

Die Rolle von Interleukin-22 bei Asthma bronchiale

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Kristin Schneeweiß

geboren am 13. Oktober 1981

in Mainz

Mainz, April 2011

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die noch nicht heilbar ist. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, neue Möglichkeiten zu finden diese Atemwegserkrankung zu therapieren. Interleukin-22 ist ein Effektorzytokin, das von Zellen des Immunsystems produziert wird und auf Epithelzellen wirkt. Es nimmt eine duale Rolle ein, indem es abhängig vom Gewebe und Zytokinmilieu entweder entzündungsfördernden oder entzündungshemmenden Einfluss ausübt. Über seine Wirkung beim Asthma bronchiale ist bislang noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Interleukin-22 bei der allergischen Atemwegsentzündung mit Hilfe eines Maus-Modells und einer murinen bronchialen Epithelzell-Linie untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass IL-22-defiziente Mäuse eine verstärkte Atemwegshyperreaktion entwickelten. Die IL-22-Defizienz wirkte sich in diesem Modell entzündungsfördernd auf die induzierte Asthma-Reaktion aus. Die Aktivierung der Epithelzell-Linie C22 mit unterschiedlichen Stimuli induzierte eine erhöhte Produktion Asthma-relevanter Mediatoren, welche durch die Behandlung der Zellen mit rekombinantem IL-22 reduziert werden konnte. Der beobachtete inhibierende IL-22-Effekt ließ sich mit Hilfe seines natürlichen Antagonisten IL-22BP neutralisieren. Diese entzündungshemmende Wirkung des IL-22 konnte ebenfalls in Wildtyp-Mäusen, denen rekombinantes IL-22 intratracheal verabreicht worden war, bestätigt werden. Als Hauptproduzenten des IL-22 in diesem Asthma-Modell konnten lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems detektiert werden, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit Asthma bronchiale beschrieben wurden.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Befunde aktueller Forschungsstudien, wonach Interleukin-22 ein neuer Ansatzpunkt für zukünftige Therapiemöglichkeiten sein könnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Asthma bronchiale</i>	1
1.1.1	Pathomechanismen bei allergischem Asthma bronchiale	1
1.1.2	Bronchialepithel in pulmonaler Immunologie	3
1.1.3	Induktion einer Asthma-ähnlichen Reaktion in Mäusen.....	8
1.1.4	IL-22 als Bindeglied zwischen Immunzellen und Epithel.....	9
1.1.5	IL-22-produzierende Zellen	12
1.1.6	Die unterschiedliche Rolle von IL-17A im Vergleich zu IL-22 bei allergischem Asthma	16
2	Zielsetzung	20
3	Material/Methoden	21
3.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	21
3.1.1	Kultivierung und Stimulation von Zellen	21
3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	24
3.1.3	Zytotoxizitätstest.....	25
3.1.4	Intrazelluläre Färbung	25
3.1.5	Durchflusszytometrie / FACS-Analyse.....	26
3.2	<i>Methoden zur Analyse von Proteinen</i>	27
3.2.1	Western Blot	27
3.2.1	Isolierung und Lyse von Proteinen aus Mausgeweben	30
3.2.2	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	30
3.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	31
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Lungenlysaten	31
3.3.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA	31
3.3.3	Reverse Transkription	32
3.3.4	Real-time Polymerase Kettenreaktion	33
3.3.5	Konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	37
3.4	<i>Methoden mit Tieren</i>	39
3.4.1	Verwendete Mäuse	39
3.4.2	Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin	39
3.4.3	Lungenfunktionsmessung	40

Inhaltsverzeichnis

3.4.4	Zytospinpräparate und Lungenhistologie	40
3.4.5	Statistik.....	41
4	Ergebnisse.....	42
4.1	<i>IL-22-Effekte bei Mäusen im Asthma-Modell</i>	<i>43</i>
4.1.1	Erhöhte IL-22-Expression nach induzierter Asthma-Reaktion	44
4.1.2	IL-22-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Atemwegshyperreaktion und Entzündung der Atemwege	45
4.1.3	IL-22-Defizienz führt zur erhöhten Expression Asthma-assoziiierter Mediatoren.....	49
4.1.4	Applikation von rekombinantem IL-22 reduziert die Entstehung von bronchialem Asthma.....	53
4.2	<i>IL-22-Effekte und ausgelöste Mechanismen in bronchialen Epithelzellen</i>	<i>57</i>
4.2.1	Expression von IL-22 und des IL-22-Rezeptorkomplexes	57
4.2.2	Aktivierung der Signalwege in bronchialen Epithelzellen nach IL-22-Stimulation	59
4.2.3	IL-22 übt einen inhibierenden Einfluss auf die durch IL-13 und TNF α induzierte CCL17-Produktion von C22-Zellen aus	64
4.2.4	Effekte des IL-22 auf die Expression Asthma-assoziiierter Proteine	67
4.2.5	Aufhebung des inhibitorischen Effekts von IL-22 durch seinen natürlichen Antagonisten IL-22BP	69
4.2.6	Untersuchung des IL-22-Effekts auf die LPS-induzierte CCL17-Expression in C22-Zellen	71
4.3	<i>Identifizierung IL-22-produzierender Zellen nach induzierter AHR</i>	<i>73</i>
5	Diskussion.....	77
5.1	<i>IL-22 fungiert als negativer Regulator bei der experimentell induzierten Asthma-Reaktion.....</i>	<i>77</i>
5.2	<i>Asthma-assoziierte Mediatoren werden in pulmonaler IL-22-Abwesenheit in der Lunge von Wildtyp-Mäusen stärker exprimiert als in Anwesenheit des Zytokins</i>	<i>79</i>
5.3	<i>Bronchiale Epithelzellen fungieren als Zielzellen für IL-22 und ihre Stimulation wird durch den Einfluss des Zytokins gehemmt</i>	<i>81</i>
5.4	<i>Direkte Effekte des IL-22 auf die bronchiale Clara-Zell-Linie C22.....</i>	<i>83</i>
5.5	<i>Die exogene Applikation von IL-22 während der Provokationsphase bewirkt eine Abschwächung der AHR</i>	<i>84</i>
5.6	<i>Identifizierung und Charakterisierung IL-22-produzierender Zellen in der Lunge von Mäusen nach induzierter AHR</i>	<i>85</i>
5.7	<i>Ausblick und heutiger Stand der Forschung zu möglichen Therapieansätzen</i>	<i>88</i>

Inhaltsverzeichnis

6	Abkürzungen.....	90
7	Literaturverzeichnis	93
	Danksagung.....	110
	Angaben zur Person	111
	Erklärung.....	112

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische entzündliche Atemwegserkrankung, bei der es, durch unterschiedliche Auslöser wie Atemwegsinfekte, Allergien oder Anstrengung, zur Verengung der Atemwege kommt. Akut führt dies zu Atemnot, Husten und je nach Schweregrad zu einer respiratorischen Insuffizienz. Längerfristig folgen strukturelle Umbauvorgänge in den Atemwegen, das so genannte Remodelling, das wesentlich zum Fortschreiten der Pathologie beiträgt. Weltweit leiden etwa 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale, wobei in Deutschland etwa fünf Prozent der Erwachsenen und bis zu zehn Prozent der Kinder betroffen sind [1]. Auch bei konsequent durchgeführter Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden kommt es bei manchen Patienten immer wieder zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes [2]. Die dauerhafte Therapie mit Kortikosteroiden, die am häufigsten angewendet wird, ist nicht ohne Nebenwirkungen. So kann es beispielsweise im Kindesalter zu einer Wachstumsverzögerung kommen. Die Erkrankung bedeutet eine große Belastung für die betroffenen Familien, verursacht hohe Kosten im Gesundheitssystem und kann in schweren Fällen auch tödlich verlaufen.

1.1.1 Pathomechanismen bei allergischem Asthma bronchiale

Neben dem allergischen Asthma gibt es noch weitere Formen: z.B. die Asthma-Erkrankung mit Resistenz gegen Kortikosteroide [3] oder das nicht-allergische Asthma. Auslöser eines nicht-allergischen Asthmas sind häufig Umweltfaktoren (Luftverschmutzung, Zigarettenrauch [4], Ozon [5]), virale Infektionen oder Stress, welche unabhängig von Helfer-T-Zellen Typ 2 (Th2)¹ eine Atemwegshyperreaktion (AHR) induzieren. Die Mehrzahl der asthmatischen Patienten leiden an der allergischen Krankheitsform des Asthma bronchiale [6]. Auslöser für allergisches Asthma ist die Sensibilisierung gegen Allergene (z.B. Pollen, Proteine von Hausstaubmilben oder mikrobielle Produkte), die über die Schleimhäute aufgenommen werden und die epitheliale Permeabilität beeinflussen können.

