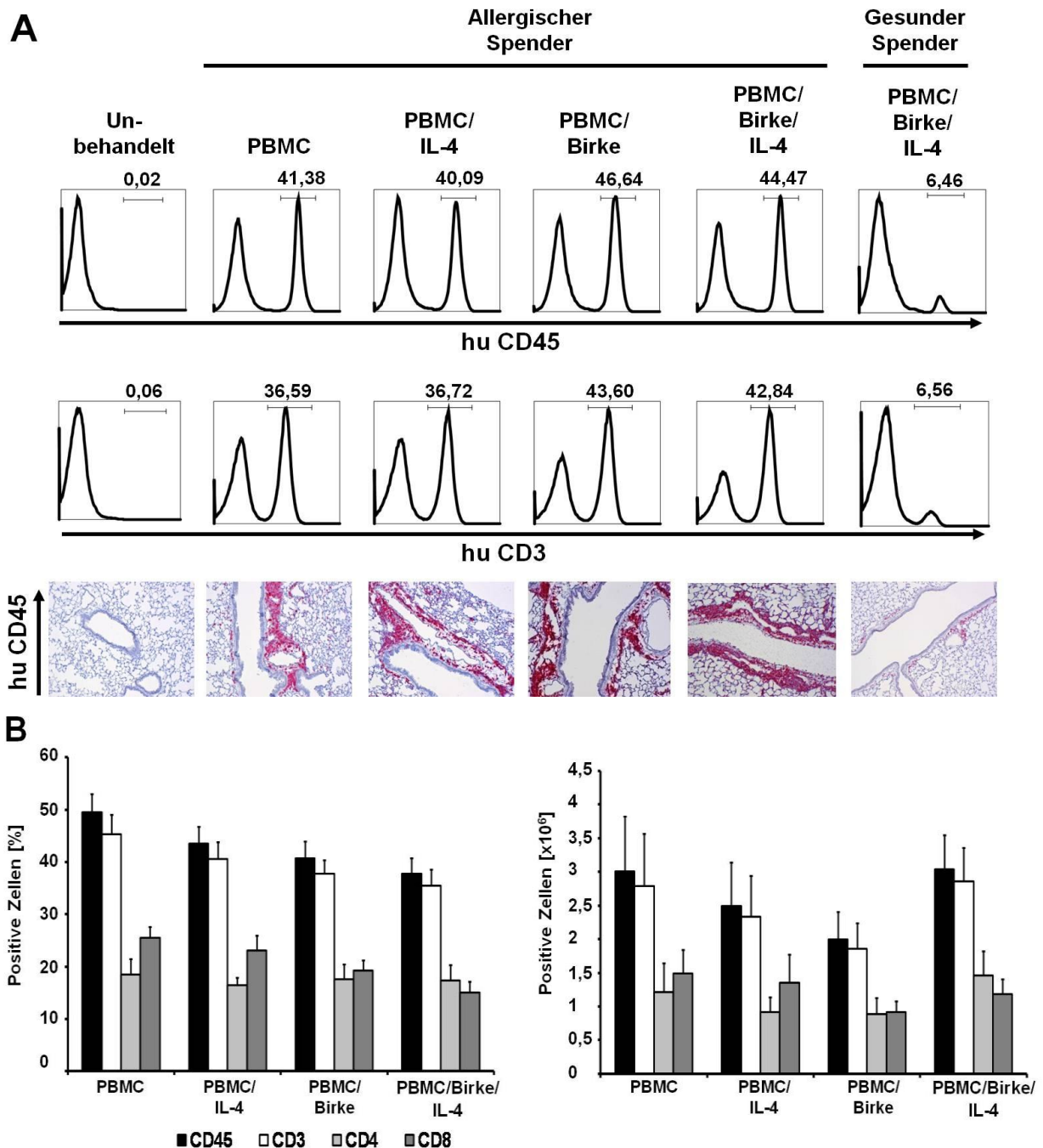


Abbildung 20: Nach der Gabe atopischer PBMCs kommt es nach i.n. Provokation zum erhöhten Einstrom humaner Zellen in die Lungen von NOD-Scid γ c Mäusen.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden entsprechend des Protokolls mit 5×10^6 PBMCs allergischer Spender humanisiert. Die PBMCs wurden alleine oder mit verschiedenen Zusätzen injiziert. Entsprechend der Bedingungen bei Zellgabe wurden die Tiere an Tag 7 erneut mit Allergen und / oder IL-4 behandelt und 48h vor Versuchsende i.n. provoziert. Als Kontrolle wurden PBMCs gesunder Spender transferiert. **A)** Histogramme der FACS-Messung gegen humanes CD45 und den humanen T-Zellmarker CD3. Darunter die histologische Färbung von Lungenschnitten gegen den humanen Leukozytenmarker CD45 (100x). Die Daten veranschaulichen repräsentativ jeweils eine Maus der entsprechenden Gruppe. **B)** Zusammenfassung der FACS-Färbungen gegen CD45, 3, 4 und 8 aus 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten nach Humanisierung mit atopischen PBMCs, Mittelwerte \pm SEM (n=5-8). (hu *human*, i.n. *intranasal*)

3.3.6 Nachweis humaner Zellen in weiteren Geweben von NOD-Scid γ c Tieren

Nach Humanisierung der NOD-Scid γ c Mäuse mit 5×10^6 PBMCs atopischer Spender waren auch in Blut und Milzen humane T-Zellen mittels FACS-Färbung nachweisbar. Nach dem Transfer allergischer PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 betrug der Anteil humaner T-Zellen an den lebenden Zellen im Blut der Mäuse $32,21 \pm 4,5\%$ und in den Milzen $46,56 \pm 5,3\%$. Die Werte wurden aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt (n=8).

3.3.7 Restimulation der humanen CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen der NOD-Scid γ c Mäuse

Beruhend auf der Annahme, die Atemwegsentzündung in den immundefizienten Mäusen sei auf den Transfer von birkenspezifischen T-Zellen der allergischen Spender zurückzuführen, sollte deren Proliferation durch wiederholte Allergenkonfrontation in den Mäusen gefördert werden. Aufgrund des geringen Anteils spezifischer T-Zellen im gesamten T-Zellrepertoire sollte somit eine Erhöhung der Anzahl birkenspezifischer T-Zellen erreicht werden.

Um die Allergen-Spezifität der humanen Zellen in der Maus näher zu beleuchten, wurden die humanen CD4⁺-T-Zellen mittels der MACS-Bead-Technik an Tag 24 nach PBMC-Transfer aus den Milzen der Mäuse isoliert und mit zuvor generierten dendritischen (DCs) Zellen des Spenders restimuliert. Abbildung 21 veranschaulicht, dass die humanen CD4⁺ T-Zellen dabei aus Mäusen stammten, die unter unterschiedlichen Bedingungen humanisiert wurden. Die humanen T-Zellen wurden in separaten Ansätzen aus den Milzen PBMC-, PBMC/IL-4-, PBMC/Birke- und PBMC/Birke/IL-4-transferierter Mäuse isoliert (*ex vivo*). Für die Isolation der humanen T-Zellen wurden Milzzellen verwendet, da sich im Vergleich zur Lunge hier höhere Zahlen humaner Zellen befanden und somit trotz des Zellverlustes bei der MACS-Bead-Technik eine ausreichende Zellmenge für die Restimulation gesichert werden konnte. In einem Kontrollansatz wurden CD4⁺ T-Zellen des Spenders, die nicht mit der Maus in Berührung kamen (hu T-Zellen), restimuliert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch den Einbau radioaktiven Thymidins aufgedeckt. Die DCs, die für die Restimulation genutzt wurden, wurden mit Birkenallergen oder Tetanustoxoid beladen. Auf diese Weise sollte detektiert werden, ob die

birkenspezifischen T-Zellen aus dem allergischen Spender in der Maus durch die wiederholte Reizung mit dem Birkenallergen auf den spezifischen Stimulus hin effektiver proliferierten als nach dem unspezifischen Stimulus mit Tetanustoxoid. In weiteren Kontrollansätzen wurden die humanen T-Zellen mit unbeladenen DCs kultiviert. Die polyklonale Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern sollte als Positivkontrolle für die Stimulation dienen. Der Ausreifungsstatus der DCs wurde vor Kultivierung mittels FACS-Färbung überprüft (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 21 zeigt, dass in den Kontrollansätzen, in denen sich nur T-Zellen ohne DCs befinden wie erwartet keine Proliferation stattfand. In den Kulturansätzen in denen sich die CD4⁺ T-Zellen des Spenders (hu T-Zellen) oder jene aus der Maus (*ex vivo*) mit den DCs befanden resultierte im Vergleich zu den Ansätzen ohne DCs eine gesteigerte Proliferation. Die Restimulation mit unbeladenen DCs steigerte die Proliferation der humanen CD4⁺ T-Zellen, die nicht mit Mäusen konfrontiert wurden, nur gering. Im Gegensatz dazu proliferierten die CD4⁺ T-Zellen aus den Mäusen nach Stimulation mit unbeladenen DCs in gesteigertem Maß. Nach Stimulation der T-Zellen mit Tetanustoxoid-beladenen DCs resultierten in allen Gruppen gesteigerte Proliferationsraten. Auch nach Stimulation mit den birkenbeladenen DCs kam es in allen Gruppen zu einer gesteigerten Proliferation der T-Zellen. Dabei war die höchste Proliferationsrate in den Kulturansätzen mit CD4⁺ Zellen aus den Tieren, welche die PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 bekommen hatten, detektierbar. In dieser Gruppe kam es gegenüber der Restimulation mit den unbeladenen DCs zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Transfer der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 das Überleben und die Proliferation der birkenspezifischen T-Zellen am ehesten fördert und bestätigt somit die bisherigen Resultate. In den folgenden Experimenten wurden somit die PBMCs stets zusammen mit Birke und IL-4 transferiert.

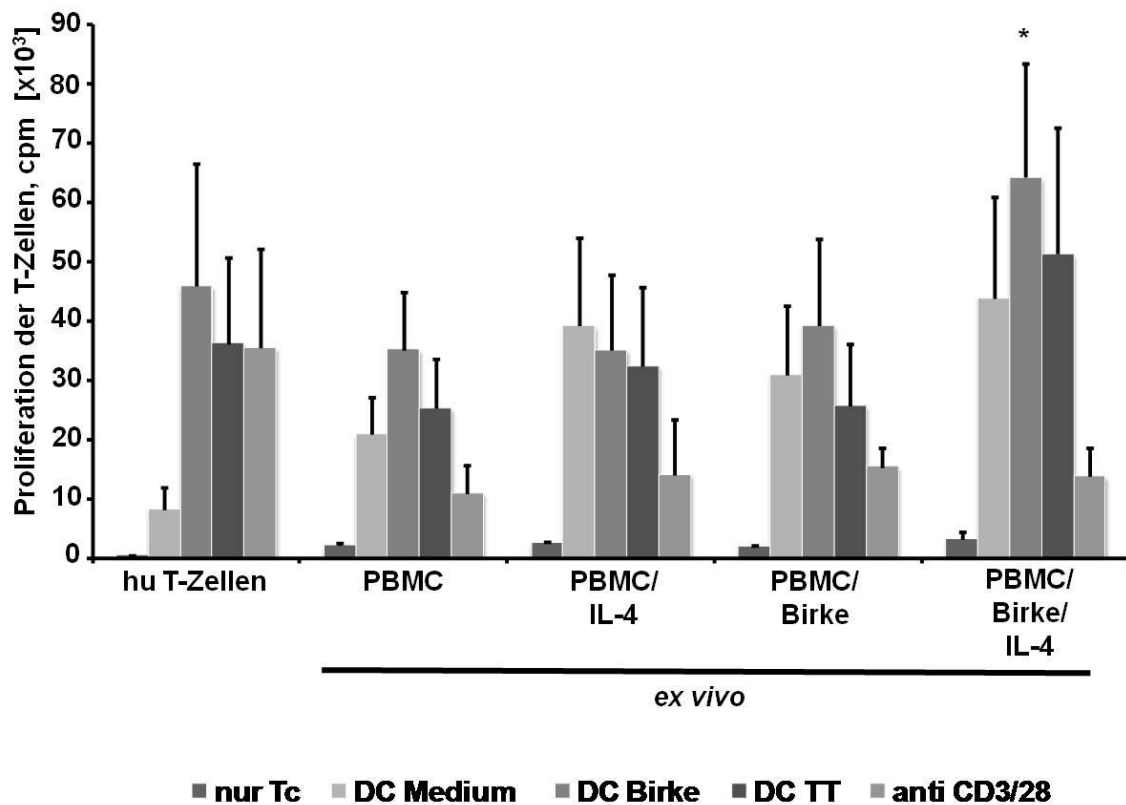


Abbildung 21: Restimulation der humanen CD4⁺ T-Zellen isoliert aus NOD-Scid γ c Mäusen mit autologen humanen DCs. Die höchste Proliferationsrate ist nach Restimulation der humanen CD4⁺ T-Zellen aus den Mäusen, die unter additiver Gabe von Birke und IL-4 humanisiert wurden, mit Birken-beladenen DCs detektierbar.

NOD-Scid γ c Milzen wurden entnommen, humane CD4⁺ T-Zellen mittels MACS-Separationstechnik daraus isoliert und mit DCs des Spenders restimuliert. Die DCs wurden vor Einsatz in die Kokultur mit Birke oder Tetanustoxoid beladen (DC Birke, DC TT) oder ohne Zusatz eines Allergens ausgereift (DC Medium). Als weitere Kontrollen dienten Ansätze in denen sich ausschließlich T-Zellen befanden (nur Tc) sowie Ansätze in denen die T-Zellen polyklonal mit CD3/28 stimuliert wurden. Neben den aus den PBMC-transferierten Mäusen isolierten T-Zellen (*ex vivo*) wurden T-Zellen des Spenders (hu T-Zellen) restimuliert, die nicht mit Mäusen in Berührung gekommen waren. Die Restimulation der T-Zellen mit den DCs führte zur Proliferation der T-Zellen. Nach dem Transfer der PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 in NOD-Scid γ c und Isolation der CD4⁺ T-Zellen an Tag 24 konnten in den Kokulturen der T-Zellen mit Birken-beladenen DCs die höchsten Proliferationsraten detektiert werden. In der Kokultur humaner CD4⁺ T-Zellen isoliert aus Mäusen, die mit PBMCs, Birke und IL-4 humanisiert wurden und Birken-beladenen DCs kam es im Vergleich zur Restimulation mit unbeladenen DCs zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation (* $p < 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit $n=9-10$. (DCs *dendritische Zellen*, MACS *magnetic activated cell sorting*)

3.3.8 Zytokinmuster der humanen CD4⁺ T-Zellen

Das Zytokinmuster gibt Aufschluss über die Art der Immunantwort. Um die allergische Atemwegsentzündung im etablierten Modell zu erforschen wurde das Zytokinprofil der humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht. Aufgrund der sehr geringen Konzentrationen humaner Zytokine in BAL und Serum der humanisierten Mäuse wurden die Überstände der Restimulationsansätze mit humanen DCs und T-Zellen (3.3.7) aus der Maus auf ihren Zytokingehalt hin untersucht. Es zeigte sich ein erhöhter Anteil an IL-13 nach Restimulation der humanen T-Zellen aus den PBMC/Birke/IL-4-transferierten Tieren mit Birken-beladenen DCs. Nach Restimulation der T-Zellen mit unbeladenen oder Tetanustoxoid-beladenen DCs war die IL-13 Produktion vergleichsweise niedriger (Daten nicht gezeigt).