¹ Th2-Zellen (T-Lymphozyten) gehören zu den Leukozyten des adaptiven Immunsystems und sind hauptsächlich bei der humoralen Immunabwehr, durch die Ausschüttung von Zytokinen, beteiligt.

Einleitung

Dies erklärt, dass Allergen-spezifische Th2-Zellen in der Lunge von Asthma-Patienten verstärkt vorliegen, besonders in Patienten mit allergischem Asthma [7]. Th2-Zellen produzieren unter anderem die Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-9 (IL-9). IL-4 und IL-13 sind an der Regulation des Immunglobulin-Klassenwechsels zu Immunglobulin E (IgE) in aktivierten B-Zellen² beteiligt [8;9], sowie an der Induktion einer AHR [10]. Das sezernierte IgE bindet an hochaffine IgE-Rezeptoren gewebständiger Mastzellen³ und eosinophiler Granulozyten⁴. Beim ersten Kontakt mit einem Allergen – der so genannten Sensibilisierungsphase - zeigen sich noch keine Symptome. Erst bei einem zweiten Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Ausschüttung von entzündungsfördernd (proinflammatorisch) wirkenden Botenstoffen dieser aktivierten Zellen, wie Histamin, Serotonin, Prostaglandin und Leukotrienen [11;12]. Dies führt zu den akuten Reaktionen der Allergie: erhöhte Gefäßpermeabilität und damit Gewebsschwellung, Konstriktion von glatten Muskelzellen in den Bronchien, und vermehrte Schleimbildung [13;14]. Im Gegensatz zu IL-4 und IL-13, die eine allergische Sofortreaktion auslösen, tragen die Th2-Zytokine IL-5 und IL-9 zu der Entwicklung einer Spätreaktion bei, indem sie weitere Entzündungszellen des Immunsystems zur Reifung anregen und an den Ort des Geschehens locken [10;11;15].

Bei der Initiierung von Immunantworten ist das Zytokin-Milieu entscheidend. Während eine Th2-Antwort (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) Allergien und Entzündungsreaktionen eher fördert, weist eine Th1-Antwort (IL-12, IFN- γ) dagegen protektive Effekte auf [16;17]. Darüber hinaus spielen bei allergischen Erkrankungen auch immunregulative Mechanismen wie IL-10-produzierende regulatorische T-Zellen (Tregs) eine Rolle. Diese Zellen sind möglicherweise bei allergischem Asthma nicht vollständig entwickelt oder durch Vorherrschen von proinflammatorischen Mechanismen verdrängt worden [18;19].

² B-Zellen (B-Lymphozyten) sind die Antikörper-produzierenden Leukozyten des adaptiven Immunsystems.

³ Mastzellen gehören zu den Leukozyten des angeborenen Immunsystems und tragen nach Aktivierung durch Ausschütten ihrer Granula zur Immunabwehr bei.

⁴ Eosinophile Granulozyten - kurz Eosinophile genannt - gehören zu den Leukozyten des angeborenen Immunsystems und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt.

1.1.2 Bronchialepithel in pulmonaler Immunologie

Wie bereits erwähnt, spielt die adaptive (erworbene) Immunität und im Besonderen die dabei involvierten Th2-Zellen beim allergischen Asthma eine entscheidende Rolle. Aber auch Mechanismen und Zellen des angeborenen Immunsystems oder Strukturzellen, wie Bronchialepithelzellen und glatte Muskelzellen, sind eng mit der allergischen Asthma-Reaktion verknüpft. Unabhängig von Th2-Zellen gibt es weitere Mechanismen, die an der Induktion einer Atemwegshyperreaktion beteiligt sind. Dabei und bei der Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale spielen die Bronchialepithelzellen eine wesentliche Rolle. Dies basiert auf ihrer Barriere- sowie Effektorfunktion, beispielsweise der Mukus-Produktion. Außerdem können die Epithelzellen durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen⁵ eine Entzündungsreaktion qualitativ, quantitativ und temporal beeinflussen.

1.1.2.1 Clara-Zellen

Das Bronchialepithel besteht im Wesentlichen aus respiratorischem Flimmerepithel und sekretorischen zilienfreien Zellen. Zu diesen sekretorischen Zellen zählen Becherzellen und Clara-Zellen. In der Abbildung 1-1 ist in einer schematischen Übersicht der Aufbau der Bronchiolen mit den zugehörigen Epithelzellen zu sehen. Bei Nagern stellen Clara-Zellen die hauptsekretorischen Zellen im gesamten Bronchialbaum dar [20;21]. Clara-Zellen wird eine wichtige Rolle bei allergischem Asthma zugeschrieben. Durch inflammatorische Stimuli (z.B. LPS, IL-13, TNF α) transformieren Clara-Zellen zu Clara-Becher-Zellen (kurz: Becherzellen) und sind die wesentlichen Produzenten des bei allergischem Asthma vermehrt sezernierten Mukus⁶. Darüber hinaus spielen Clara-Zellen eine Rolle bei der Erneuerung des Lungenepithels [22] und besitzen wichtige immunmodulatorische Funktionen. Sie können Immunantworten sowohl fördern, z.B. durch ihre Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [23], als auch hemmen, z.B. durch die Sekretion des Proteins CCSP (clara cell secretory protein, auch unter den Bezeichnungen CC10 und CC16 bekannt), welches Th2-Antworten inhibiert [24;25].

⁵ Chemokine gehören zur Gruppe der chemotaktischen Zytokine. Sie lösen bei ihren Zielzellen eine Wanderungsbewegung (Chemotaxis) zum Entzündungsort aus.

⁶ Mukus = Schleim

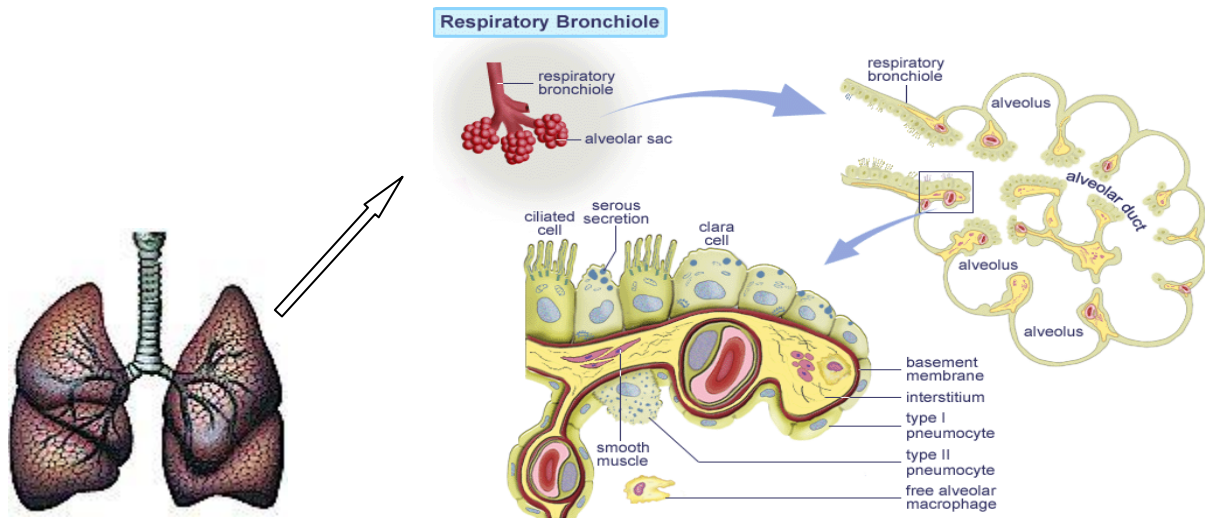


Abb. 1-1 Darstellung der Lunge und schematischer Aufbau einer Bronchiole

Die Lunge besteht aus den Bronchien, welche sich zu Bronchiolen verzweigen. Eine Bronchiole verzweigt sich weiter zu den Lungenbläschen (Alveolen) und setzt sich hauptsächlich aus Flimmerepithel zusammen. In den Alveolen findet die Oxygenierung des Blutes statt. Unter den Epithelzellen befinden sich Zilien-tragende Zellen und Zilien-freie Clara-Zellen, welche die Basalmembran (BM) bilden. Alveolarepithelzellen (Pneumozyten Typ I/II) sitzen der BM auf. Unter der BM, im Zwischengewebe (Interstitium), befindet sich glatte Muskulatur. Weiterhin finden sich noch Alveolarmakrophagen, die aus dem Blut stammen und Fremdstoffe sowie Abbauprodukte phagozytieren. (Quelle: Dr. M. McKee: Lecture on Histology of Respiratory System 3. Respiratory Bronchiole)

1.1.2.2 Epithelzell-induzierte Zytokine: TSLP, IL-25, IL-33, CCL-17, Eotaxin3

Im Folgenden werden Zytokine beschrieben, welche eine entscheidende Funktion beim Asthma bronchiale besitzen. In der Abbildung 1-2 sind die Interaktionen einiger dieser Zytokine zwischen dem Lungenepithel und den Immunzellen schematisch dargestellt.

Zu den Asthma-assoziierten Zytokinen gehört u.a. das „**Thymic stromal lymphopoietin**“ (**TSLP**), das von primären Epithelzellen exprimiert wird, sobald diese durch spezielle mikrobielle Produkte, entzündungsfördernde Zytokine (z.B. IL-1 β , TNF α) oder Verletzungen des Gewebes aktiviert werden [26]. So wurde eine erhöhte TSLP mRNA-Expression in den Atemwegen von Asthma-Patienten gefunden und festgestellt, dass dies mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [27]. Die lungenspezifische Expression von TSLP induziert eine Entzündungsreaktion und kann eine Atemwegshyperreaktion

Einleitung

induzieren, bei der NKT-Zellen⁷ mitbeteiligt sind [28]. TSLP ist also an der allergischen Atemwegsentzündung durch die Initiierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt. Durch die vermehrte TSLP-Ausschüttung der Epithelzellen werden Dendritische Zellen (DCs)⁸ aktiviert, welche wiederum Th2-Zellen stimulieren [29].

Ein weiteres Zytokin, das von aktivierten Lungenepithelzellen sezerniert wird, ist das **IL-25** (auch IL-17E genannt), das zur IL-17-Familie gehört. Es wird nach Zell-Stimulation mit einem Allergen oder einer Helminthen-Infektion exprimiert [30-32]. IL-25 wird neben Epithelzellen ebenfalls von aktivierten Eosinophilen, aus dem Knochenmark-stammenden Mastzellen und basophilen Granulozyten⁹ produziert [33]. Das Zytokin wurde in erhöhten Konzentrationen in der bronchialen Submukosa von Asthma-Patienten gefunden [34]. In Maus-Modellen konnte auch gezeigt werden, dass IL-25 die Produktion von Th2-Zytokinen fördert und eine Eosinophilie¹⁰ in der Lunge auslöst [35]. Des Weiteren scheint sich IL-25 positiv auf die IL-9 Produktion von T-Zellen auszuwirken [30].

Ein weiteres, ebenfalls von pulmonalen Epithelzellen exprimiertes und bei der Asthma-Reaktion involviertes Zytokin ist das **IL-33**. Es wird von unterschiedlichen Zellen sezerniert, darunter hauptsächlich Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten. IL-33 aktiviert wiederum Th2-Zellen, Mastzellen und Basophile und unterstützt das Überleben von Eosinophilen und deren Degranulation [36-38]. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine virale Infektion oder eine Allergen-Sensibilisierung zur Verstärkung der IL-33-Produktion führt [31;39]. Da in Asthma-Patienten eine erhöhte IL-33-Konzentration nachgewiesen werden konnte [40;41], scheint IL-33 eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Asthma bronchiale auszuüben. Die Mechanismen die durch IL-33

⁷ NKT-Zellen („Natürliche Killer T-Zellen“) zählen zu einer Reihe unterschiedlicher Subpopulationen von T-Zellen, die die Eigenschaften von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) aufweisen.

⁸ Dendritische Zellen zählen (wie Makrophagen und B-Zellen) zu den „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen und nehmen als „Vermittler-Zellen“ eine Extrarolle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem ein. Ihre Hauptfunktionen sind die Antigenprozessierung und -präsentation. Nach ihrer Aktivierung interagieren sie hauptsächlich mit T- und B-Zellen und induzieren deren Stimulation.

⁹ Basophile Granulozyten - kurz Basophile genannt - gehören zu den Leukozyten des angeborenen Immunsystems und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt.

¹⁰ Eosinophilie = Erhöhung der Zahl eosinophiler Granulozyten im Blutbild

Einleitung

ausgelöst werden und zur Atemwegsentzündung führen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

CCL17 (Chemokine (C-C motif) ligand 17, auch unter dem Namen „Thymus- and activation-regulated chemokine“ (TARC) bekannt) ist das erste Chemokin, bei dem gezeigt werden konnte, dass es für die gezielte Th2-Zell-Chemotaxis zuständig ist. CCL17 wird von vielen Immunzellen, wie beispielsweise mononukleären Zellen, Thymus-Zellen, DCs, Endothel- und bronchialen Zellen exprimiert. Dieses Chemokin ist ein spezifischer Ligand für CCR4-Rezeptoren, die bei den T-Zellen nur auf Th2- und nicht auf Th1-Zellen zu finden sind [42]. Bei Mäusen konnte in einem Asthma-Modell eine erhöhte CCL17-Genexpression detektiert werden. Zusätzlich zeigte sich, dass die Blockade mit neutralisierenden Antikörpern eine Milderung der Eosinophilie und der AHR in den Mäusen bewirkte [43]. Auch in Asthma-Patienten konnten nach der Provokation mit einem Allergen erhöhte CCL17-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)¹¹ und dem Sputum¹² detektiert werden, was durch die verstärkte CCL17-Genexpression in bronchialen Epithelzellen untermauert werden konnte [44-47]. Die beiden Th2-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13 scheinen die Hauptzytokine zu sein, welche die Produktion von CCL17 induzieren. Ist zusätzlich TNF α involviert, führt dies zur synergistischen Verstärkung der CCL17-Sezernierung durch bronchiale Epithelzellen und mukosale Zellen der Nase [42;44;46;48;49].

Eotaxin3 (auch als CCL26 bezeichnet) ist neben CCL17 ein weiteres wesentliches Chemokin bei der Induktion der Asthma-Reaktion. Es wird von aktivierten Lungenepithelzellen exprimiert und hat Einfluss auf die Chemotaxis von Eosinophilen und Basophilen zum Entzündungsort.

¹¹ Eine Variante der Bronchiallavage ist die bronchoalveoläre Lavage. Darunter versteht man die Spülung der Bronchien zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken.

¹² Sputum = ausgehustete Absonderung der Atemwegsschleimhaut mit beigemischten Zellen

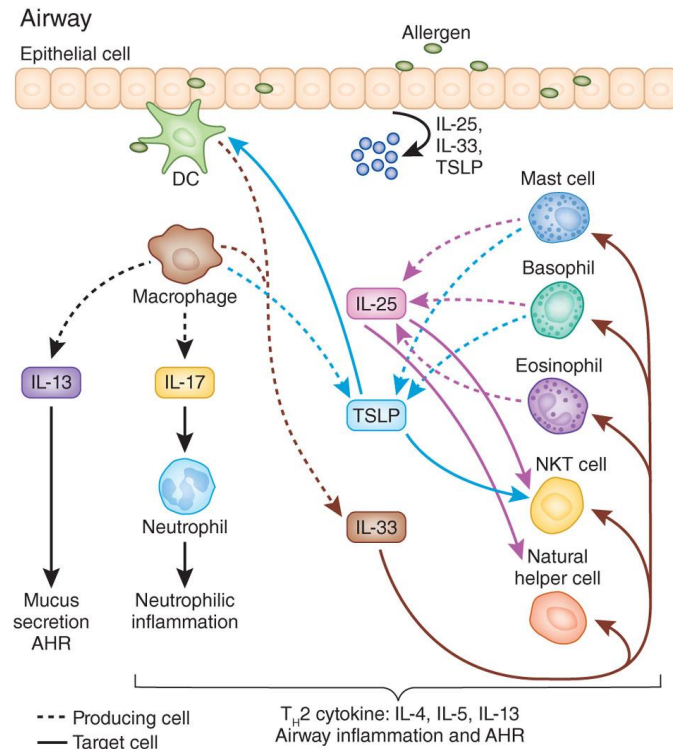


Abb. 1-2 Interaktionen von Zytokinen mit Zellen des Immunsystems bei Asthma bronchiale
 (Abbildung aus Kim et al., 2010 [50] übernommen)

1.1.2.3 Involvierte Gene/Proteine bei der Mukus-Induktion: Gob5 und MUC5A/C

In der Zellkultur lassen sich viele der oben genannten Zytokine durch Stimulation mit dem Th2-Zytokin IL-13 und TNF α in bronchialen Epithelzellen induzieren. Ebenso lässt sich die Expression von Genen induzieren, die eine Rolle in der Mukus-Produktion spielen (z.B. Gob5 (CaCl3) und MUC5A/C) [51;52].