3.3.9 Nach der intranasalen Provokation der Atemwege mit PBS bleibt die Entwicklung einer AHR aus und die Frequenzen der humanen Zellen in der Lunge sind reduziert

Ein weiteres Kontrollexperiment sollte die Rolle des Allergens für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung in dem etablierten System näher beleuchten. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass nach Transfer von PBMCs eines nicht-allergischen Spenders und der anschließenden nasalen Provokation mit dem Birkenallergen die Entstehung einer Atemwegsinfektion ausblieb. Im folgenden Experiment sollte nun die Bedeutung der intranasalen Allergenbehandlung für die Atemwegsentzündung näher untersucht werden. Dazu wurden NOD-Scid γ c Mäuse mit den PBMCs allergischer Spender zusammen mit Allergen und IL-4 humanisiert und an Tag 7 erneut mit Allergen und IL-4 behandelt. Die intranasale Provokation erfolgte gemäß Protokoll an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Allergen oder PBS. Nach intranasaler Applikation des Birkenallergens kam es wie erwartet zur AHR, während eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes nach nasaler Gabe von PBS ausblieb. Die Auswertung der Zellen in der BAL-Flüssigkeit ergab eine leichte Erhöhung der Gesamtzellzahl nach PBS-Provokation verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Die intranasale Provokation mit Birke steigerte Gesamt- und Neutrophilenzellzahl verglichen mit PBS-provozierten Tieren signifikant und führte zu den höchsten Zellzahlen in der BAL. Die Untersuchung der humanen Zellen in den

Lungen der NOD-Scid γ c Tiere zeigte einen deutlichen Anstieg der Frequenzen der humanen CD45⁺ Zellen nach der intranasalen Provokation mit Birke. Im Gegensatz dazu zeigten die PBS-provozierten Tiere eine deutlich verminderte Anzahl humaner CD45⁺ Zellen in den Lungen verglichen mit den allergenprovozierten Tieren (Abbildung 22).

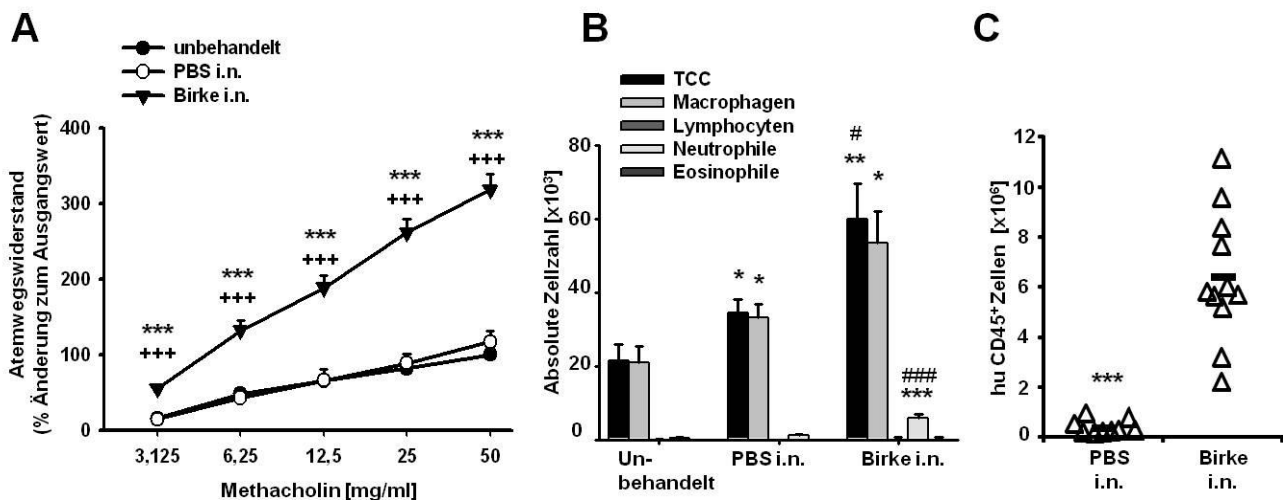


Abbildung 22: Nach i.n. Behandlung mit PBS ist keine Atemwegsinflammation nachweisbar.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit 5×10^6 PBMCs allergischer Spender mit IL-4 und Birke humanisiert. Die nasale Behandlung an den Tagen 20-22 erfolgte mit PBS oder Birkenallergen. **A**) Lungenfunktionsmessung. Nach Provokation mit PBS blieb die Entstehung einer AHR aus. Die Symbole kennzeichnen den Vergleich unbehandelter (+) und PBS-provozierter (*) mit PBMC/Birke/IL-4-transferierten Mäusen. **B**) Analyse der BAL-Zellen. Die i.n. PBS-Behandlung führte verglichen zur allergenprovozierten Gruppe zu einem signifikant verminderten Gesamtzell- und Neutrophileninflux in die Lunge. * Vergleich unbehandelter Mäuse mit PBMC-transferierten Tieren, #: Vergleich PBS-provozierter Mäuse mit Allergen-provozierten Tieren. **C**) Analyse der humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid γ c Mäuse mittels FACS-Färbung mit Antikörpern gegen den humanen Leukozytenmarker CD45. Die Frequenz der humanen CD45⁺ Zellen in den Lungen der humanisierten Mäuse war nach i.n. PBS-Provokation im Vergleich zu den allergen-provozierten Tieren signifikant vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 2 Experimenten, n=9-13. *, # p<0,05; ***, +, ### p<0,001. (i.n. intranasal, TCC Gesamtzellzahl der BAL, AHR Atemwegsüberempfindlichkeit, BAL Bronchoalveoläre Lavage)

3.3.10 Welche T-Zell-Subpopulation ist für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung verantwortlich?

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, welche der humanen T-Zellsubpopulationen für die Entstehung der allergischen Atemwegserkrankung verantwortlich waren. Dazu wurden die CD4-, 8- oder CD3-positiven T-Zellen vor Transfer in die Mäuse mit Hilfe von magnetischen Dynalbeads eliminiert. Der Depletionserfolg wurde mittels FACS-Färbung überprüft. Er lag typischerweise bei 99% (Abbildung 23).

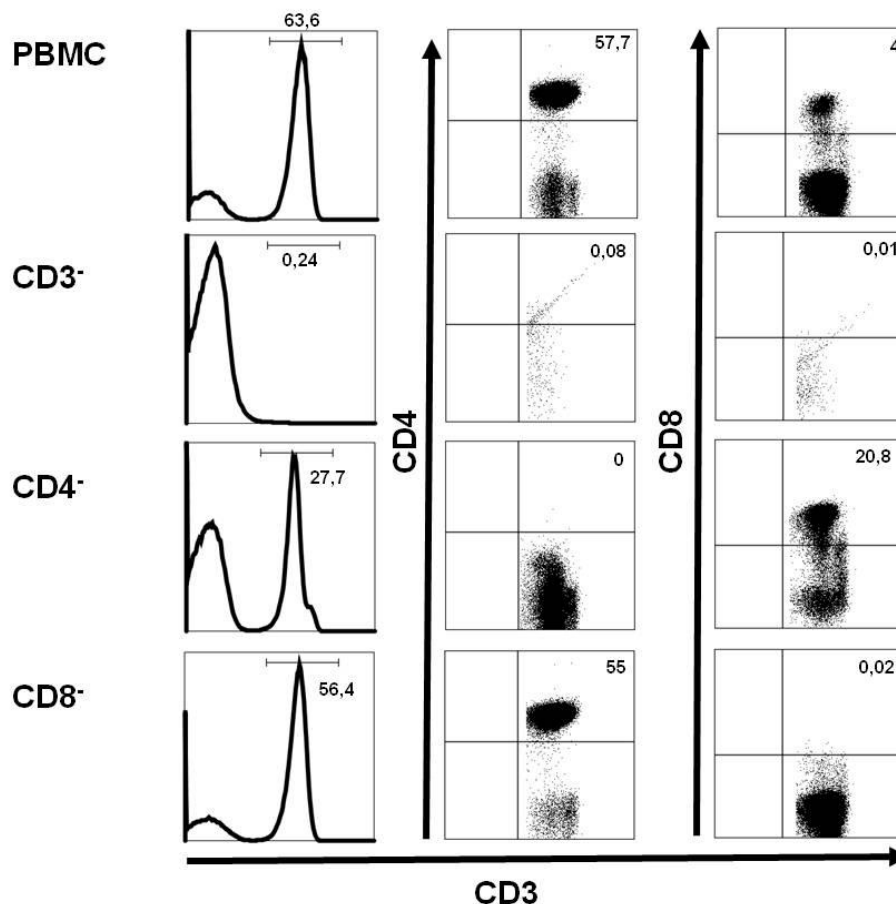


Abbildung 23: FACS-Analyse der CD3-, 4- und 8-depletierten PBMCs. Die Depletion führt zu einem vollständigen Verlust der jeweiligen Zellpopulation aus der PBMC-Fraktion.

Nach der Isolation der PBMCs aus dem Blut allergischer Spender über die Ficoll-dichtezentrifugation wurden verschiedene T-Zellsubpopulationen mit magnetischen Beads eliminiert. Veranschaulicht ist die FACS-Analyse der PBMCs vor Elimination verschiedener T-Zellsubpopulationen (oben) sowie nach Depletion aller T-Zellen mit magnetischen Beads gegen CD3 oder der T-Zellsubpopulationen mit Beads gegen CD4 und CD8. Die Werte geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellen an den lebenden Zellen an.

Im weiteren Verlauf des Experiments wurden 5×10^6 depletierte PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 in die Mäuse transferiert. Als Positivkontrolle wurden nicht depletierte PBMCs mit Birke und IL-4 injiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich eine Atemwegsinflammation nur dann ausbildete, wenn die transferierten PBMCs $CD4^+$ T-Zellen beinhalten (Abbildung 24). Eine Analyse der BAL-Flüssigkeit der Tiere ergab wie erwartet eine Erhöhung der Gesamtzellzahl nach Transfer der PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4. Die wesentliche Population der Zellen im bronchoalveolären Raum bildeten dabei wiederholt die Makrophagen. Gleichzeitig war die Anzahl neutrophiler Granulozyten erhöht. Eine Depletion der CD3- sowie der CD4-positiven Zellen vor Transfer in die Tiere hob die AHR auf und verminderte den Influx inflammatorischer Zellen in den bronchoalveolären Raum. Eine Entzündungsreaktion blieb in den besagten Gruppen aus, was auch durch die histologischen Färbungen bestätigt wurde. Nach Transfer der CD3- bzw. CD4-depletierten PBMCs konnten in der Lunge keine bzw. nur noch sehr wenige humane $CD45^+$ Zellen detektiert werden. Wie in Abbildung 24 ersichtlich, kam es zu einer signifikanten Reduktion der $CD45^+$ humanen Zellen in den Lungen der NOD-Scid γc Mäuse nach Transfer der CD3- und CD4-depletierten Zellen. Nach Transfer der CD8-depletierten PBMCs konnte hingegen eine mit PBMC-Transfer vergleichbare pulmonale Entzündung detektiert werden. Diese Ergebnisse belegen eindeutig die Notwendigkeit von $CD4^+$ T-Zellen für die Entwicklung der asthmatischen Erkrankung und unterstreichen die T-Zell-Abhängigkeit des etablierten humanisierten Modells der allergischen Atemwegsentzündung.

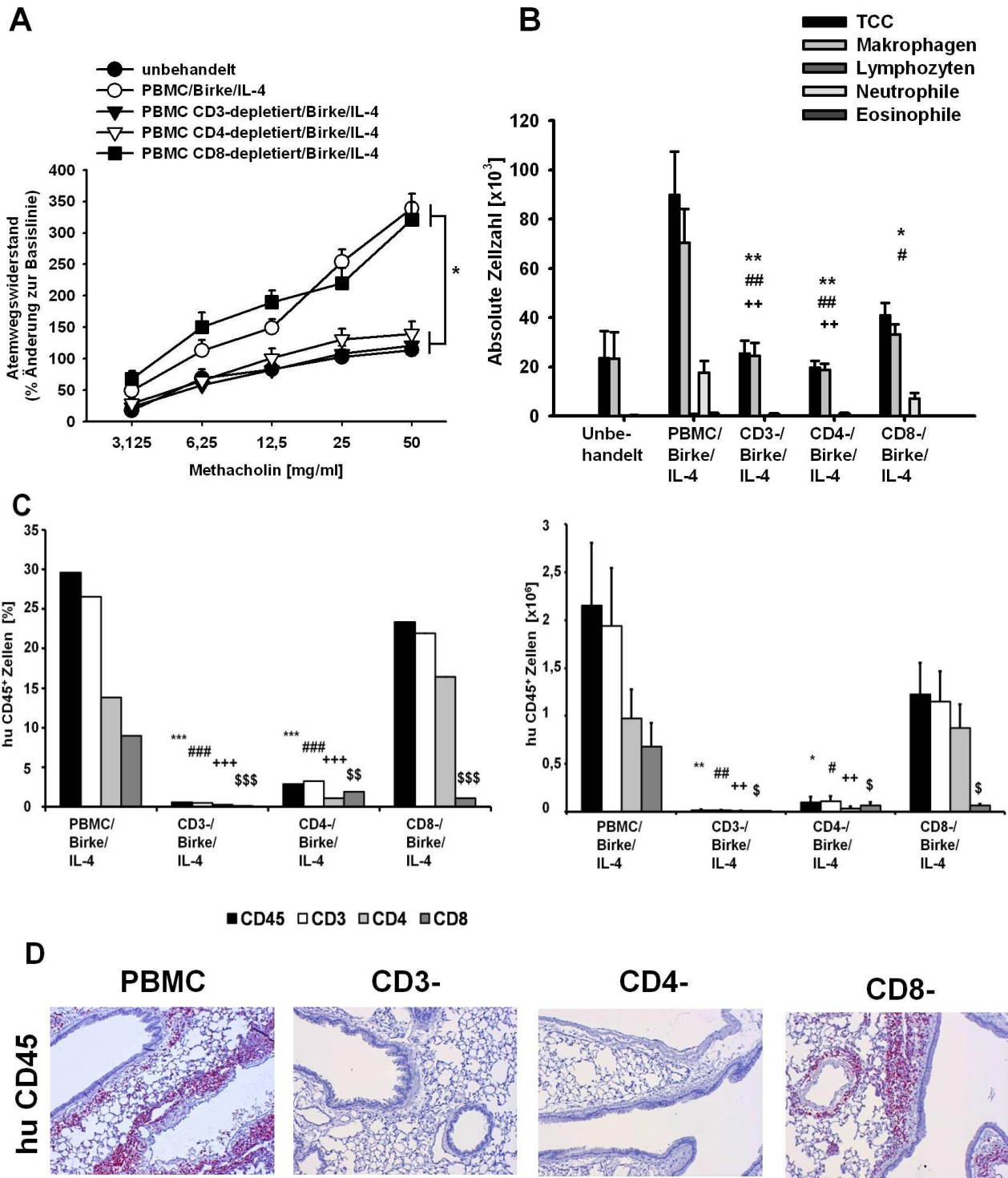


Abbildung 24: Die Depletion von CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen aus den PBMCs vor Transfer hebt die Entzündung in der Lunge auf.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit 5×10^6 PBMCs allergischer Spender zusammen mit Allergen und IL-4 an Tag 0 humanisiert. An Tag 7 wurde Allergen- und IL-4 erneut gegeben. Die Untersuchung der Tiere erfolgte 48h nach der letzten i.n. Provokation mit dem Allergen. **A)** Lungenfunktionsmessung. Nach Transfer der PBMCs sowie der CD8-depletierten PBMCs kommt es zur Ausprägung einer AHR. Nach Applikation von CD3- oder CD4-depletierten Zellen hingegen bleibt eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes aus. Der Vergleich der Mäuse, die PBMCs bzw. CD8-depletierte PBMCs erhielten mit allen übrigen Gruppen erbrachte signifikante Unterschiede. **B)** Analyse der BAL. Nach

Transfer von CD3- oder CD4-depletierten humanen PBMCs ist die Gesamtzellzahl (TCC) bzw. die Anzahl an Makrophagen und Neutrophilen der BAL verglichen zur PBMC-Gruppe signifikant reduziert. Nach Transfer der CD8-depletierten PBMCs nimmt die Zahl der BAL-Zellen tendenziell wieder zu. * Vergleich der Gesamtzellzahl der PBMC-Gruppe mit allen weiteren Depletionsansätzen, # Vergleich der Makrophagenzahl der PBMC-Gruppe mit allen weiteren depletierten Gruppen, + Vergleich der Neutrophilen in der PBMC-Gruppe mit allen weiteren depletierten Gruppen. **C)** FACS-Analyse der humanen CD45⁺, 3⁺, 4⁺ und 8⁺ humanen Zellen in den Lunge der NOD-Scid γ c Tiere. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der PBMC-transferierten Gruppe und allen weiteren Gruppen. **C)** Exemplarische Darstellung der histologischen Färbung gegen humanes CD45 (100x). *, #, \$ p<0,05; **, ##, ++, \$\$ p<0,01; ***, ###, +++, \$\$\$ p<0,001. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. n (unbehandelt) = 3, in allen weiteren Gruppen n=9-10. (hu *human*, i.n. *intranasal*, AHR *Atemwegüberempfindlichkeit*, BAL *bronchoalveoläre Lavage*)

3.3.11 Gp120-vermittelte Reduktion der Atemwegsinfektion

In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen einer Behandlung mit dem Treg-aktivierenden HIV-1-Hüllprotein gp120 auf die allergische Atemwegsentszündung in den NOD-Scid γ c Mäusen untersucht werden. Zunächst wurden das gp120 bei Zellgabe an Tag 0 verabreicht, um die generelle Wirksamkeit in dem humanisierten Mausmodell zu analysieren. Nach intraperitonealer Gabe des PBMC/Birke/IL-4-Gemisches und gp120 an Tag 0 kam es im Vergleich zu nicht gp-behandelten Tieren zu einer deutlichen Verminderung der AHR sowie des Influx an Zellen in den bronchoalveolären Raum (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Behandlung mit dem HIV-Hüllproteins an Tag 0 kurative Resultate erbrachte, wurden im Anschluss Experimente durchgeführt in denen die therapeutische Wirksamkeit des gp120 nach Initiierung der allergischen Atemwegsentszündung ergründet werden sollte. Eine Behandlung mit gp120 erfolgte deshalb an Tag 18 einen Tag vor der intranasalen Provokation der Tiere. Die Behandlung mit gp120 nach Transfer von 5×10^6 PBMCs eines atopischen Donors in NOD-Scid γ c führte zu einer signifikanten Reduktion des Atemwegswiderstandes im Vergleich zu PBMC/Birke/IL-4-transferierten und gp120-unbehandelten Mäusen (Abbildung 25). Die Auswertung der BAL-Flüssigkeit ergab eine signifikante Verringerung der Gesamtzellzahl, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im bronchoalveolären Raum infolge der gp120 Injektion. Weiterhin verdeutlichten die Gewebeschnitte der Lunge die Entzündungsinhibition durch gp120. Infolge der

Verabreichung von gp120 resultierte ein Rückgang der Einwanderung der humanen CD45⁺ Zellen in die Lunge.

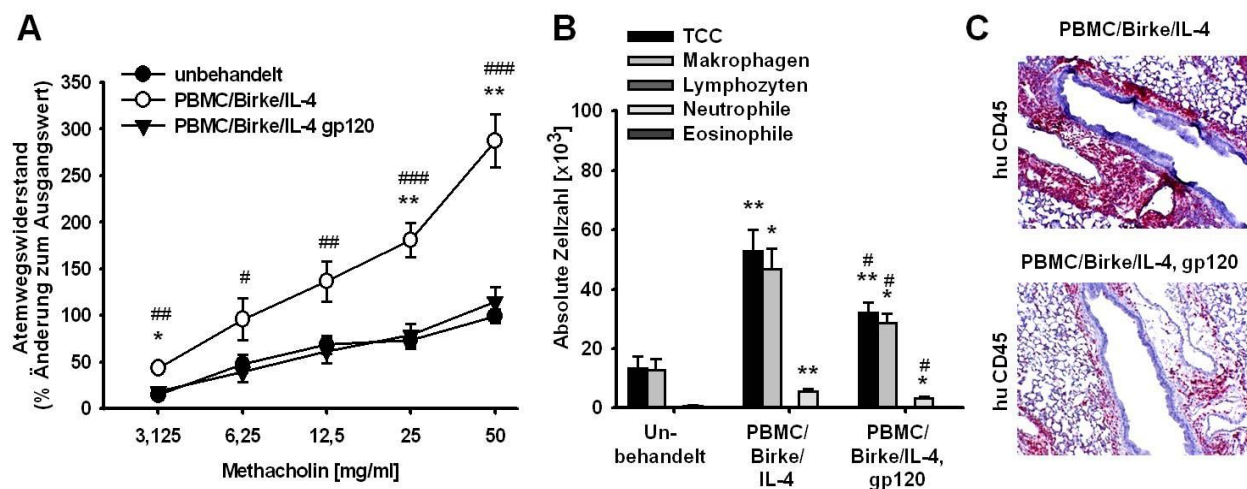


Abbildung 25: Eine Behandlung mit gp120 vermindert die allergen-induzierte Atemwegsinfektion.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit 5×10^6 PBMCs allergischer Spender unter Zugabe von Birkenallergen und IL-4 an Tag 0 humanisiert. Eine erneute Gabe des Allergens und IL-4 erfolgte an Tag 7, die nasale allergene Provokation der Atemwege an den Tagen 20-22. **A)** Lungenfunktionsmessung. Die Applikation des gp120 an Tag 18 vermindert die AHR im Vergleich zu nicht gp120-behandelten Tieren signifikant. * Vergleich zwischen unbehandelten Kontrolltieren und PBMC/Birke/IL-4-behandelten Mäusen, # Vergleich zwischen gp120-unbehandelten und gp120-therapierten Tieren. **B)** Analyse der BAL-Zellen. Im Zuge der gp120-Behandlung kommt es zur signifikanten Reduktion der Gesamtheit aller Zellen in der BAL (TCC), die sich insbesondere aus alveolären Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zusammensetzt. * Vergleich der beiden PBMC-Gruppen mit unbehandelten Kontrolltieren. # Vergleich der PBMC/Birke/IL-4-Gruppe mit gp120-behandelten Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten, n=5-15. *, # p<0,05; **, ## p<0,01; ***, ### p<0,001. **C)** Gewebeschnitte der Lunge mit Antikörperfärbungen gegen humanes CD45. 100x. (hu human, AHR Atemwegsüberempfindlichkeit, BAL Bronchoalveoläre Lavage)

3.3.12 Sind die Effekte des gp120 auf regulatorische T-Zellen zurückzuführen?

In den weiteren Experimenten sollte geklärt werden, inwieweit Tregs für die Effekte des gp120 verantwortlich waren.

Um die Abhängigkeit der anti-inflammatorischen Wirkung des gp120 von Tregs zu erforschen wurden diese vor Transfer in die immundefizienten Tiere mit der Dynabeads-Methode (2.2.2.7) depletiert und der Depletionserfolg mittels FACS-Färbung überprüft. Eine Depletion der CD25⁺ Zellen führte neben der Reduktion der CD25-positiven Zellen auch zu einer verminderten Anzahl Foxp3-positiver Zellen (Abbildung 26).

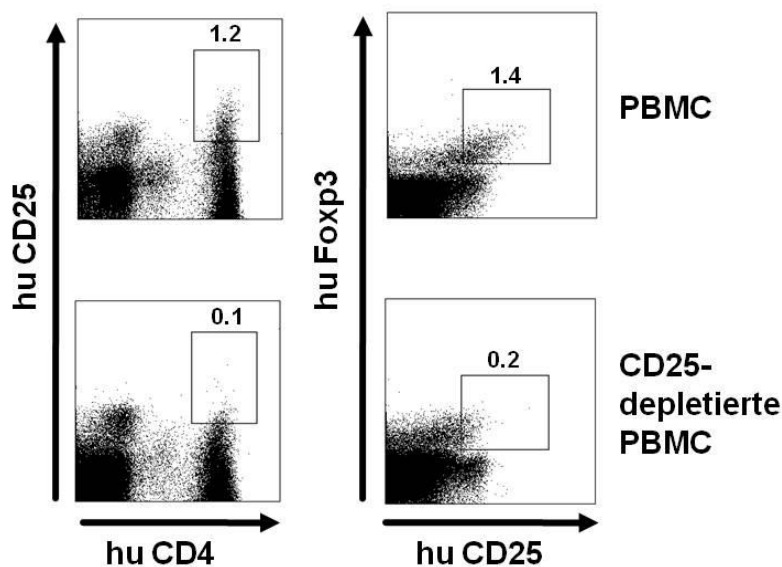


Abbildung 26: FACS-Analyse der PBMCs nach Depletion von Tregs aus dem Blut allergischer Spender mit Antikörpern gegen die humanen Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie das intrazelluläre Protein Foxp3. Die Depletion eliminiert CD25^{hoch}- sowie Foxp3-exprimierende Zellen.

Mit Hilfe magnetischer Beads, welche spezifisch humane CD25^{hoch}-exprimierende Zellen binden, wurde diese Zellfraktion aus der PBMC-Suspension entfernt. Die Depletion der CD25^{hoch}-exprimierenden Zellen aus den frisch isolierten PBMCs verminderte auch die Foxp3-Expression. Dargestellt ist veranschaulichend die FACS-Analyse der PBMCs eines atopischen Spenders vor und nach Depletion der CD25^{hoch}-exprimierenden Zellen. Angegeben ist der prozentuale Anteil der eingegrenzten Population an der Lymphozytenpopulation. (hu *human*)

Der Transfer CD25-depletierter PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 führte zu einer mit PBMC-transferierten Tieren vergleichbaren Entzündung. Es resultierten ähnliche Gesamtzellzahlen humaner Zellen in Lunge und Milz sowie BAL und Blut.

Im Folgenden wurden PBMC-transferierte NOD-Scid γ c sowie Mäuse, die mit CD25-depletierten PBMCs humanisiert worden waren (CD25⁻), an Tag 18 mit gp120 behandelt. Die Depletion der Tregs innerhalb der transferierten PBMCs führte zu einer Aufhebung der anti-inflammatorischen Effekte des gp120 (Abbildung 27).

Wurden Treg-depletierte PBMCs transferiert blieb eine signifikante Reduktion der AHR infolge einer gp120-Behandlung aus. Weiterhin ergab die Analyse der zellulären Zusammensetzung der BAL keine Reduktion der Zellzahlen durch Behandlung CD25⁻-transferierter Mäuse mit gp120. Gesamtzellzahl (TCC), Makrophagen und Neutrophile der CD25⁻-transferierten Tiere befanden sich unabhängig von einer gp120-Behandlung auf ähnlichem Niveau. Eine signifikante Verminderung des Zellgehaltes in der BAL war nur nach gp120-Behandlung PBMC-transferierter NOD-Scid γ c nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse waren auch in der Histologie der Lunge erkennbar. Führt Transfer von PBMCs mit Allergen und IL-4 und die anschließende Behandlung mit gp120 zur Inflammationsreduktion, so waren die anti-inflammatorischen Effekte aufgehoben, wenn keine Tregs innerhalb der PBMCs injiziert wurden. Zum einen verdeutlichte die H&E Färbung und die entsprechende Auswertung mehrere Experimente den Rückgang der Inflammation ausschließlich nach Transfer der PBMCs mit Tregs. Es waren vermindert inflammatorische Infiltrate im Lungengewebe in Folge der gp120 Behandlung nachweisbar. Zum anderen konnten auch nach Analyse der PAS-Färbung eine deutliche Verminderung der Becherzellmetaplasie festgestellt werden, vorausgesetzt Tregs waren Bestandteil der injizierten PBMC-Suspension. Wurden die Tiere an Tag 18 mit gp120 behandelt, waren signifikant weniger PAS⁺-Zellen pro mm Basalmembran detektierbar. Der Transfer Treg-depletierter PBMCs hob die histologisch evaluierte signifikante Reduktion der Inflammation durch gp120 auf. Diese Ergebnisse sprechen für eine Abhängigkeit der Effekte des gp120 von der Anwesenheit regulatorischer T-Zellen.