Gob5 (auch ClCa3 genannt = „chloride channel calcium activated family member 3“) ist ein Gen aus der Kalziumchlorid-Kanal-Familie und das daraus resultierende Protein ist ein Schlüsselmolekül bei der Induktion von murinem Asthma [53]. Der Name „Gob5“ ist abgeleitet von der Funktion des Proteins, da es für die Ausbildung einer Becherzelle („goblet cell“)-Hyperplasie zuständig ist. Seine Genexpression ist eng korreliert mit der Expression des MUC5A/C-Gens bzw. Proteins, welches für die Mukus-Produktion verantwortlich ist. Während beide Proteine von bronchialen Epithelzellen produziert werden, sind deren Genexpression bei Asthma-Patienten und Mäusen im Asthma-Modell hochreguliert [54].

1.1.3 Induktion einer Asthma-ähnlichen Reaktion in Mäusen

Zur Erforschung des Asthma bronchiale gibt es verschiedene Tiermodelle, die sehr hilfreich bei der Aufdeckung der zum Teil recht komplexen Mechanismen dieser Erkrankung sind. Da in dieser Forschungsarbeit das allergische Asthma untersucht werden soll, wurde die enge Kooperation zur Arbeitsgruppe von PD Dr. med. C. Taube aus der Pneumologie (III. Medizinische Klinik, Unimedizin, Mainz) genutzt und mit dem dort seit Jahren etablierten Asthma-System mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA)¹³ gearbeitet. Der zeitliche Ablauf des in dieser Arbeit verwendeten Asthma-Modells ist in Abbildung 1-3 kurz dargestellt.

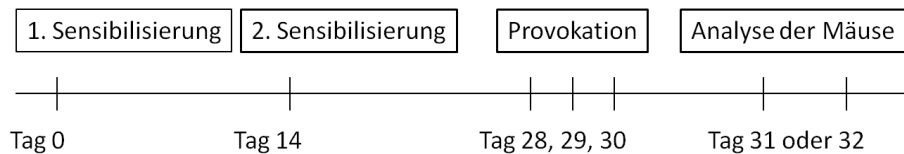


Abb. 1-3 Zeitplan des Asthma-Modells: Die Sensibilisierung und Provokation erfolgt an den angegebenen Tagen. Analysiert werden die Mäuse bezüglich ihres Atemwegswiderstands und der Zellpopulationen aus der BAL und der gesamten Lunge.

Das murine OVA-Sensibilisierungs- und Provokations-Modell zur Induktion einer allergischen Atemwegshyperreaktion ist seit Jahren etabliert [55-58]. In diesem Modellsystem kann, ähnlich wie im Asthma bronchiale beim Menschen, beobachtet werden, dass eine hohe Anzahl an Eosinophilen in den Atemwegen akkumuliert vorliegt, die erhöhte Mengen an Th2-Zytokinen exprimieren. Die Detektion der Eosinophilen erfolgt in der BAL. Die Mäuse weisen zudem eine erhöhte Produktion der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG1 auf, die von aktivierten B-Zellen sezerniert werden. Bei Mäusen, denen zunächst durch Sensibilisierung mit OVA und anschließender Provokation mit demselben Modellantigen eine Asthma-ähnliche Reaktion induziert wurde, ist – anders als bei nicht sensibilisierten Tieren – nach inhalativer Provokation mit dem Bronchokonstruktor Methacholin ein erhöhter Atemwegswiderstand messbar. Das Methacholin fungiert im Körper als Botenstoff, der bei Asthma-Patienten und bei Asthma-induzierten Mäusen zur

¹³ Ovalbumin = Hauptbestandteil des Eiklars in Vogeleiern

Einleitung

Verengung der Atemwege führt. Bei den Methacholin-provozierten Mäusen ist die AHR anhand der Messung des Atemwegswiderstands gut zu detektieren. Des Weiteren sind Umgestaltungen der Atemwege, erhöhte Kollagenablagerungen um die Atemwege, erhöhte Schleimproduktion und Verkrampfung der glatten Muskulatur zu beobachten. Dies zeigt, dass das murine Asthma-Modell viele der charakteristischen Merkmale der humanen Asthma-Erkrankung imitiert und aus diesen Gründen für die Erforschung des bronchialen Asthmas geeignet ist. Dass das Maus-Modell nur Richtwerte für mögliche Therapieansätze liefern kann, wurde in Studien deutlich, bei denen die AHR durch Inhibierung der Th2-Antwort in Asthma-induzierten Mäusen aufgehoben werden konnte [56-61], während die Anwendung dieser Forschungsansätze im Menschen erfolglos blieb [62]. Dennoch sind Studien im Maus-Modell sinnvoll, um die Funktionsweise der beteiligten Zytokine aufzuklären. Die dadurch aufgestellten Hypothesen müssen anschließend in humanen Studien analysiert und bestätigt oder widerlegt werden. Diese Forschung offenbart ein großes Potential für neue Therapieansätze zur Bekämpfung des humanen allergischen Asthmas.

1.1.4 IL-22 als Bindeglied zwischen Immunzellen und Epithel

Das Zytokin IL-22 ist in letzter Zeit in den Fokus der Asthmaforschung gerückt, als ein Zytokin, welches möglicherweise neben den oben genannten Zytokinen eine zentrale Rolle in allergischem Asthma und anderen pulmonalen Erkrankungen spielt. Dadurch, dass es hauptsächlich von Immunzellen produziert wird und auf epitheliale Zellen wirkt, stellt es ein Bindeglied zwischen Zellen des Immunsystems und der Atemwegsepithelien dar. In Mäusen wurde IL-22 im Jahr 2000 entdeckt [63] und aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem entzündungshemmend (antiinflammatorisch) und immunsuppressiv wirkenden Zytokin IL-10 zunächst IL-TIF (IL-10-related T cell derived inducible factor) genannt [64;65]. Fast zur selben Zeit wurde im Menschen ein neues Zytokin entdeckt, das den Namen IL-22 bekam [66]. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Gen- und Protein-Struktur sowie der gemeinsam genutzten Rezeptorkette, gehört IL-22 zur IL-10-Familie (neben IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 α/β und IL-29) [66-71]. Die insgesamt neun IL-10 Familienmitglieder teilen sich die vier Rezeptor 1-Ketten und zwei Rezeptor 2-Ketten (siehe Tabelle 1-1) [67;69-73].

Einleitung

Tab. 1-1 Kombination der Rezeptorketten in den Rezeptorkomplexen der IL-10-Familienmitglieder

	IL-10R1	IL-20R1	IL-22R	IL-28R
IL-10R2	IL-10	IL-26	IL-22	IL-28 α , β , IL-29
IL-20R2	?	IL-19, IL-20, IL-24	IL-20, IL-24	?

In der Abbildung 1-4 sind die Rezeptorkomplexe einiger Mitglieder der IL-10-Familie, ihre Hauptproduzenten und Zielzellen schematisch dargestellt.

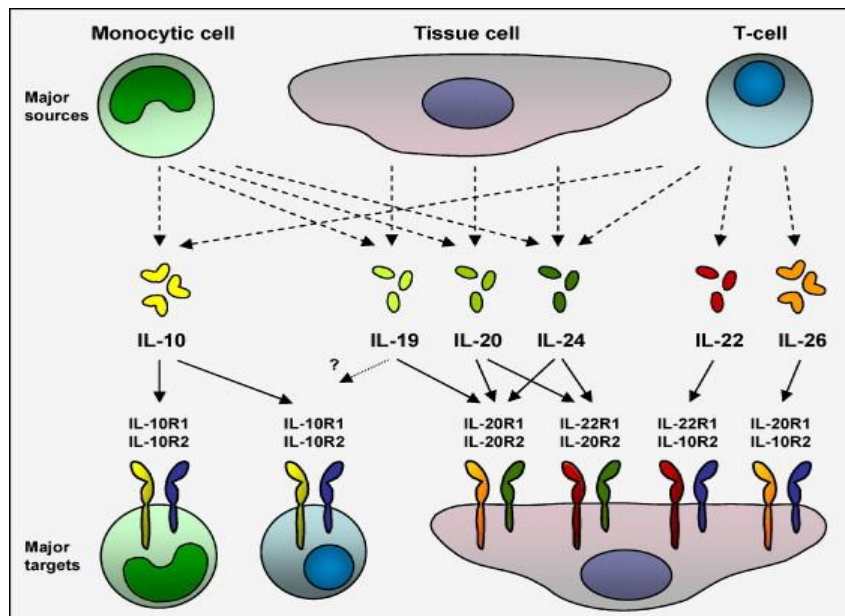


Abb. 1-5 Übersicht über Zytokin-produzierende Zellen und Zielzellen einiger IL-10 Familien-Mitglieder (aus Sabat et al., 2010 [74] übernommen)

IL-22 vermittelt seine zelluläre Funktion über einen transmembranen Rezeptorkomplex. Der IL-22-Rezeptor ist ein heteromerer Komplex, bestehend aus den Ketten IL-22R und IL-10R2. Während die IL-10R2-Kette ubiquitär vorhanden ist [75], wird die Spezifität der

Einleitung

Wirkung von IL-22 durch die IL-22R-Kette vermittelt, welche vor allem von epithelialen Zellen exprimiert wird.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten der IL-10-Familienmitglieder, üben alle Zytokine unterschiedliche biologische Funktionen aus [76;77].

1.1.4.1 Die duale Rolle des IL-22

Das Zytokin IL-22 besitzt eine duale Schlüsselrolle bei der antimikrobiellen Abwehr, der Regeneration und Protektion gegen Gewebeschädigung und bei chronischen Erkrankungen, da es sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte aufweist. IL-22 interagiert nicht mit Immunzellen, sondern übt seine Effektorfunktionen ausschließlich auf Epithelzellen aus. So ist gezeigt worden, dass IL-22 die Produktion von Zytokinen und Chemokinen in Keratinozyten der Haut [75;78;79] und Darmepithelien [80;81] induziert. Aufgrund der gefundenen Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes, wird vermutet, dass die wichtigsten Zielzellen für IL-22, Zellen aus der Haut, dem Verdauungstrakt (eingeschlossen Bauchspeicheldrüse und Leber), der Lunge und der Niere sind [75].

1.1.4.2 IL-22 Bindeprotein ist ein natürlicher Inhibitor für IL-22

Um eine natürliche Balance bzw. Regulation des produzierten IL-22 im Körper aufrechtzuerhalten, existiert ein einzelkettiger Rezeptor, der als IL-22 Bindeprotein (IL-22BP) deklariert wurde und als natürlicher Inhibitor für IL-22 fungiert [63;82-86]. Beim Menschen liegt IL-22BP in drei Splicevarianten vor, wobei nur eine Variante das IL-22BP repräsentiert [82;83;86;87]. Bei Mäusen sind bisher keine Splicevarianten dieses Proteins beschrieben worden [84;85]. IL-22BP hat eine 20- bis 1000-fach höhere Affinität zu IL-22, als die membranständige IL-22 Rezeptor-Kette des IL-22-Rezeptorkomplexes [88-90]. Die Bindung des IL-22BP an das IL-22 bewirkt die Bildung eines hoch stabilen Komplexes, der nur eine schwache Dissoziationsrate aufweist. Durch die hochaffine Bindung des IL-22BP wird das IL-22 neutralisiert und verliert seine Effektorfunktionen. In vielen unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-22BP eine inhibierende

Einleitung

Funktion auf die zellulären IL-22-Effekte ausübt [83;86;87;91-93]. Während IL-22 bei akuten Entzündungsreaktionen hochreguliert wird (beispielsweise in murinen Lymphknoten nach systemischer LPS-Gabe oder im Darm von Mäusen im Colitis-System), wird die IL-22BP-Expression herunterreguliert, so dass es zu einem erhöhten IL-22/IL-22BP Verhältnis kommt [85;90]. In einer Studie wurde jedoch gezeigt, dass die IL-22BP-Expression bei sehr späten Zeitpunkten der Entzündungsreaktion nicht herunterreguliert wird. So wurden erhöhte IL-22BP-Konzentrationen in der Leber von Mäusen gefunden, die vier oder neun Wochen zuvor mit dem Darmparasiten *Schistosoma mansoni* oder dem Bakterium *Mycobacterium avium* und Parasiten *Toxoplasma gondii* infiziert worden waren [94]. Eine weitere Studie zeigte, dass eine Helminthen-Infektion in Mäusen protektiv gegen allergische und Autoimmunerkrankungen wirkt. Diese Wurm-Infektion führt normalerweise zu einer starken Th2-Antwort des Immunsystems, welche von den Parasiten jedoch unterdrückt werden kann, indem eine verstärkte Aktivierung von regulatorischen T-Zellen induziert wird. Eine starke Produktion des Suppressorzytokins IL-10 führt daraufhin zur Unterdrückung der Entzündung [95]. In klinischen Studien am Menschen konnten mit dieser Therapieform schon positive Resultate erzielt werden.

Es scheint, dass IL-22 das einzige IL-10-Familienmitglied ist, das, sobald es produziert wird, durch seinen eigenen Inhibitor reguliert werden kann. Die Balance zwischen IL-22-Produktion und -Inhibition ist folglich ein „negatives Rückkopplungs-System“.

1.1.5 IL-22-produzierende Zellen

IL-22 wird im murinen System hauptsächlich von aktivierten **Th17-Zellen** exprimiert [96-98]. Diese Zellen, die neben Th1- und Th2-Zellen eine dritte wesentliche Population von T-Helfer-Zellen darstellen, produzieren die Zytokine IL-17 (auch als IL-17A bezeichnet), IL-21, IL-22 und IL-25 (IL-17E) [99;100]. Sie exprimieren den IL-23R und die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR6 und sind charakterisiert durch die Expression der Transkriptionsfaktoren „retinoic acid-related orphan receptor“ (ROR) γ t, ROR α und IRF („interferon regulatory factor“)[101-108]. Verschiedene Zytokine, die in erhöhter Menge von myeloiden DCs produziert werden, wie beispielsweise IL-1 β , IL-6, IL-21, TGF- β und IL-23, sind für die Differenzierung von Th17-Zellen bei Mensch und Maus zuständig [109].

Einleitung

IL-23 spielt eine wichtigere Rolle für das Überleben, als für die Differenzierung der Zellen [101;105;107]. Im humanen System spielen **Th22-** und **Th1-Zellen** eine größere Rolle bei der Funktion als IL-22-Produzenten, als die Th17-Zellen [110;111]. Die erst kürzlich entdeckten Th22-Zellen entwickeln sich vorzugsweise durch Interaktionen mit plasmazytoiden DCs¹⁴ in Verbindung mit TNF α und IL-6 [112]. Diese Zellen produzieren neben IL-22 keine anderen typischen T-Helfer-Zell-Zytokine [113]. Weitere humane IL-22-produzierende Zellen sind **CD4⁺**- und **CD8⁺-Gedächtniszellen** [114-116], sowie **Tc22-Zellen** [117]. Neben den $\alpha\beta$ T-Zellen wurde allerdings auch beschrieben, dass murine **$\gamma\delta$ T-Zellen**¹⁵ entdeckt wurden, die IL-22 produzieren. Sie exprimieren neben diesem Zytokin auch den Chemokinrezeptor CCR6, Transkriptionsfaktor ROR γ t, Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR), IL-23 Rezeptor und Rezeptoren für mikrobielle Produkte [118-120]. Noch gibt es keine Daten, die belegen, dass es IL-22-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen auch beim Menschen gibt.