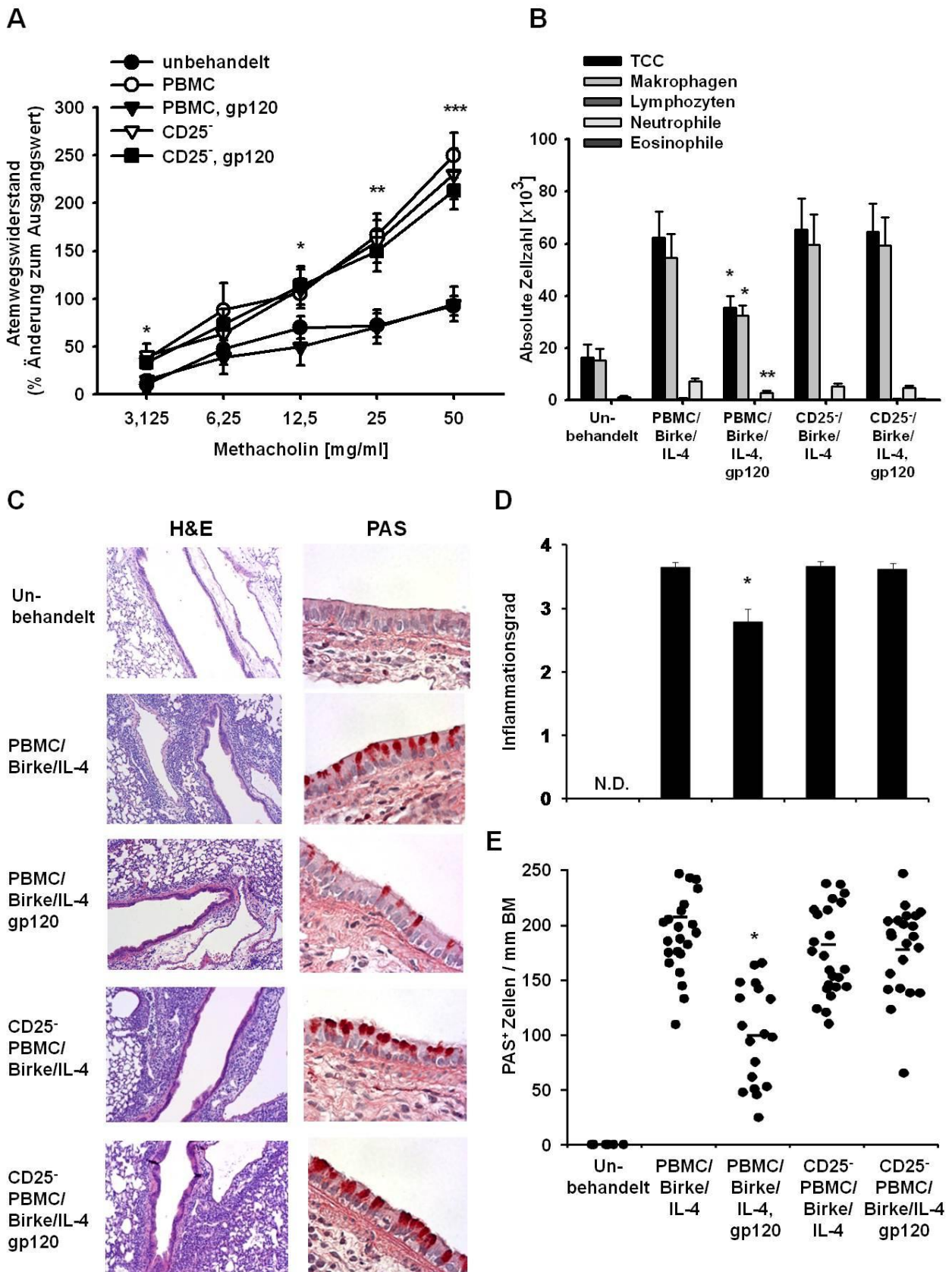


Abbildung 27: Die Depletion der Tregs vor Transfer in NOD-Scid γ c Mäuse hebt die antiinflammatorische Wirkung des gp120 auf.

NOD-Scid γ c Mäuse wurden mit 5×10^6 PBMCs oder CD25-depletierten PBMCs allergischer Spender unter Zugabe des Birkenallergens und IL-4 humanisiert. Die Injektion des Allergens und IL-4 wurde an Tag 7 wiederholt. Eine Behandlung der Mäuse mit gp120 erfolgte an Tag 18. 48h nach der dritten

intranasalen Allergenprovokation wurden die Tiere analysiert. **A)** Lungenfunktionsmessung. **B)** Zellkomposition der BAL. **C)** Detektion der Lungeninflammation mit H&E-Färbung (100x) und PAS-Färbung (500x), welche die mukusproduzierenden Becherzellen hervorhebt. **D)** Die unter C repräsentativ dargestellten Lungensektionen wurden anhand eines semiquantitativen Bewertungssystems der H&E-Färbung (Einstufung nach Schwere der Inflammation 0-4) kategorisiert. **E)** Quantifizierung der mukusproduzierenden Becherzellen pro mm Basalmembran. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. $n=5-10$. Das Symbol kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen PBMC-transferierten und gp120-behandelten Tieren. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (TCC Gesamtzellzahl der BAL, BAL Bronchoalveoläre Lavage, N.D. nicht detektierbar)

Mittels einer FACS-Färbung gegen humane $CD4^+$ T-Zellen wurden die humanen Zellen in den Lungen der PBMC- oder $CD25^-$ -transferierten und gp120-therapierten NOD-Scid γc weiter untersucht. Eine nähere Analyse der humanen Zellen in der Lunge mittels FACS-Färbung ergab im Vergleich zu den nicht mit gp120 behandelten Tieren eine signifikante Verminderung der $CD4^+$ T-Zellen im Lungengewebe (Abbildung 28). Die tendenzielle Reduktion der $CD4^+$ humanen Zellen in der Lunge nach Transfer $CD25^-$ -depletierter PBMCs und gp120-Behandlung war hingegen nicht signifikant.

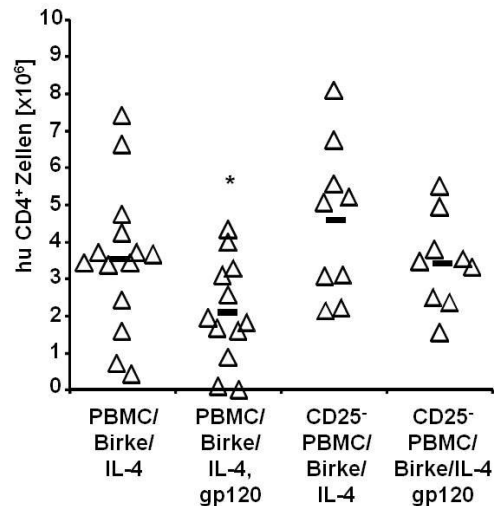


Abbildung 28: Reduktion der humanen $CD4^+$ T-Zellen in den Lungen PBMC-transferierter NOD-Scid γc nach Applikation von gp120.

NOD-Scid γc Tiere wurden an Tag 0 mit atopischen PBMCs, Birke und IL-4 humanisiert. An Tag 7 wurden erneut Allergen und IL-4 injiziert. Die Provokation der Atemwege mit Birkenallergen erfolgte an den Tagen 20-22, eine Analyse der Atemwegsinfektion 48h später. Dargestellt sind die absoluten Frequenzen humaner $CD4^+$ T-Zellen in den Lungen der NOD-Scid γc Mäuse. Jedes Symbol veranschaulicht die jeweilige Frequenz der humanen $CD4^+$ T-Zellen in der Lunge einer Maus, die Balken geben den Mittelwert an. $n=9-14$. Das Symbol kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen PBMC-transferierten unbehandelten und gp120-behandelten Tieren (* $p<0,05$).

4. Diskussion

Das Immunsystem hat im Wesentlichen zwei wichtige Aufgaben. Zum einen beschützt es den eigenen Körper vor potentiellen Gefahren aus der Umgebung, die jederzeit in Form von zahlreichen Pathogenen lauern. Zum anderen wird aber gegenüber eigenen Körpergeweben, Nahrung und sonstigen unschädlichen Umweltfaktoren Toleranz entwickelt. Eine fehlgeleitete Immunantwort kann Autoimmunität oder Allergie verursachen. Allergische Erkrankungen zeigen weltweit eine zunehmende Prävalenz. Die Gründe, die zur Entstehung von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen harmlose Substanzen aus der Umwelt in genetisch prädisponierten Individuen führen, werden bis zum heutigen Tage kontrovers diskutiert. Neben sehr hohen Hygienestandards in den zivilisierten Gesellschaften kommen Veränderungen der Umwelt wie gesteigerter Pollenflug von Pflanzen in Folge zunehmender Umweltbelastung und Klimaerwärmung oder die adjuvante Wirkung von an Pollen haftenden Rußpartikeln als potentielle Ursache in Betracht. Zu den allergischen Erkrankungen mit fortschreitendem Ausmaß zählt auch das Asthma bronchiale. Derzeitige Therapien mit antiinflammatorischen Substanzen wie Kortikosteroiden oder Bronchodilatoren zielen auf die topische oder systemische Hemmung der Entzündung ab. Die seit 2005 zugelassene spezifische Therapie mit anti-IgE Antikörpern stellt eine weitere Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit schwerem allergischen Asthma dar (154). Bei den erwähnten Behandlungsansätzen handelt es sich jedoch eher um Strategien, die den Symptomen der allergischen Erkrankung entgegenwirken ohne die Ursache zu beheben. Das ultimative Ziel der Behandlung allergischer Erkrankungen, die Erzeugung einer allergenspezifischen Toleranz, wird hierbei jedoch nicht erreicht. Die derzeit einzige verfügbare Therapieform, die auf einen toleranzinduzierenden Effekt abzielt, ist die allergenspezifische Immuntherapie (SIT). Eine erfolgreiche SIT ist mit der Induktion von Tregs assoziiert (155). Obwohl sich die SIT mittlerweile als gängige Therapiemethode für Patienten mit allergischer Rhinitis oder Konjunktivitis, sowie bei Patienten mit Wespen- oder Bienengiftallergie etabliert hat, beinhaltet sie einige Nachteile. Nachteilig beispielsweise ist ihre jahrelange Anwendungsdauer. Im schlimmsten Falle kann es auch zu einer Verstärkung der bestehenden Allergie kommen. Alternative Behandlungsmöglichkeiten, die auf der Aktivierung von Tregs

basieren, sind daher von großer Bedeutung für innovative Therapieansätze und sind Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Anhand humanisierter Mausmodelle, die durch Übertragung humaner Zellen in immundefiziente Mausstämme entwickelt werden, können krankheitsrelevante Mechanismen untersucht und potentielle Wirkstoffe geprüft werden. Humanisierte Modelle haben sich unter anderem für die Untersuchung allergen-induzierter Erkrankungen bewährt. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit den PBMCs asthmatischer Patienten rekonstituiert wurden, nach allergener Stimulation eine allergische Atemwegsentzündung korreliert mit humaner IgE-Produktion, humaner Th2-Zytokinsekretion, AHR und Inflammation in der Lunge entwickeln (150,156-158). Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Etablierung eines humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegserkrankung und die anschließende Nutzung des evaluierten Systems für die Analyse des aktivierenden Potentials des Proteins gp120 auf humane Tregs.

4.1 Evaluation eines humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung in immundefizienten NOD-Scid und NOD-Scid γ c Mäusen

Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Experimente wurden zunächst im NOD-Scid Mausstamm und dann im NOD-Scid γ c Stamm durchgeführt.

Zu Beginn standen für die Evaluation des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung NOD-Scid Mäuse zur Verfügung. Dieser Mausstamm weist zusätzlich zur T- und B-Zelldefizienz eine eingeschränkte angeborene Immunität mit herabgesetzter NK-Zellaktivität, Makrophagendysfunktion und reduzierter Komplementaktivierung auf (145). Als Transfermethode für die Übertragung der humanen PBMCs in die Maus wurde die intraperitoneale Injektion gewählt, die sich im Vergleich zur intravenösen Route in der Vergangenheit bereits als effizientere Methode erwies. Es konnte gezeigt werden, dass der intravenöse Transfer der humanen Zellen in immundefiziente Mausstämme zu einer raschen Elimination der Zellen im Lungengewebe der Mäuse führt (159). Anfängliche Experimente, in denen intraperitonealer und intravenöser Transfer der humanen

Zellen verglichen wurden, bestätigten diese Resultate. Die themenbezogene Literaturrecherche ergab eine für die Humanisierung der SCID-Mäuse notwendige Zellzahl humaner PBMCs im Bereich von $5-9 \times 10^7$, die Zahl der zu transferierenden humanen PBMCs wurde dementsprechend auf 80×10^6 festgelegt (149,160,161).

Im Vergleich zum NOD-Scid Stamm weist der NOD-Scid γc Stamm durch die Mutation des Gens für die γ Kette des IL-2 Rezeptors zusätzliche Beeinträchtigungen in angeborener und adaptiver Immunität auf. In diesem Stamm kommt es zu einem vollkommenen Verlust von NK-Zellaktivität (147,162). Die IL-2-Rezeptor γ Kette ist auch an der Signalweiterleitung der hoch-affinen Rezeptoren IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 beteiligt (146). Die im Vergleich zum NOD-Scid Stamm vollkommen minimierte NK-Zellaktivität ermöglicht ein verbessertes Überleben von humanen Zellen in den Mäusen, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem NOD-Scid Stamm ist, dass die für die Mäuse dieses Stammes typische Lymphom-Entwicklung ausbleibt. NOD-Scid Mäuse haben eine durchschnittliche Lebensrate von 8,5 Monaten und unterliegen häufig thymischer Lymphom-Bildung (145). Die Ausprägung der Lymphome scheint dabei von der Signalübertragung, an der die IL-2 Rezeptor γ Kette beteiligt ist, abhängig zu sein (163). Es wurde nachgewiesen, dass die thymischen Lymphome zu deren Entwicklung NOD-Scid und weitere immundefiziente Mäuse neigen, aus Thymozyten bestehen, die Rezeptoren für IL-2 und IL-7 exprimieren, was darauf hindeutet, dass die Signalweiterleitung über diese Rezeptoren eine Rolle für die Lymphom-Entwicklung spielen könnte (163).

Ein weiteres Problem, das gehäuft im NOD-Scid Stamm vorkommt ist die spontane Entwicklung von B- und T-Zellen. Dieses Phänomen wird als „Leakiness“ bezeichnet. Katano und Mitarbeiter verglichen das Auftreten von B und T Zell-Leakiness in NOD-Scid und NOD-Scid γc Mäusen (164). Während in NOD-Scid Mäusen geringe Ig-Konzentrationen und T-Zellen detektierbar waren, konnten in NOD-Scid γc Mäusen keine Ig-Level oder murine Lymphozyten aufgefunden werden (164).

Aufgrund der vorteilhaften Aspekte wurde das zu Beginn im NOD-Scid Stamm etablierte humanisierte Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung auf NOD-Scid γc Mäuse übertragen. Der Transfer von 80×10^6 PBMCs in NOD-Scid γc Mäuse mündete in der Entwicklung einer Transplantat-Abstoßungsreaktion / GvH-Reaktion

(Abbildung 15, 16), die vermutlich durch das effizientere Anwachsen der humanen Zellen aufgrund der fehlenden NK-Zellaktivität auftrat. Folgende Titrationsexperimente, in denen abnehmende Zellzahlen humaner PBMCs gesunder Spender in NOD-Scid γc übertragen wurden, zeigten, dass nach Transfer von 5×10^6 PBMCs keine GvH-Symptomatik mehr vorzufinden war (Abbildung 16). Die Ergebnisse wurden durch die Analyse der ALT-Spiegel in den humanisierten NOD-Scid γc untermauert. Ein Konzentrationsanstieg des Leberenzym Alaninaminotransferase (ALT) ist ein Charakteristikum einer GvH-Reaktion (165). Die ALT-Konzentration im Serum von NOD-Scid γc Mäusen, die mit 5×10^6 humanen PBMCs humanisiert wurden, waren mit denen unbehandelter Tiere vergleichbar (Abbildung 17). Die Transferzahl für diesen Stamm wurde somit auf 5 Millionen PBMCs festgelegt.