Es wurden auch aus dem Blut stammende **Natürliche Killerzellen** (NK-Zellen)¹⁶ identifiziert, die IL-22 produzieren [116]. Neben diesen zirkulierenden Zellen wurde erst kürzlich die Mukosa-assoziierte lymphoide gewebsständige NK-Zellpopulation beschrieben, die zwar IL-22 aber nicht IL-17 exprimiert. Diese Zellen werden **NK22-Zellen** genannt. Den Zellen fehlen die klassischen NK-Effektorzellfunktionen - sie sind anscheinend jedoch für den Schutz und die Regulation der mukosalen Homöostase zuständig [116;121;122]. Ähnliche intestinale NK-Zellsubpopulationen, die IL-22, aber nicht IL-17 produzieren, wurden auch in Mäusen entdeckt. Diese Zellen besitzen einen sehr heterogenen Phänotyp und tragen deshalb den Namen „**ROR γ t NKp46⁺NK1.1⁺-Zellen**“ [116;122-125]. Diese NK22-Zellen werden oft fälschlicherweise für DCs gehalten, weil sie ähnliche Oberflächenmarker wie diese aufweisen (CD11c⁺/CD49⁻). Sie exprimieren konstitutiv IL-22,

¹⁴ Plasmazytoide DCs stellen eine Subpopulation von humanen DCs im peripheren Blut dar. Die Zellen fungieren als Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr bei viralen Infektionen.

¹⁵ $\gamma\delta$ T-Zellen repräsentieren eine Untergruppe der T-Zellen. Sie unterscheiden sich von $\alpha\beta$ T-Zellen, durch den T-Zellrezeptor, bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette. Diese T-Zellen kommen seltener vor als $\alpha\beta$ T-Zellen und werden vermehrt in der Darmmukosa gefunden.

¹⁶ Natürliche Killerzellen gehören zu den Leukozyten des angeborenen Immunsystems und sind in der Lage Tumorzellen und virusinfizierte Zellen abzutöten.

Einleitung

woraus zu schließen ist, dass das Zytokin sehr wahrscheinlich für die Darm-Homöostase [121;122] und für den Schutz vor Infektionen [126] verantwortlich ist.

Des Weiteren wurde die Expression von IL-22 für humane und murine „**lymphoid tissue inducer (LTi) cells**“, also lymphoide gewebsinduzierbare Zellen, die aus humanen entwickelten Lymphknoten und aus dem Darm von adulten Mäusen isoliert wurden, beschrieben. Diese Zellen spielen eine Rolle bei der Formation sekundärer lymphatischer Organe und sind charakterisiert durch die Expression von IL-17, Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ und ROR γ t [127;128]. Sowohl für den Menschen als auch für Mäuse wurden ähnliche Zellen wie die gewebsinduzierenden IL-22-produzierenden Zellen entdeckt, die „**LTi-like cells**“, welche aus humanen Mandeln, der Milz und der Lamina propia des murinen Darms isoliert wurden. Neben IL-22 exprimieren diese Zellen u.a. das Zytokin IL-17 und die Transkriptionsfaktoren ROR γ t sowie AHR [129;130].

Als weitere IL-22-Quelle, wurden murine **NKT-Zellen** beschrieben [131;132]. Im Gegensatz zu Lymphozyten exprimieren nicht-hämatopoetische Gewebezellen kein IL-22 [75]. Alle IL-22-exprimierenden Zellen sind in Abbildung 1-5 für das murine System dargestellt.

Es sind viele *in vivo* Situationen beschrieben worden, in denen erhöhte Mengen von IL-22 gefunden wurden, eingeschlossen Entzündungs- und Infektionsreaktionen. Die zelluläre Quelle des IL-22 bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern variierte jedoch, u.a. in Abhängigkeit vom Ort der Entzündung bzw. Infektion und vom Zeitpunkt der Analyse.

Einleitung

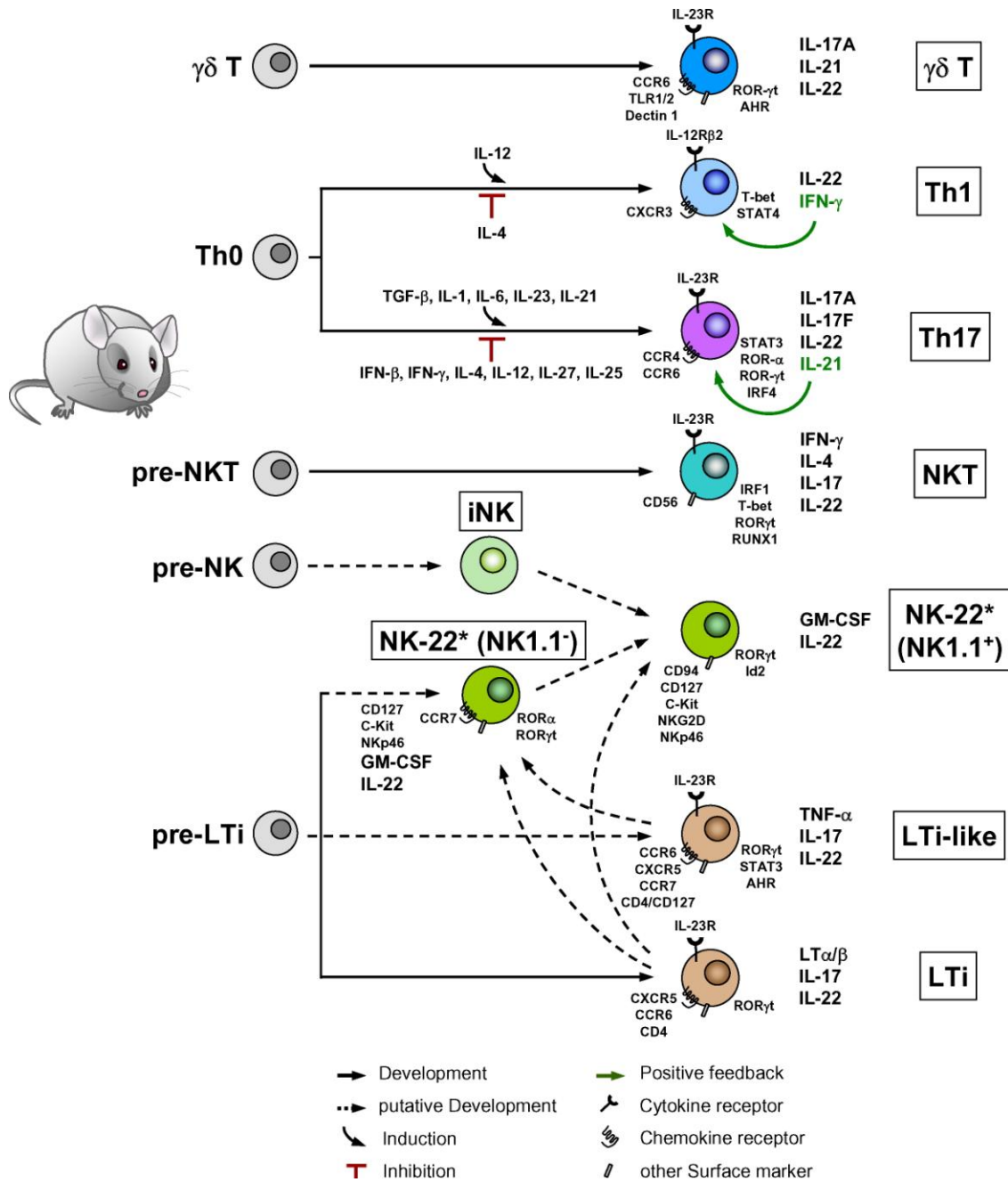


Abb. 1-5 Zusammenfassung der IL-22-produzierenden Zellen in der Maus

Dargestellt sind die phänotypischen Merkmale der IL-22-produzierenden Zellen, eingeschlossen Oberflächenrezeptoren, Expression zelllinienspezifischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine. Mögliche Signalwege sind gestrichelt dargestellt, die * Markierung der NK-Zellsubpopulation deutet an, dass diese Zellen sehr wahrscheinlich mit NK-22-Zellen des humanen Systems übereinstimmen.

Abkürzungen: AHR (aryl hydrocarbon receptor); Id2 (inhibitor of DNA binding 2); IRF (interferon regulatory factor); LT (lymphotoxin); LTi (lymphoid tissue inducer cells); RORα (retinoic acid-related orphan receptor α); RORγt (retinoic acid-related orphan receptor γt); STAT (signal transducer and activator of transcription); T-bet (T-box expressed in T cells). Die Abbildung wurde aus Witte et al., 2010 [133] übernommen.

1.1.6 Die unterschiedliche Rolle von IL-17A im Vergleich zu IL-22 bei allergischem Asthma

Da das Auftreten von IL-22 meistens in direkte Verbindung mit der Anwesenheit von IL-17A gebracht wird und dieses bei allergischem Asthma ebenfalls eine wichtige Rolle einnimmt, werden beide Zytokine im folgenden Abschnitt kurz gegenübergestellt.