4.2 NOD-Scid Mäuse und NOD-Scid γc , die mit PBMCs atopischer Spender transferiert wurden entwickeln eine allergische Atemwegsentzündung nach intranasaler Provokation der Atemwege

Für die Rekonstitution der Mäuse wurden asthmatische Patienten mit einer hochgradigen Sensibilisierung gegen das Birkenallergen ausgewählt. Als Kontrolle wurden Mäuse mit PBMCs gesunder Spender injiziert. Der Transfer atopischer PBMCs mündete in einer Steigerung des Atemwegswiderstandes, dementsprechend war die Atemwegselastizität vermindert (Abbildung 6, 18). Nach Transfer nicht-atopischer PBMCs hingegen blieb in beiden Mausstämmen eine Verschlechterung der Lungenfunktion aus (Abbildung 7, 18). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von Duez und Mitarbeitern, die nach Rekonstitution von SCID-Mäusen mit PBMCs von Hausstaubmilbenallergikern und anschließender Allergenprovokation einen gesteigerten Atemwegswiderstand detektierten, wobei nach Transfer gesunder PBMCs und folgender Allergenprovokation keine AHR aufgedeckt werden konnte (166). Tournoy und Kollegen zeigten, dass die allergen-induzierte AHR in einem humanisierten Mausmodell des Asthmas abhängig ist von humanem IL-4 und IL-5 (158). Antikörper gegen die humanen Zytokine führten zur Aufhebung der AHR. Es besteht eine Kreuzreaktivität zwischen humanem und murinem IL-5. Es wurde

nachgewiesen, dass humanes IL-5 an den murinen IL-5-Rezeptor binden kann (167), was zur Entstehung der AHR durch humane Th2-Zellen in dem humanisierten Mausmodell beitragen könnte.

Die intranasale Behandlung mit dem Allergen zeigte sich für die Ausbildung der AHR essentiell. Wurde die nasale Provokation anstatt mit Birkenallergen mit PBS durchgeführt, blieb die Entwicklung einer AHR aus (Abbildung 22A). Weiterhin kam es in Abhängigkeit zur nasalen Provokation mit dem Allergen zu einer Erhöhung der Zellzahlen in der BAL (Abbildung 22B). Die Analyse der humanen CD45⁺ Zellen in den Lungen der NOD-Scid Tiere belegte eindeutig eine Notwendigkeit der nasalen Provokation der Atemwege mit Allergen für ein erhöhtes Einwandern der humanen Zellen in die Mauslunge (Abbildung 22C). Duez und Mitarbeiter evaluierten in diesem Zusammenhang eine präferierte Migration CD4⁺ Gedächtnis- sowie aktivierter humaner Zellen in die Lungen humanisierter Scid Mäuse nach Allergenprovokation (168). Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation resultierte nach ausbleibender Allergenprovokation eine herabgesetzte Migration der humanen Zellen in der Maus (168). Die Wissenschaftler konnten weiterhin eine erhöhte Expression der α -Kette des Integrins LFA-1, CD11a, der in die Lungen migrierten humanen Zellen nachweisen, was auf eine Interaktion zwischen humanem LFA-1 und dem murinen Molekül ICAM-1 hindeutet (168).

Die Ergebnisse sprechen für die Nutzung des etablierten Modells für die Untersuchung allergen-induzierter Reaktionen in der Lunge. Die Tatsache, dass eine Atemwegsentzündung nach Injektion gesunder PBMCs trotz der Zugabe des Allergens und IL-4 ausblieb, unterstreicht die Notwendigkeit voraktivierter allergenspezifischer T-Zellen für die nach nasaler Provokation aufkommende Inflammation.

4.3 Die Gabe von humanem IL-4 in Kombination mit Birkenallergen verursacht eine starke pulmonale Entzündung nach Transfer atopischer PBMCs

Einige Faktoren, beispielsweise Erythropoietin (Epo), Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Stammzellfaktor (SCF) weisen eine Kreuzreaktivität zwischen Mensch und Maus auf und können somit das Überdauern

der humanen Zellen in der Maus begünstigen (169). Andere Faktoren wie GM-CSF und IL-3 hingegen können nur speziesspezifisch Zellwachstum fördern (169). Die zusätzliche Gabe von Zusätzen wie beispielsweise humanen Zytokinen kann daher die humanen Zellen in den Mäusen stimulieren. Spiegelberg beschrieb, dass IL-4 die allergische Inflammation in einem humanisierten Mausmodell begünstigen kann, indem es den Isotypenwechsel zu IgE in humanen B-Zellen hervorruft (170). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humane PBMCs atopischer Spender IgE in Scid-Mäusen in Abhängigkeit von IL-4 sezernieren und eine Vorbehandlung der humanen Zellen mit exogenem IL-4 die IgE-Produktion in den Mäusen um das 10- bis 100fache steigern kann (170). IL-4 hat jedoch nicht nur Einfluss auf B-Zellen. Vielmehr agiert es als potenter Wachstumsfaktor und sichert Wachstum und Überlebensfähigkeit sowohl von B- als auch von T-Zellen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass IL-4 die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen dirigieren kann (171,172). Aufgrund der beschriebenen Th2-fördernden Wirkung des rekombinanten IL-4 wurde dieses gruppenweise mit den humanen PBMCs in die NOD-Scid (γ c) Mäuse transferiert. Die alleinige Zugabe von IL-4 führte in beiden Mausstämmen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren bereits zu einer moderaten Steigerung des Atemwegswiderstandes (Abbildung 6, 18A+B). Nach Transfer von rekombinantem humanen IL-4 und Allergen zusammen mit den atopischen PBMCs zeigte sich im Vergleich zu allen übrigen PBMC-rekonstituierten Tieren eine deutlich gesteigerte AHR. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass IL-4 die Effektorfunktionen birkenspezifischer T-Zellen in Kombination mit dem Allergen sehr effizient steigerte. Nach Transfer gesunder PBMCs zusammen mit Allergen und IL-4 blieben vergleichbare Effekte aus (Abbildung 7, 18C+D).

Die Analyse der Zellen in der BAL untermauerte die aus der Lungenfunktion gewonnenen Resultate. Nach Transfer der atopischen PBMCs zusammen mit Birke und IL-4 waren verstärkt Zellen im bronchoalveolären Raum vorzufinden, hauptsächlich murine Makrophagen (Abbildung 8, 19). Ein Charakteristikum des allergischen Asthmas ist der gesteigerte Einstrom von eosinophilen Granulozyten in das Lungenlumen. Eine Eosinophilie in Lunge und Atemwegen ist sowohl in murinen Modellen des allergischen Asthmas als auch in Asthmapatienten vorzufinden (173,174). Die Tatsache, dass in dem etablierten Modell jedoch nur sehr schwache Frequenzen Eosinophiler detektiert werden konnte stimmt mit weiteren Publikationen überein, die belegen, dass diese Zellen für die Entwicklung einer AHR und

Atemwegsinflammation in diesem Model nicht unbedingt erforderlich sind (158,175). Eine geringe Anzahl eosinophiler Granulozyten war dennoch nach Gabe allergischer PBMCs in die immundefizienten Mäuse vorzufinden (Abbildung 9, 19). Nach Transfer der PBMCs ohne Zusatz oder zusammen mit Birke oder IL-4 kam es zu keiner Steigerung der Eosinophilenfrequenz. Die Injektion der PBMCs und Behandlung mit Birke und IL-4 steigerte die Eosinophilenzahl um das 5,5 fache im NOD-Scid (Abbildung 9) und das 2,3 fache im NOD-Scid γc Stamm (Abbildung 19), was für eine ausgeprägte Entwicklung der Atemwegsinflammation in diesem Ansatz spricht. Übereinstimmend mit dem Resultat des erhöhten Neutrophileninflux in dem evaluierten Modell (Abbildung 9, 19) konnte in einigen Studien eine erhöhte Anzahl aktivierter neutrophiler Granulozyten in Asthmapatienten nachgewiesen werden (176-178). Weitere Publikationen unterstreichen die Rolle neutrophiler Granulozyten als wichtige Regulatoren des Asthmas, beispielsweise bei der Migration und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten an den Entzündungsort (179,180). Nach Transfer gesunder PBMCs zusammen mit Allergen und IL-4 waren keine gesteigerten Frequenzen Eosinophiler oder Neutrophiler vorzufinden, was für eine Rolle aktivierter Effektorzellen atopischer Spender bei der Rekrutierung der murinen Granulozyten spricht.

4.4 Das evaluierte Modell ist von humanen T-Zellen abhängig

Die aus den Blutspendern isolierten PBMCs beinhalteten neben T- und B-Zellen auch Monozyten und NK-Zellen (Abbildung 5). 3 Wochen nach Transfer der humanen PBMCs in die Mäuse waren in beiden verwendeten Stämmen keine humanen Monozyten oder NK-Zellen mehr detektierbar. Bei den humanen CD45⁺ Zellen in Lunge, Milz und Blut der Tiere handelte es sich überwiegend um CD3⁺ T-Zellen. Lediglich in den Milzen beider Mausstämmen war eine sehr geringe Frequenz humaner B-Zellen detektierbar. Diese lag unter 1%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Christianson und Hesselton, die 4 Wochen nach Transfer humaner PBMCs in NOD-Scid Mäuse ebenfalls hauptsächlich humane T-Zellen aus den Mäusen isolieren konnten (181,182). Eine weitere Übereinstimmung mit den erwähnten Publikationen findet sich im Vergleich der humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den NOD-Scid Mäusen. Die Autoren beschrieben eine erhöhte Anzahl humaner CD8⁺ Zellen im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen (181,182). Die

FACS-Analyse der humanen Zellen in den Lungen von NOD-Scid Tieren (Abbildung 11) ergab auch in dem hier etablierten Modell ein gesteigertes Vorkommen CD8⁺ T-Zellen. In der Milz war tendenziell der gleiche Effekt zu beobachten (Abbildung 13).

Weiterhin war im NOD-Scid Stamm nach Übertragung der humanen PBMCs mit Birke und IL-4 im Vergleich zu allen übrigen Gruppen eine deutliche Steigerung der Rate humaner Zellen nachweisbar (Abbildung 11, 12, 13). Während der Prozentsatz humaner Zellen in den NOD-Scid Mäusen 24 Tage nach Transfer von 80×10^6 PBMCs, PBMCs und IL-4 oder PBMCs und Birke zwischen 10 und 15% lag, waren nach Injektion der PBMCs mit Birke und IL-4 bis zu 30% humane Zellen in den Lungen der Mäuse vorzufinden (Abbildung 11). Dementsprechend kam es bei Betrachtung der absoluten Zellzahl humaner Zellen in den Lungen der humanisierten Mäuse zu einem 7,5fachen Anstieg der humanen CD45⁺ Zellen nach Gabe atopischer PBMCs zusammen mit IL-4 und Allergen.

Die im NOD-Scid Stamm detektierte deutlich erhöhte Frequenz der humanen Zellen nach Transfer der atopischen PBMCs mit Birke und IL-4 konnte vergleichsweise im NOD-Scid γ c Stamm nicht evaluiert werden. Obwohl auch in diesem Stamm der Transfer der PBMCs allergischer Spender zusammen mit Birke und IL-4 im Vergleich zu den übrigen Gruppen zu einer ausgeprägten Atemwegsinflammation, gekennzeichnet durch eine hohe AHR (Abbildung 18A) und einem Anstieg der Zellen in der BAL der Tiere (Abbildung 19) führte, waren die Frequenzen der humanen Zellen in den NOD-Scid γ c Mäusen in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 20). Nach Rekonstitution der NOD-Scid γ c mit 5×10^6 PBMCs isoliert aus Birkenallergikern befanden sich an Tag 24 nach Rekonstitution und intranasaler Provokation in den Lungen der Mäuse zwischen 40 und 50% humane Zellen (Abbildung 20B). Der Prozentsatz humaner Zellen im NOD-Scid γ c Stamm war somit im Vergleich zum NOD-Scid Stamm deutlich erhöht, trotz des Transfers einer wesentlich geringeren Zahl humaner PBMCs in diesen Stamm. Ein verbessertes Überdauern humaner Zellen in NOD-Scid Mäusen mit zusätzlicher Mutation der IL-2 Rezeptor γ Kette wurde bereits mehrfach beschrieben (163,183) und steht im Einklang mit den in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Ergebnissen. Eine gewisse Variabilität bezüglich der Frequenzen der humanen CD45⁺ Zellen in den Mäusen, die mit Zellen des gleichen Spenders oder auch unterschiedlicher Spender transferiert wurden, blieb dabei in beiden Mausstämmen erhalten (183).

Das in den NOD-Scid Mäusen detektierte verstärkte Vorkommen humaner CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ Zellen war in den NOD-Scid γ c Mäusen weniger stark ausgeprägt (Abbildung 20B). Weiterhin auffällig war im NOD-Scid γ c Stamm, dass ein Transfer der humanen PBMCs mit Allergen und IL-4 zu einer Umkehrung des CD4:CD8 Verhältnisses führte. Im Gegensatz zu allen übrigen Gruppen waren nach Transfer von Birke und IL-4 humane CD4⁺ T-Zellen verstärkt vorzufinden.

Diese Resultate untermauern die effiziente Förderung der Th2-vermittelten, allergen-induzierten Atemwegsentzündung insbesondere nach einem Transfer der humanen Zellen mit Birke und IL-4 und deuten auf eine effiziente Förderung der birkenspezifischen Th2-Zellen in diesem Ansatz hin.

4.5 Humane CD4⁺ T-Zellen sind für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung verantwortlich

Um die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung in dem etablierten Modell weiter zu untersuchen, wurden Depletionsexperimente durchgeführt, in denen vor Transfer in die Mäuse jeweils CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aus der PBMC-Suspension eliminiert wurden (Abbildung 23). Die aus den Experimenten gewonnenen Resultate belegten eindeutig die Abhängigkeit der etablierten allergischen Atemwegsentzündung von humanen CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 24). AHR und inflammatorische Infiltrate waren nur dann in den humanisierten Mäusen vorzufinden, wenn CD4⁺ T-Zellen nicht aus der transferierten humanen Zellsuspension depletiert wurden. An der Pathogenese des allergischen Asthmas sind viele Zellen beteiligt, dennoch spielen Th2-Zellen bei der Induktion von Becherzellmetaplasie, Atemwegsumbildung und AHR eine zentrale Rolle (184). Humane CD4⁺ T-Zellen als Vermittler allergischer Reaktionen wurden bereits mehrfach in humanisierten Mausmodellen erforscht. Tsumori und Kollegen detektierten in Scid-Mäusen eine Migration humaner T-Zellen in transplantiertes humanes Bronchialgewebe. Wurden die PBMCs aus atopischen Spendern isoliert, zeigten die migrierten T-Zellen eine gesteigerte Expression der Zytokine IL-4 und IL-5, was auf die Initiierung einer Th2-gerichteten Immunantwort hindeutet (161). Perros und Kollegen bewirkten durch Blockade des CCR4-Rezeptors, der typischerweise auf humanen Th2-Zellen exprimiert wird, eine Aufhebung der allergen-induzierten

Atemwegsinflammation in mit atopischen PBMCs transferierten NOD-Scid Tieren (185). In einem weiteren humanisierten PBMC-Modell der allergischen Atemwegsentzündung wurde die Rolle von DCs als wesentliche Initiatoren der Th2-vermittelten Inflammation ergründet (186). Dabei kam es nach trachealer Applikation von DCs in die Tracheen von Scid-Mäusen, die zuvor mit PBMCs atopischer Spender rekonstituiert wurden, zu einer verstärkten Proliferation von humanen T-Zellen, die IL-4 produzierten. Waren die Mäuse mit PBMCs gesunder Spender humanisiert worden, resultierte eine verstärkte IFN- γ Produktion (186). Die hier beschriebene Studie betont wiederholt die wichtige Rolle von Th2-Zellen im allergischen Asthma. Der Transfer voraktivierter T-Zellen atopischer Spender mit Sensibilisierung gegen das Birkenallergen und die weitere Provokation mit Allergen verursachte T-Zell-abhängig AHR und Inflammation.

Um die Immunantwort in dem etablierten Modell näher zu untersuchen wurden die CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen humanisierter NOD-Scid γ c Mäuse nach 24 Tagen mit syngenen DCs kultiviert (Abbildung 21). Im Vergleich zu allen übrigen Gruppen zeigte sich eine verstärkte Proliferation der T-Zellen nach Transfer atopischer PBMCs mit Birke und IL-4 in dem Restimulationsansatz mit Birkenallergen-beladenen DCs. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls die zuvor bereits evaluierte These der effizienten Stimulation birkenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in den Mäusen, die unter Zusatz von Birke und IL-4 rekonstituiert wurden. Nach Isolation aus den Mäusen und erneuter DC-vermittelter Stimulation mit Allergen resultierten hier im Vergleich zu allen weiteren Gruppen die höchsten Proliferationsraten. Die erhöhte Konzentration an humanem IL-13, die in den Überständen des Restimulationsansatzes gemessen werden konnte, spricht weiterhin für die Entstehung einer Th2-gerichteten Immunantwort.

Die zentrale Rolle CD4⁺ T-Zellen für das etablierte humanisierte Modell eröffnet die Möglichkeit der vorklinischen Prüfung neuer CD4-basierter therapeutischer Strategien für allergische Atemwegserkrankungen.

4.6 Die aus der Behandlung mit gp120 resultierende Reduktion der allergischen Atemwegsinfammation ist auf die Aktivierung von Tregs zurückzuführen

Tregs besitzen das Potential, der Entwicklung einer AHR und allergischer Infammation entgegenzuwirken. Die Entstehung allergischer Erkrankungen wurde bereits häufiger auf eine Dysfunktion von Tregs zurückgeführt. Im Gegensatz zu gesunden Individuen weisen Tregs atopischer Patienten während der Pollensaison eine verminderte Fähigkeit auf, die allergen-induzierte Produktion von Th2-Zytokinen zu supprimieren (187). Dieser Befund stimmt mit der Hypothese überein, dass Asthma durch eine Treg-Defizienz verursacht wird, welche die Entwicklung von Th2-Zellen begünstigt (114). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass trotz ähnlicher Frequenzen CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen im peripheren Blut allergischer Patienten und gesunder Kontrollen, die Expression des Foxp3-Proteins in Asthmapatienten herabgesetzt ist (188). Dementsprechend wurden geringere Frequenzen sowie die funktionelle Beeinträchtigung von Foxp3⁺ Zellen aus der Lungenlavarge asthmatischer Kinder nachgewiesen (113).

Derzeitige Behandlungsansätze für die Therapie des allergischen Asthmas mit Tregs befassen sich mit dem adoptiven Transfer von *ex vivo* generierten Tregs oder mit der Induktion und Modulation von Tregs (189). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass aus dem adoptiven Transfer antigen-spezifischer Tregs auch bei einer bereits etablierten allergischen Entzündung kurative Effekte resultieren (109,110,190-192). Des Weiteren ist die Induktion von Tregs vermutlich für die Effekte der spezifischen Immuntherapie verantwortlich (112,193). Ziel dieser Dissertation war die Prüfung einer alternativen Treg-Aktivierung über den Korezeptor CD4. Es wurden bereits verschiedene Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression identifiziert, unter anderem der durch sogenannte „gap junctions“ vermittelte Transfer von cAMP von Tregs auf Zielzellen (99). Für ihre Aktivierung benötigen Tregs die Signalweiterleitung über ihren T-Zellrezeptor oder ihren CD4-Korezeptor. Die Signalweiterleitung über CD4 ist von der Tyrosinkinase p56lck abhängig, welche die Phosphorylierung von Zap70, ähnlich der Phosphoylierung auf eine anti-CD3 Stimulation hin, induziert und somit die Aktivierung von Tregs fördert (98). Eine Behandlung humaner CD4⁺CD25⁺ Tregs mit anti-CD4 Antikörpern ist dabei für die Aktivierung ihrer suppressiven Funktion vollkommen ausreichend (98). Frühere Studien beschrieben kurative

Effekte bei der allergischen Atemwegsentzündung infolge des Einsatzes blockierender Antikörper gegen CD4 auf T-Zellen (194,195). Das HIV-1 Hüllprotein gp120, das mit hoher Affinität an humanes CD4 bindet (125), konnte bereits als potenter Aktivator humaner Tregs *in vivo* identifiziert werden (136). In diesem Modell inhibierte eine einzelne *in vivo* Applikation von gp120 die Entwicklung einer xenogenen GvH-Reaktion (136). Die gleichzeitige Gabe humaner PBMCs mit gp120 verhinderte die Expansion humaner T-Zellen in die murinen lymphoiden Gewebe (136). Im Einklang mit diesen Resultaten konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass eine der inhalativen Provokation vorgeschaltete, einmalige Behandlung humanisierter Mäuse mit gp120 AHR und Atemwegsinflammation reduziert (Abbildung 14, 25). Die Behandlung mit gp120 modifizierte hierbei die Inflammation innerhalb einer etablierten allergischen Atemwegserkrankung, die von atopischen Donoren und Allergen abhängig ist. Die Applikation von gp120 bewirkte in beiden Mausstämmen eine signifikante Reduktion von AHR, Entzündungszellen im bronchoalveolären Raum sowie einen herabgesetzten Influx humaner Zellen in die Lunge. Die anti-inflammatorischen Effekte wurden dabei durch die Tregs vermittelt, die innerhalb der humanen PBMCs in die Mäuse transferiert wurden. Wurden die Tregs vor dem Transfer aus der Zellsuspension depletiert (Abbildung 26), kam es zur Aufhebung des suppressiven Potentials des gp120 (Abbildung 27, 28). Dieses Resultat unterstreicht die ausschlaggebende Rolle von gp120 in der CD4-vermittelten Aktivierung von Tregs auch in dem hier etablierten humanisierten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung und untermauert das vorhergehende Ergebnis der CD4-abhängigen Aktivierung humaner Tregs im xenogenen GvH-Modell (136). Eine weitere Parallele zu dem xenogenen GvH-Modell (136) stellt der Befund dar, dass trotz des fast vollständigen Verlustes von Foxp3⁺ Zellen in der transferierten Zellpopulation nach CD25-Depletion keine Exazerbation der pulmonalen Entzündung in den Mäusen resultierte, was aufgrund der fehlenden regulatorischen Zellen in dem transferierten Zellgemisch theoretisch annehmbar gewesen wäre.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass NOD-Scid γ c Mäuse effizient für die Untersuchung allergischer Atemwegserkrankungen in einem humanisierten Mausmodell genutzt werden können. Das etablierte humanisierte Mausmodell erwies sich des Weiteren für die Testung eines innovativen Ansatzes zur Behandlung der allergischen Atemwegserkrankung als hilfreiches Medium. Mit Hilfe des Modells wurde gezeigt, dass die Aktivierung humaner Tregs durch gp120 die

Entwicklung einer allergen-induzierten Entzündungsreaktion in der Lunge inhibieren kann. Diese toleranzinduzierende Strategie repräsentiert einen vielversprechenden Ansatz in der Prävention von Allergie und Asthma. Die Daten bestätigen die Modulation von Tregs als einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung von Allergie und Asthma und empfehlen weiterhin das etablierte humanisierte Mausmodell als geeignetes Testsystem zur Untersuchung T-Zell-vermittelter allergischer Inflammation sowie neuer therapeutischer Strategien, die für humane Studien noch nicht zugelassen sind.

5. Zusammenfassung

Aus der zunehmenden Prävalenz allergischer Erkrankungen vor allem in den Industrienationen ergibt sich ein erhöhter Bedarf an Grundlagenforschung im Bereich von Allergie und Asthma sowie der Entwicklung innovativer Therapiestrategien. In der vorliegenden Dissertation wurden die immundefizienten Mausstämme NOD-Scid und NOD-Scid γc als vielversprechender translationaler Schritt zwischen dem reinen Tiermodell und der Erprobung neuer Therapieansätze an Probanden in klinischen Studien beleuchtet. Im experimentellen Verlauf der Arbeit wurde ein humanisiertes Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung zunächst in immundefizienten NOD-Scid und darauffolgend in NOD-Scid γc Mäusen etabliert. Diese Mausstämme zeichnen sich durch das Nichtvorhandensein von B- und T-Zellen aus. Im NOD-Scid γc Stamm resultiert aus einer zusätzlichen Mutation des Gens für die γ -Kette des IL-2 Rezeptors der Verlust muriner NK-Zellen, was die Immunität in diesem Stamm weiter herabsetzt und eine Humanisierung erleichtert.

Die Humanisierung der Mäuse erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von PBMCs, die unter Anwendung der Ficoll-Dichtezentrifugation aus dem Blut von Probanden isoliert wurden. Für die Gewinnung der PBMCs wurden zum einen Asthma-Patienten mit einer hochgradigen Sensibilisierung gegen Birkenpollen herangezogen. Zum anderen wurden in Kontrollexperimenten PBMCs nicht-allergischer Probanden verwendet. Während sich für den NOD-Scid Stamm 80×10^6 PBMCs als angemessene Transferzahl erwiesen, reichten für die Rekonstitution des NOD-Scid γc Stammes 5×10^6 PBMCs aus. Eine Analyse der Tiere erfolgte 24 Tage nach Injektion der humanen Zellen. Der Transfer der PBMCs allergischer Asthmatiker führte besonders nach additiver Applikation des Birkenallergens sowie des humanen rekombinanten Zytokins IL-4 und darauffolgender nasaler allergener Provokation zu einer starken pulmonalen Entzündung in den Mäusen.

Die nasale Allergenprovokation an den Tagen 20-22 nach PBMC-Transfer erwies sich für das Aufkommen der Inflammation als unbedingt erforderlich. Die nasale Provokation mit PBS mündete in einer herabgesetzten Inflammation ohne Ausprägung einer Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR), reduzierten Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie verminderten Frequenzen humaner Zellen in den Lungen von Versuchstieren, die mit atopischen PBMCs supplementiert mit

Birkenallergen und IL-4 rekonstituiert wurden. Die Allergenabhängigkeit des etablierten Modells wurde anhand von Experimenten untermauert, die verdeutlichten, dass ein Transfer von PBMCs nicht-allergischer Probanden trotz Zugabe des Allergens und humanem IL-4 keine Atemwegsinflammation auslöste.

Bei den humanen Zellen, die an Tag 24 nach Rekonstitution in den Mäusen detektiert werden konnten, handelte es sich hauptsächlich um T-Zellen. Innerhalb dieser CD3⁺ T-Zellen konnten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen differenziert werden. Depletionsexperimente, in denen nach Gewinnung der PBMCs aus dem Blut der Probanden verschiedene T-Zellsubpopulationen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) eliminiert wurden, führten zu dem Befund, dass die allergische Atemwegsentzündung in dem System von humanen CD4⁺ T-Zellen abhängig war.

Nach der Etablierung des humanisierten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung wurde das System zur Analyse des suppressionsfördernden Potentials des HIV-1 - Hüllproteins gp120 genutzt. Die Hypothese, dass gp120 durch sein Treg-aktivierendes Potential der Atemwegsinflammation entgegenwirken könnte, basierte auf einer 2009 veröffentlichten Arbeit, in der die von humanen Treg abhängigen anti-inflammatorischen Effekte des gp120 bereits nachgewiesen werden konnten (136).

Die Applikation von gp120 führte in dem etablierten Testsystem zu einer Reduktion der Atemwegsinflammation. Dies äußerte sich in einer Aufhebung der AHR, verminderten Zellzahlen in der BAL sowie dem reduzierten Einstrom humaner T-Zellen in die Lungen der rekonstituierten Tiere. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die anti-inflammatorische Wirkung des gp120 strikt von der Anwesenheit regulatorischer T-Zellen innerhalb der für die Humanisierung genutzten PBMCs abhängig war. Eine Depletion der Tregs vor Transfer in die Mäuse führte zum Verlust der anti-inflammatorischen Effekte des gp120. Diese Ergebnisse sprechen für die Modulation regulatorischer T-Zellen als hoffnungsvolle Maßnahme in der Behandlung allergischer Erkrankungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eröffnen innovative Ansätze zur Analyse neuer Therapiestrategien in einem Testsystem, dass die Erforschung humaner Zellinteraktionen sowie die Wirkung potentieller Arzneistoffe auf humane Zellen unter *in vivo* Bedingungen erlaubt.

6. Abstract

Allergic diseases like asthma have an increasing prevalence and require the development of new therapeutic strategies. Animal models of allergic inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) have significantly improved our understanding of the underlying pathophysiological mechanisms of allergic airway disease. However, using murine systems as preclinical models for new biological treatment approaches like monoclonal antibodies is problematic, due to species-specific differences regarding the structure of the target molecules. Therefore, humanized mouse models have been developed to study human immune cell function *in vivo* and to test new therapeutic strategies not readily approachable through animal or human studies. Here we elucidated the immunodeficient mouse strains NOD-Scid and NOD-Scid γc to investigate allergic airway diseases. Initially we evaluated a model of allergic airway disease in immunodeficient NOD-Scid mice. Furthermore we used NOD-Scid γc mice that have in addition to the lack of T- and B-cells a deficiency in NK-cells based on a mutation of the IL-2 receptor γc . This mutation improved the engraftment of the mice with human PBMCs.