IL-17A und IL-22 sind hauptsächlich von Lymphozyten stammende Zytokine, die beide einen starken Einfluss auf Epithelzellen verschiedener Gewebe ausüben. Es wird vermutet, dass IL-17A und IL-22 Schlüsselzytokine für die Regulation der Homöostase und der epithelialen Barrierefunktion sind. Beide haben die Fähigkeit entweder protektiv gegen Infektionen, aber auch pathologisch, beispielsweise bei Entzündungserkrankungen wie Psoriasis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Asthma, zu wirken. Allerdings ist auch gezeigt worden, dass ausschließlich IL-17A und nicht IL-22, bei der Pathogenese mehrerer Autoimmunerkrankungen involviert ist. Aufgrund von frühen Studien wurde angenommen, dass beide Zytokine ausschließlich von Th17-Zellen koexprimiert werden. Die stetig neu publizierten Forschungsergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass es mehrere neue Subpopulationen von IL-22-exprimierenden T-Zellen gibt, die kein IL-17A produzieren (siehe Abschnitt 1.1.5). Diese Feststellung weist darauf hin, dass beide Zytokine über unterschiedliche Prozesse reguliert werden müssen und unterschiedliche Funktionen ausüben.

1.1.6.1 Intrazelluläre Signalwege von IL-17A und IL-22

Obwohl beide Zytokine unterschiedliche Signaltransduktionswege nutzen, gibt es auch einige Überschneidungen. Nach der Bindung von IL-17A an den ubiquitär exprimierten IL-17A-Rezeptor, kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors „transcription factor nuclear factor“ (NF) κ B [134;135] sowie der „mitogen activated protein“ (MAP)-Kinasen [136], die ebenfalls von IL-22 stimuliert werden. IL-22 hingegen induziert nach Bindung an den spezifischen Rezeptorkomplex die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Jak1 und Tyk2. Diese initialisieren eine Signalkaskade über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) [66;137], STAT1 und STAT5, abhängig vom Gewebe [98]. Zusätzlich aktiviert IL-22 die drei

Einleitung

Hauptsignalwege der MAP-Kinasen: den MEK-ERK-RSK-Weg, den JNK/SAPK-Weg und den p38-Weg [138]. Die intrazellulären Signalwege werden in Abbildung 1-6 gegenübergestellt.

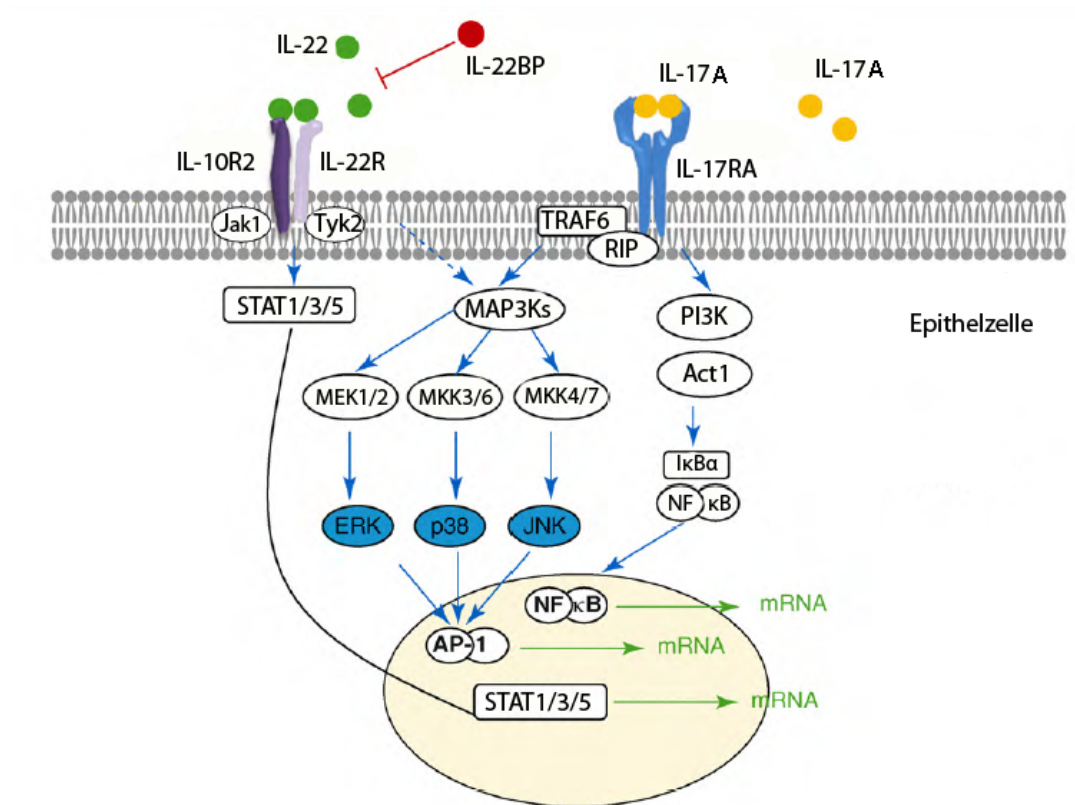


Abb. 1-6 Gegenüberstellung der intrazellulären Signalwege von IL-22 und IL-17A

IL-22 bindet als Homodimer an den IL-22R-Komplex (IL-10R2/IL-22R). IL-22BP fungiert als natürlicher löslicher Antagonist. Der Rezeptorsignalweg induziert die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Jak1 und Tyk2, welche den Transkriptionsfaktor STAT1/3 oder 5 aktivieren (je nach Zelltyp). MAP-Kinasen werden ebenfalls, aber über einen anderen Signalweg aktiviert. IL-17A bindet als Homo- oder Heterodimer an den IL-17RA. Dadurch kommt es zur Aktivierung des Adapterproteins 1 (Act1), sowie TRAF6 und darüber zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. IL-17A induziert gleichermaßen wie IL-22 auch die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK, p38 und JNK). Die Abbildung wurde übernommen aus Eyerich et al., 2010 [139] und modifiziert.

1.1.6.2 Unterschiedliche Effektorfunktionen beider Zytokine

Beide Zytokine besitzen unterschiedliche Funktionen. Beispielsweise besitzt IL-22, im Gegensatz zu IL-17A, nicht die Fähigkeit eine Neutrophilie¹⁷ bei einer pulmonalen Entzündungsreaktion oder die Expression von Chemokinen, die der Anlockung von neutrophilen Granulozyten¹⁸ dienen, zu induzieren [140]. Folgerichtig konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Neutralisation von IL-22, nach adoptivem Transfer von Th17-Zellen und intranasaler Antigengabe, keine Auswirkungen auf die Anzahl der Neutrophilen in den Atemwegen von Mäusen hatte [140]. Die Rolle von IL-17A bei der allergischen Asthma-Reaktion ist jedoch noch nicht genau erforscht. Zum einen korrelierte die IL-17A-Konzentration im Speichel von Asthma-Patienten mit dem Schweregrad der Atemwegshyperreaktion als Reaktion auf Methacholin und der Präsenz von Neutrophilen [141;142]. Zum anderen konnten erhöhte Mengen an IL-17A und IL-17F detektiert werden, die positiv mit dem Schweregrad des Asthmas korreliert waren [143;144].

Während die Produktion von IL-17A meistens durch die Th17-Zell-Aktivierung, ausgelöst von externen (bakteriellen [145] oder Pilz-Infektionen [146]) und internen Stimuli, induziert wird, ist die Regulation der IL-22-Sezernierung im Gewebe schwer zu erfassen. Die IL-22-Produktion ist weitgehend abhängig vom gewebespezifischen Mikromilieu. Die Sekretion von IL-22 zusammen mit proinflammatorisch wirkenden Zytokinen, wie z.B. TNF α , IFN- γ und/oder IL-17A, bewirkt eine dramatische Verstärkung der Entzündungsreaktion, wobei IL-22 alleine eher protektive und regenerative Effekte ausübt [135;147]. Ähnliche synergistisch auftretende Effekte sind auch für IL-17A beobachtet worden [148;149]; im Gegensatz zu IL-22 wirkt IL-17A alleine allerdings proinflammatorisch.

Die zelluläre Quelle des IL-17A beim Asthma bronchiale ist noch unklar, obwohl eine neue Studie gezeigt hat, dass eine signifikante Anzahl von IL-17A-produzierenden Zellen (potenzielle Th17-Zellen) in asthmatischem Lungengewebe gefunden wurde [150]. Des

¹⁷ Neutrophilie = Anstieg der Zahl von neutrophilen Granulozyten im Blut

¹⁸ Neutrophile Granulozyten - kurz Neutrophile genannt - gehören zu den Leukozyten des angeborenen Immunsystems und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt.