PBMCs were obtained from donors allergic to birch pollen or from healthy donors by Ficoll density centrifugation and were injected intraperitoneally into NOD-Scid mice or NOD-Scid γc respectively. On days 20-22 airways were provoked intranasally with allergen. On day 24 airway responsiveness and inflammation were analysed. Humanization of the NOD-Scid strain required transfer of 80×10^6 PBMCs, whereas in NOD-Scid γc mice 5×10^6 PBMCs were sufficient for engraftment. In both strains PBMCs from allergic donors but not from healthy donors induced airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Particularly the additional application of allergen and human IL-4 leads to a strong pulmonary inflammation after transfer of PBMCs from allergic patients.

The intranasal provocation with allergen on days 20-22 after reconstitution with human PBMCs was mandatory for the outcome of the allergic inflammation. Mice that were intranasally treated with PBS failed to develop an airway inflammation. Animals did not develop AHR, had reduced numbers of cells in the bronchoalveolar lavage and diminished frequencies of human cells in the lung. The allergen-dependency of the established model was further confirmed by experiments showing that transfer of

non-allergic PBMCs did not increase airway inflammation albeit human cells were injected together with allergen and IL-4.

The human cells that were detectable after 24 days of engraftment were mainly T-cells. Within this CD3⁺ T-cell fraction CD4⁺ and CD8⁺ could be differentiated. Experiments in which T-cell subpopulations (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) were depleted from PBMCs prior to transfer into the mice demonstrated that the occurring airway inflammation in the system was dependent on human CD4⁺ T-cells.

After the establishment of the humanized mouse model of allergic airway disease we used the model to analyze the suppressive capacity of the HIV-1 envelope protein gp120. Previously it was demonstrated that stimulation of the CD4 molecule on human regulatory T-cells (Tregs) activates their suppressive activity *in vitro* and *in vivo* (136).

In this work we sought to determine the effect of CD4-mediated Treg-activation on pulmonary inflammation in a humanized mouse model of allergic airway inflammation. For Treg-activation, mice were treated with the CD4-binding, Ick-activating recombinant HIV-1 surface protein gp120 after sensitization prior to allergen challenge. Control experiments with CD25-depleted PBMCs were performed to evaluate the role of Tregs. Treatment with gp120 prior to allergen challenge abrogated airway hyperresponsiveness and reduced the inflammatory immune response. In contrast, treatment had no effect on inflammation and airway hyperresponsiveness in mice that received CD25-depleted PBMCs, demonstrating Treg cell dependency of disease prevention.

These results show that allergic airway inflammation can be prevented by stimulation of human Tregs by CD4. The findings further suggest a clinical potential of Treg-activation by high-affinity CD4.

7. Literaturverzeichnis

1. Flajnik, M. F., and M. Kasahara. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11:47.
2. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783.
3. Bosch, T. C., R. Augustin, F. nton-Erxleben, S. Fraune, G. Hemmrich, H. Zill, P. Rosenstiel, G. Jacobs, S. Schreiber, M. Leippe, M. Stanisak, J. Grotzinger, S. Jung, R. Podschun, J. Bartels, J. Harder, and J. M. Schroder. 2009. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. *Dev. Comp Immunol.* 33:559.
4. Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:1-13.
5. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216. Epub;2001 Oct 4.:197.
6. Palaniyar, N. 2010. Antibody equivalent molecules of the innate immune system: parallels between innate and adaptive immune proteins. *Innate. Immun.* 16:131.
7. Turvey, S. E., and D. H. Broide. 2010. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:24.
8. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135.
9. Kushwah, R., and J. Hu. 2011. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.*133:409.
10. Flores-Romo, L. 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology.* 102:255.
11. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245.
12. Suzuki, T., C. W. Chow, and G. P. Downey. 2008. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1348.
13. Pollard, J. W. 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9:259.
14. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 311:83.

15. Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, A. B. Kay, and M. E. Rothenberg. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy*. 38:709.
16. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173.
17. Moraes, T. J., J. H. Zurawska, and G. P. Downey. 2006. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 13:21.
18. Wright, H. L., R. J. Moots, R. C. Bucknall, and S. W. Edwards. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 49:1618.
19. Sullivan, B. M., and R. M. Locksley. 2009. Basophils: a nonredundant contributor to host immunity. *Immunity*. 30:12.
20. Yamaguchi, M., R. Koketsu, M. Suzukawa, A. Kawakami, and M. Ikura. 2009. Human basophils and cytokines/chemokines. *Allergol. Int.* 58:1.
21. Suzukawa, M., M. Ikura, R. Koketsu, H. Nagase, C. Tamura, A. Komiya, S. Nakae, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto, and M. Yamaguchi. 2008. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J. Immunol.* 181:5981.
22. Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimbaldston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23:749.
23. Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*. 381:77.
24. Reuter, S., and C. Taube. 2008. Mast cells and the development of allergic airway disease. *J. Occup. Med. Toxicol.* 3 Suppl 1:S2.
25. Chiesa, S., E. Tomasello, E. Vivier, and F. Vely. 2005. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol. Immunol.* 42:477.
26. Kärre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 319:675.
27. Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. gli-Esposti, and Y. Hayakawa. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42:501.
28. Sato, K., S. Hida, H. Takayanagi, T. Yokochi, N. Kayagaki, K. Takeda, H. Yagita, K. Okumura, N. Tanaka, T. Taniguchi, and K. Ogasawara. 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* 31:3138.
29. Stetson, D. B., M. Mohrs, R. L. Reinhardt, J. L. Baron, Z. E. Wang, L. Gapin, M. Kronenberg, and R. M. Locksley. 2003. Constitutive cytokine mRNAs mark

- natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J. Exp. Med.* 198:1069.
30. Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and M. S. Schlissel. 1992. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 10:359.
 31. Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell.* 71:1065.
 32. Romagnani, S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel. Dis.* 5:285.
 33. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123.
 34. Angkasekwinai, P., S. H. Chang, M. Thapa, H. Watarai, and C. Dong. 2010. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat. Immunol.* 11:250.
 35. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, S. J. van, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9:1341.
 36. Chung, Y., X. Yang, S. H. Chang, L. Ma, Q. Tian, and C. Dong. 2006. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res.* 16:902.
 37. Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 445:648.
 38. Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J. K. Lennerz, J. M. Doherty, J. C. Mills, and M. Colonna. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature.* 457:722.
 39. Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10:857.
 40. Schroeder, H. W., Jr., and L. Cavacini. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:41.
 41. Arnold, J. N., R. A. Dwek, P. M. Rudd, and R. B. Sim. 2006. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol. Lett.* 106:103.
 42. Milne, C. D., and C. J. Paige. 2006. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* 18:20.
 43. Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:3.

-
44. de Vries, J. E., J. Punnonen, B. G. Cocks, and G. Aversa. 1993. The role of T/B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis. *Semin. Immunol.* 5:431.
 45. Tangye, S. G., A. Ferguson, D. T. Avery, C. S. Ma, and P. D. Hodgkin. 2002. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J. Immunol.* 169:4298.
 46. 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet.* 351:1225.
 47. Holgate, S. T. 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature.* 402:B2-4.
 48. Kim, H. Y., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 11:577.
 49. Lotvall, J., C. A. Akdis, L. B. Bacharier, L. Bjermer, T. B. Casale, A. Custovic, R. F. Lemanske, Jr., A. J. Wardlaw, S. E. Wenzel, and P. A. Greenberger. 2011. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127:355.
 50. Anderson, G. P. 2002. The immunobiology of early asthma. *Med. J. Aust.* 177 Suppl:S47.
 51. Van, O. L., E. Wambre, B. Maillere, H. E. von, A. Louise, A. M. Balazuc, B. Bohle, D. Ebo, C. Leboulaire, G. Garcia, and P. Moingeon. 2008. Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J. Immunol.* 180:4514.
 52. 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.
 53. Choy, D. F., B. Modrek, A. R. Abbas, S. Kummerfeld, H. F. Clark, L. C. Wu, G. Fedorowicz, Z. Modrusan, J. V. Fahy, P. G. Woodruff, and J. R. Arron. 2011. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J. Immunol.* 186:1861.
 54. Cookson, W. 2002. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol. Rev.* 190:195.
 55. Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R. H. DeKruyff. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* 3:715.
 56. Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and M. E. von. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* 358:1129.
 57. Vance, G. H., and J. A. Holloway. 2002. Early life exposure to dietary and inhalant allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.* 13 Suppl 15:14.

58. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787.
59. Coffman, R. L., B. W. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Cherwinski, H. F. Savelkoul, F. D. Finkelman, M. W. Bond. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102:5.
60. Iwamoto, I., H. Nakajima, H. Endo, and S. Yoshida. 1993. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 177:573.
61. Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, and R. van Ree. 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 19;296:490.
62. Busse, W. W., R. F. Lemanske, Jr., and J. E. Gern. 2010. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 376:826.
63. Randolph, D. A., C. J. Carruthers, S. J. Szabo, K. M. Murphy, and D. D. Chaplin. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* 162:2375.
64. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 103:175.
65. Dehzad, N., T. Bopp, S. Reuter, M. Klein, H. Martin, A. Ulges, M. Stassen, H. Schild, R. Buhl, E. Schmitt, and C. Taube. 2011. Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *J. Immunol.* 186:2238.
66. Herrick, C. A., and K. Bottomly. 2003. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 3:405.
67. McGuirk, P., and K. H. Mills. 2002. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 23:450.
68. Read, S., and F. Powrie. 2001. CD4(+) regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13:644.
69. Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389.
70. Lloyd, C. M., and E. M. Hessel. 2010. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10:838.
71. Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* 344:350.
72. Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 31:412.

73. Hongjia, L., G. Qingling, L. Meiyong, W. Weixuan, Z. Lihong, G. Yongsheng, L. Yanli, W. Jinxiang, and D. Liang. 2010. House dust mite regulate the lung inflammation of asthmatic mice through TLR4 pathway in airway epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 28:597.
74. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:331.
75. Larche, M., D. S. Robinson, and A. B. Kay. 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:450.
76. Afshar, R., B. D. Medoff, and A. D. Luster. 2008. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin. Exp. Allergy.* 38:1847.
77. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133:775.
78. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151.
79. Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Najj, and A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2:301.
80. Picca, C. C., J. Larkin, III, A. Boesteanu, M. A. Lerman, A. L. Rankin, and A. J. Caton. 2006. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* 212:74.
81. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 212:28.
82. Bopp, T., H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Ann. Med.* 39:322.
83. Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389.
84. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193:1285.
85. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182:18.
86. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057.

-
87. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and G. B. Fazekas de St. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203:1693.
 88. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi. 2006. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int. Immunol.* 18:991.
 89. 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.
 90. 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.
 91. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22:329.
 92. Bacchetta, R., E. Gambineri, and M. G. Roncarolo. 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:227.
 93. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20.
 94. Shevach, E. M., and G. L. Stephens. 2006. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat. Rev. Immunol.* 6:613.
 95. Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood.* 105:1162.
 96. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* 196:255.
 97. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183.
 98. Becker, C., J. Kubach, J. Wijdenes, J. Knop, and H. Jonuleit. 2007. CD4-mediated functional activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 37:1217.
 99. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204:1303.

100. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 7:83.
101. Walunas, T. L., and J. A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J. Immunol.* 160:3855.
102. Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, and V. K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev. Immunol.* 18:389.
103. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 322:271.
104. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531.
105. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* 13:108.
106. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303.
107. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 20;188:287.
108. Sojka, D. K., Y. H. Huang, and D. J. Fowell. 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 124:13.
109. Boudousquie, C., C. Pellaton, N. Barbier, and F. Spertini. 2009. CD4+CD25+ T cell depletion impairs tolerance induction in a murine model of asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 39:1415.
110. Kearley, J., D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:617.
111. 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.
112. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 199:1567.
113. Hartl, D., B. Koller, A. T. Mehlhorn, D. Reinhardt, T. Nicolai, D. J. Schendel, M. Griese, and S. Krauss-Etschmann. 2007. Quantitative and functional

- impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1258.
114. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 363:608.
 115. Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, I. I. Ivanov, Y. Umesaki, K. Itoh, and K. Honda. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science.* 331:337.
 116. Joosten, S. A., and T. H. Ottenhoff. 2008. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum. Immunol.* 69:760.
 117. Robertson, S. J., and K. J. Hasenkrug. 2006. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* 28:51.
 118. Arnold, I. C., N. Dehzad, S. Reuter, H. Martin, B. Becher, C. Taube, and A. Muller. 2011. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 121:3088.
 119. Francis, J. N., S. J. Till, and S. R. Durham. 2003. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:1255.
 120. Mamessier, E., J. Birnbaum, P. Dupuy, D. Vervloet, and A. Magnan. 2006. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 36:704.
 121. O'Hehir, R. E., L. M. Gardner, M. P. de Leon, B. J. Hales, M. Biondo, J. A. Douglass, J. M. Rolland, and A. Sandrini. 2009. House dust mite sublingual immunotherapy: the role for transforming growth factor-beta and functional regulatory T cells. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 180:936.
 122. Maggi, E. 2010. T-cell responses induced by allergen-specific immunotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* 161:10.
 123. Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor, and K. H. Roux. 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 441:847.
 124. Roux, K. H., and K. A. Taylor. 2007. AIDS virus envelope spike structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:244.
 125. Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell.* 50:975.
 126. Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in

- complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393:648.
127. Moore, J. P. 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science*. 276:51.
128. Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*. 393:705.
129. Becker, Y. 2004. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers--a review and hypothesis. *Virus Genes*. 28:5.
130. Patella, V., G. Florio, A. Petraroli, and G. Marone. 2000. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J. Immunol*. 164:589.
131. Becker, Y. 2004. HIV-1 induced AIDS is an allergy and the allergen is the Shed gp120--a review, hypothesis, and implications. *Virus Genes*. 28:319.
132. Masci, A. M., M. Galgani, S. Cassano, S. S. De, A. Gallo, R. De, V, S. Zappacosta, and L. Racioppi. 2003. HIV-1 gp120 induces anergy in naive T lymphocytes through CD4-independent protein kinase-A-mediated signaling. *J. Leukoc. Biol*. 74:1117.
133. Westendorp, M. O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 375:497.
134. Ji, J., and M. W. Cloyd. 2009. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *Int. Immunol*. 21:283.
135. Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson, and C. Chougnnet. 2006. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 108:3808.
136. Becker, C., C. Taube, T. Bopp, C. Becker, K. Michel, J. Kubach, S. Reuter, N. Dehzad, M. F. Neurath, K. Reifenberg, F. J. Schneider, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2009. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood*. 114:1263.
137. Tasken, K. 2009. Waking up regulatory T cells. *Blood*. 114:1136.
138. Aandahl, E. M., P. Aukrust, B. S. Skallehgg, F. Muller, S. S. Froland, V. Hansson, and K. Tasken. 1998. Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients. *FASEB J*. 12:855.
139. Bosma, G. C., R. P. Custer, and M. J. Bosma. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 301:527.

140. Araki, R., A. Fujimori, K. Hamatani, K. Mita, T. Saito, M. Mori, R. Fukumura, M. Morimyo, M. Muto, M. Itoh, K. Tatsumi, and M. Abe. 1997. Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:2438.
141. Blunt, T., N. J. Finnie, G. E. Taccioli, G. C. Smith, J. Demengeot, T. M. Gottlieb, R. Mizuta, A. J. Varghese, F. W. Alt, P. A. Jeggo, and . 1995. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* 80:813.
142. Greiner, D. L., R. A. Hesselton, and L. D. Shultz. 1998. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells.* 16:166.
143. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 68:869.
144. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and . 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 68:855.
145. Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, D. L. Greiner. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154:180.
146. Sugamura, K., H. Asao, M. Kondo, N. Tanaka, N. Ishii, K. Ohbo, M. Nakamura, and T. Takeshita. 1996. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 14:179.
147. Cao, X., E. W. Shores, J. Hu-Li, M. R. Anver, B. L. Kelsall, S. M. Russell, J. Drago, M. Noguchi, A. Grinberg, E. T. Bloom, and . 1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity.* 2:223.
148. Gagnon, R., Y. Boutin, and J. Hebert. 1995. Lol p I-specific IgE and IgG synthesis by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects in SCID mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:1268.
149. Herz, U., N. Schnoy, S. Borelli, L. Weigl, U. Kasbohrer, A. Daser, U. Wahn, E. Kottgen, and H. Renz. 1998. A human-SCID mouse model for allergic immune response bacterial superantigen enhances skin inflammation and suppresses IgE production. *J. Invest Dermatol.* 110:224.
150. Chiang, B. L., C. C. Chou, H. J. Ding, M. S. Huang, J. M. Chen, and K. H. Hsieh. 1995. Establishment of human IgE system in severe combined immunodeficient mice with peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:69.
151. Steinsvik, T. E., I. S. Aaberge, P. I. Gaarder, and M. Lovik. 1999. Interleukin-13 and human immunoglobulin E production in severe combined

- immunodeficiency mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 49:67.
152. Sonar, S. S., Y. M. Hsu, M. L. Conrad, G. R. Majeau, A. Kilic, E. Garber, Y. Gao, C. Nwankwo, G. Willer, J. C. Dudda, H. Kim, V. Bailly, A. Pagenstecher, P. D. Rennert, and H. Renz. 2010. Antagonism of TIM-1 blocks the development of disease in a humanized mouse model of allergic asthma. *J. Clin. Invest.* 120:2767.
153. DUBOIS, A. B., A. W. BRODY, D. H. LEWIS, and B. F. BURGESS, Jr. 1956. Oscillation mechanics of lungs and chest in man. *J. Appl. Physiol.* 8:587.
154. Taube, C., and R. Buhl. 2010. [Does phenotyping asthma help to improve differential treatment?]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 135:468.
155. Lin, Y. L., C. C. Shieh, and J. Y. Wang. 2008. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy.* 63:67.
156. Pestel, J., P. Jeannin, Y. Delneste, J. P. Dessaint, J. Y. Cesbron, A. Capron, A. Tscopoulos, and A. B. Tonnel. 1994. Human IgE in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from Dermatophagoides pteronyssinus-sensitive patients. *J. Immunol.* 153:3804.
157. Herz, U., V. A. Botchkarev, R. Paus, and H. Renz. 2004. Increased airway responsiveness, allergy-type-I skin responses and systemic anaphylaxis in a humanized-severe combined immuno-deficiency mouse model. *Clin. Exp. Allergy.* 34:478.
158. Tournoy, K. G., J. C. Kips, and R. A. Pauwels. 2001. The allergen-induced airway hyperresponsiveness in a human-mouse chimera model of asthma is T cell and IL-4 and IL-5 dependent. *J. Immunol.* 166:6982.
159. Martino, G., J. Anastasi, J. Feng, S. C. Mc, L. DeGroot, J. Quintans, and L. M. Grimaldi. 1993. The fate of human peripheral blood lymphocytes after transplantation into SCID mice. *Eur. J. Immunol.* 23:1023.
160. Tournoy, K. G., S. Depraetere, R. A. Pauwels, and G. G. Leroux-Roels. 2000. Mouse strain and conditioning regimen determine survival and function of human leucocytes in immunodeficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 119:231.
161. Tsumori, K., H. Kohrogi, E. Goto, N. Hirata, S. Hirosako, K. Fujii, M. Ando, O. Kawano, and H. Mizuta. 2003. T cells of atopic asthmatics preferentially infiltrate into human bronchial xenografts in SCID mice. *J. Immunol.* 170:5712.
162. Ohbo, K., T. Suda, M. Hashiyama, A. Mantani, M. Ikebe, K. Miyakawa, M. Moriyama, M. Nakamura, M. Katsuki, K. Takahashi, K. Yamamura, and K. Sugamura. 1996. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood.* 87:956.
163. Shultz, L. D., B. L. Lyons, L. M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S. D. Gillies, M. King, J. Mangada, D. L. Greiner, and R. Handgretinger. 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174:6477.

-
164. Katano, I., R. Ito, T. Eto, S. Aiso, and M. Ito. 2011. Immunodeficient NOD-scid IL-2Rgamma(null) mice do not display T and B cell leakiness. *Exp. Anim.* 60:181.
165. Filipovich, A. H., D. Weisdorf, S. Pavletic, G. Socie, J. R. Wingard, S. J. Lee, P. Martin, J. Chien, D. Przepiorka, D. Couriel, E. W. Cowen, P. Dinndorf, A. Farrell, R. Hartzman, J. Henslee-Downey, D. Jacobsohn, G. McDonald, B. Mittleman, J. D. Rizzo, M. Robinson, M. Schubert, K. Schultz, H. Shulman, M. Turner, G. Vogelsang, and M. E. Flowers. 2005. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11:945.
166. Duez, C., J. Kips, J. Pestel, K. Tournoy, A. B. Tonnel, and R. Pauwels. 2000. House dust mite-induced airway changes in hu-SCID mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 161:200.
167. Cornelis, S., G. Plaetinck, R. Devos, H. J. Van der, J. Tavernier, C. J. Sanderson, Y. Guisez, and W. Fiers. 1995. Detailed analysis of the IL-5-IL-5R alpha interaction: characterization of crucial residues on the ligand and the receptor. *EMBO J.* 14:3395.
168. Duez, C., H. Akoum, P. Marquillies, J. Y. Cesbron, A. B. Tonnel, and J. Pestel. 1998. Allergen-induced migration of human cells in allergic severe combined immunodeficiency mice. *Scand. J. Immunol.* 47:110.
169. Auffray, I., A. Dubart, B. Izac, W. Vainchenker, and L. Coulombel. 1994. A murine stromal cell line promotes the proliferation of the human factor-dependent leukemic cell line UT-7. *Exp. Hematol.* 22:417.
170. Spiegelberg, H. L., L. Beck, H. P. Kocher, W. C. Fanslow, and A. H. Lucas. 1994. Role of interleukin-4 in human immunoglobulin E formation in hu-PBL-SCID mice. *J. Clin. Invest.* 93:711.
171. Seder, R. A., W. E. Paul, M. M. Davis, and G. B. Fazekas de St. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176:1091.
172. Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English, and G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796.
173. Bousquet, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard, and . 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323:1033.
174. Wills-Karp, M., and C. L. Karp. 2004. Biomedicine. Eosinophils in asthma: remodeling a tangled tale. *Science.* 305:1726.
175. Tournoy, K. G., J. C. Kips, C. Schou, and R. A. Pauwels. 2000. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy.* 30:79.
176. Douwes, J., P. Gibson, J. Pekkanen, and N. Pearce. 2002. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 57:643.
-

-
177. Fahy, J. V., K. W. Kim, J. Liu, and H. A. Boushey. 1995. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:843.
178. Jatakanon, A., C. Uasuf, W. Maziak, S. Lim, K. F. Chung, and P. J. Barnes. 1999. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160:1532.
179. Shute, J. 1994. Interleukin-8 is a potent eosinophil chemo-attractant. *Clin. Exp. Allergy.* 24:203.
180. Zuurbier, A. E., L. Liu, F. P. Mul, A. J. Verhoeven, E. F. Knol, and D. Roos. 2001. Neutrophils enhance eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy.* 31:444.
181. Christianson, S. W., D. L. Greiner, R. A. Hesselton, J. H. Leif, E. J. Wagar, I. B. Schweitzer, T. V. Rajan, B. Gott, D. C. Roopenian, and L. D. Shultz. 1997. Enhanced human CD4⁺ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J. Immunol.* 158:3578.
182. Hesselton, R. M., D. L. Greiner, J. P. Mordes, T. V. Rajan, J. L. Sullivan, and L. D. Shultz. 1995. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J. Infect. Dis.* 172:974.
183. King, M., T. Pearson, L. D. Shultz, J. Leif, R. Bottino, M. Trucco, M. A. Atkinson, C. Wasserfall, K. C. Herold, R. T. Woodland, M. R. Schmidt, B. A. Woda, M. J. Thompson, A. A. Rossini, and D. L. Greiner. 2008. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin. Immunol.* 126:303.
184. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 8:193.
185. Perros, F., H. C. Hoogsteden, A. J. Coyle, B. N. Lambrecht, and H. Hammad. 2009. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy.* 64:995.
186. Hammad, H., B. N. Lambrecht, P. Pochard, P. Gosset, P. Marquillies, A. B. Tonnel, and J. Pestel. 2002. Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J. Immunol.* 169:1524.
187. Grindebacke, H., K. Wing, A. C. Andersson, E. Suri-Payer, S. Rak, and A. Rudin. 2004. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin. Exp. Allergy.* 34:1364.
188. Provoost, S., T. Maes, Y. M. van Durme, P. Gevaert, C. Bachert, C. B. Schmidt-Weber, G. G. Brusselle, G. F. Joos, and K. G. Tournoy. 2009. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy.* 64:1539.

189. Xystrakis, E., Z. Urry, and C. M. Hawrylowicz. 2007. Regulatory T cell therapy as individualized medicine for asthma and allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7:535.
190. Kearley, J., J. E. Barker, D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* 202:1539.
191. Leech, M. D., R. A. Benson, V. A. De, P. M. Fitch, and S. E. Howie. 2007. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J. Immunol.* 179:7050.
192. Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, T. B. Oriss, B. xon-McCarthy, L. Yang, B. T. Ameredes, T. E. Corcoran, and A. Ray. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J. Clin. Invest.* 114:28.
193. Mobs, C., C. Slotosch, H. Loffler, T. Jakob, M. Hertl, and W. Pfutzner. 2010. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J. Immunol.* 184:2194.
194. Kon, O. M., and A. B. Kay. 1999. T cells and chronic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:133.
195. Stirling, R. G., and K. F. Chung. 2000. Future treatments of allergic diseases and asthma. *Br. Med. Bull.* 56:1037.

8. Abkürzungsverzeichnis

[³ H]-TdR	Radioaktives [³ H]-Thymidin
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
AHR	„Airway hyperresponsiveness“, Atemwegsüberempfindlichkeit
AIDS	„Acquired Immune Deficiency Syndrome“, erworbenes Immundefektsyndrom
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	„Analysis of variance“, Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serum Albumin, Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
c/EBP	„CCAAT Enhancer-Binding Protein“
ca.	Circa
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat, Adenosin-3´, 5´-Monophosphat
CCR4	„C-C chemokine receptor type 4“
CCR5	„C-C chemokine receptor type 5“
CD	„Cluster of Differentiation“
C _{dyn}	dynamische Compliance
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
cpm	„Counts per minute“
CRE	„cAMP responsive element“
CREB	„cAMP responsible binding Protein“
CREM	„cAMP response element modulator“
CTLA-4	„Cytotoxic T lymphocyte-induced tumor antigen-4“, CD152
d.h.	Das heißt
DAMPs	„Damage-associated molecular pattern“
DC	„Dendritic cell“, dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	„Eosinophil cationic protein“
EDN	„Eosinophil-derived neurotoxin“

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbant Assay“
EMEM	„Eagle´s minimal essential medium“
EPO	„Eosinophil peroxidase“
EtOH	Ethanol
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
FCS	„Fetal calf serum“
FcεRI	„High-affinity IgE receptor“
FITC	„Fluorescein isothiocyanate“
FOT	„Forced oscillation technique“
Foxp3	„Forkhead box protein 3“
FSC	„Forward Scatter“, Vorwärtsstreulicht
GATA-1	„GATA-binding protein 1“
GATA-3	„Trans-acting T-cell-specific transcription factor-3“
GITR	„Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“
GM-CSF	„Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“
Gp120	Glykoprotein 120
GvH	„Graft versus host“
GvHD	„Graft-versus-Host-Disease“, Transplantat-Wirt-Reaktion
H&E	Hematoxylin-Eosin
HBSS	„Hank´s balanced salt solution“
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
HSA	„Human serum albumin“
hu	Human
i.n.	intranasal
i.p.	Intraperitoneal
ICER	„Inducible cAMP early repressor“
IDO	„Indoleamine 2,3-dioxygenase“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	„Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium“
IPEX	„Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
kg	Kilogramm
kU/l	Kiloeinheiten/Liter

I	Liter
Lck	Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MACS	„Magnetic Activated Cell Sorting“
MBP	„Major basic protein“
mg	Milligramm
MHC	„Major Histocompatibility Complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milimolar
mm ²	Quadratmillimeter
n	Anzahl pro Gruppe
N.D.	Nicht detektierbar
NK	„Natural killer cells“, Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NOD	„Nonobese diabetic“, nicht fettleibig diabetisch
NOD-Scid	„Nonobese diabetic - severe combined immunodeficiency“
nTreg	Natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
OP-Garn	Operationsgarn
p	p-Wert, Signifikanzniveau
PAMPs	„Pathogen-associated molecular patterns“
PAS	„Periodic acid-Schiff“
PBMCs	„Peripheral blood mononuclear cells“, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	„Phycoerythrin“
PE-Cy7	„Phycoerythrin-cyanine“
PerCP	„Peridinin chlorophyll protein“
PerCP-Cy5.5	„Peridinin chlorophyll protein-cyanine“
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
Prkdc	„Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide“
RAG-1	„Recombination Activating Gene-1“
RAG-2	„Recombination Activating Gene-2“
RANTES	„Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted“

R _L	Pulmonaler Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„Rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
Scid	„Severe Combined Immunodeficiency“
SEM	„Standard error of the mean“
SIT	Spezifische Immuntherapie
SSC	„Sideward Scatter“, Seitwärtsstreulicht
STAT	„Signal Transducers and Activators of Transcription“
TCC	„Total cell count“, Gesamtzellzahl der BAL
TGF-β	„Transforming growth factor beta“
Th1	Typ 1 T-Helferzellen
Th2	Typ 2 T-Helferzellen
Th3	„T helper type 3“
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1	„T regulatory type 1“
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLP	„Thymic stromal lymphopoietin“
TT	Tetanustoxoid
TZR	T-Zellrezeptor
U	„Unit“, Einheit der Enzymaktivität
u.a.	Unter anderem
V(D)J	V: „variable“, D: „diversity“, J: „joining“
z.B.	Zum Beispiel

9. Lebenslauf