Einleitung

Weiteren wurden, im Vergleich zu gesunden Individuen, erhöhte Mengen an Th17-Zellen im peripheren Blut von Asthma-Patienten gefunden. Ebenso scheint es im Zusammenhang mit erhöhten IL-17A-Konzentrationen in den Lungen von Patienten mit starkem Asthma, dass sich die Anzahl von Th17-Zellen in der Lunge und die IL-17A- und IL-22-Konzentrationen im Plasma mit dem Schweregrad der Erkrankung erhöhen [2]. Interessanterweise ist die IL-17A-Expression durch T-Zellen jedoch auf allergisches Asthma beschränkt, im Gegensatz zu nicht-allergischem Asthma [151]. Ob Th17-Zellen für die Entwicklung und die Induktion des Asthmas notwendig sind, bleibt noch umstritten. Paradoxerweise ist in einigen Studien an Maus-Modellen beschrieben worden, dass IL-17A essentiell für die antigenspezifische Antwort in der Lunge für allergisches Asthma ist [152-155] und auch nur eine Studie beschrieb bisher, dass die Gabe von IL-17A in der chronischen Phase im Maus-Modell bewirkte, dass die Th2-Zytokinproduktion, die Eosinophilie und die bronchiale Hyperreaktion reduziert wurden. Diese Studie zeigte also dass IL-17A protektive Effekte bei der Asthma-Reaktion auslöste [156].

2 Zielsetzung

Das Zytokin Interleukin-22 ist von herausragendem Interesse für die Forschung an Atemwegserkrankungen, weil es ein Bindeglied zwischen Zellen des Immunsystems und epithelialen Zellen darstellt. Die Bedeutung von IL-22 für die Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale und die darauf folgenden voranschreitenden Veränderungen des Gewebes wurden lange Zeit unterschätzt. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Zusammenhang zwischen IL-22 und Asthma bronchiale näher zu untersuchen.

Dies sollte zum einen anhand von *in vivo* Experimenten in einem Mausmodell für allergisches Asthma und zum anderen *in vitro* mit einer neuen Bronchialzell-Linie durchgeführt werden.

1. Untersuchung der Funktion von IL-22 in einem Ovalbumin-induzierten Mausmodell für allergisches Asthma durch Verwendung von IL-22-Defizienz und intranasaler Administration von rekombinantem IL-22.
2. Untersuchung der Bedeutung von IL-22 auf die IL-13- und TNF α -induzierte Chemokin-, Zytokin- und Mukusproduktion einer neuen murinen Clara-Zell-Linie als *in vitro* Modellsystem.

3 Material/Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Stimulation von Zellen

3.1.1.1 *Murine Clara-Zell-Linie C22*

Die murine Clara-Zell-Linie C22, generiert aus H-2Kb-tsA58 transgenen Mäusen, stammt von J. Ryerse und D. Demello (St. Louis, USA). Die Mäuse und demnach die Zellen exprimieren das „large tumor antigen“ eines Temperatur-sensitiven Stammes (tsA58) des „simian virus 40“ (SV40) unter der Kontrolle des Interferon- γ (IFN- γ)-induzierbaren H-2Kb-Promotors [157]. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (bestehend aus Natrium-Pyruvat [1 mM] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt mit FCS [3%] (Vitromex, Vilshofen, Deutschland), L-Glutamin [2 mM] (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Penicillin [250,000 U/ml], Penicillin/Streptomycin [250 mg/ml] (beide von Serva, Heidelberg, Deutschland), Amphothericin B [2,5 μ g/ml], Endothelin-1 [0,25 μ g/ml], T3 [20 ng/ml] und Insulin [10 μ g/ml] (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), IFN- γ [0,01 μ g/ml] (R&D Systems, Minneapolis, USA), Transferrin [5 μ g/ml], Endothelium Cell Growth Supplement [7,5 μ g/ml], Epidermal Cell Growth Factor [25 ng/ml] und Hydrocortison [0,36 μ g/ml] (alles von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)) bei 33°C und 10% CO₂ kultiviert.

C22-Zellen wurden, zur anschließenden Reinigung von RNA und der Gesamtzellproteine, in 6-Well Platten (Falcon) in einer Dichte von $0,75 \times 10^6$ Zellen/Well oder in 96-Well Platten (Falcon) in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well, zur Analyse der Zellüberstände durch ELISA, ausgesät und über Nacht in Medium (ohne Zusatz von IFN- γ) bei 39°C inkubiert. Für Western Blot-Analysen wurden die Zellen mit rIL-22¹⁹ [1-100 ng/ml] bzw. rIL-10 [10 ng/ml] (R&D Systems) für 0-30 min. bei 39°C stimuliert.

¹⁹ Rekombinantes murines IL-22 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. B. Becher (Institut für Experimentelle Immunologie, Zürich) kloniert und gereinigt.

Zur Analyse der RNA und der Gesamtproteine wurden die Zellen zunächst für 4 Stunden mit rIL-22 [10-100 ng/ml] vorinkubiert und im Anschluss zusätzlich mit rIL-13 [20-60 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] (beide Zytokine von R&D Systems) bzw. LPS [0,2-100 ng/ml] (aus *Echerichia coli*, Sigma-Aldrich) für die jeweils angegebene Zeitspanne bei 39°C stimuliert. Für IL-22-Neutralisationsexperimente wurde rIL-22 [10-100 ng/ml] mit rIL-22BP [0,1-4 μ g/ml] (R&D Systems) bzw. mit einem monoklonalen anti-Maus IL-22 Antikörper [25 μ g/ml] oder einem IgG Isotyp-Kontrollantikörper [25 μ g/ml] (beide von R&D Systems) für 1 Std. bzw. bei Western-Blot-Analysen für die angegebenen Zeiten bei 39°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den IL-22/IL-22BP- bzw. IL-22/Ak-Komplexen für 4 Std. vorinkubiert und die darauffolgende Stimulation mit rIL-13, rTNF α oder LPS erfolgte wie oben beschrieben.

3.1.1.2 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs)

Das Knochenmark von 6-8 Wochen alten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen wurde aus der Knochenhöhle von Ober- und Unterschenkelknochen mit Hilfe einer 5 ml Spritze und entsprechender Kanüle (0,55 x 25 mm) mit 1xPBS in eine Zellkulturschale isoliert. Die Knochenmarkzellen wurden resuspendiert bis eine homogene Zellsuspension vorlag, diese wurde danach bei 1700 rpm, 3 min bei 4°C zentrifugiert und vorhandene Erythrozyten mit Lyse-Puffer (NH₄Cl [150 mM], KHCO₃ [1mM], EDTA [0,1 mM]) lysiert. Die Vorläuferzellen wurden anschließend in einer Dichte von 3x10⁶ Zellen/Well in 6-Well Platten (Falcon) in DMEM (versetzt mit 5% FCS und 1% L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Penicillin/Streptomycin, GM-CSF (Sigma Aldrich)) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

An Tag 2 und 4 wurde das Medium der Zellen gewechselt, um adhärenente Zellen zu entfernen. An Tag 6 wurden 2-3x10⁶ DCs für RNA-Isolierung mit LPS (100 ng/ml) für 5 Stunden bzw. mit rIL-22 [10-100 ng/ml] und rIL-10 [10 ng/ml] für Western Blot-Analysen, den angegebenen Zeiten entsprechend, bei 37°C stimuliert.

Für die Experimente zur Analyse der Ovalbumin (OVA)-Aufnahme, wurden die BMDCs an Tag 6 in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/Well in einer 96-Well Platte mit rIL-22 [20 ng/ml] und rIL-10 [20 ng/ml] bei 37°C für 3 Std. vorinkubiert und im Anschluss mit OVA-Alexa 647 [10 ng/ml] (Invitrogen) für 30 min. stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium verworfen und die Zellen in Medium ohne Stimuli für 1 bzw. 3 weitere Stunden bei 37°C inkubiert und danach durchflusszytometrisch die OVA-Aufnahme analysiert. Zur weiteren Analyse der Zell-Aktivierung wurden die BMDCs (2×10^5 /Well) mit LPS [100 ng/ml] in An- und Abwesenheit von rIL-22 [20 ng/ml], rIL-10 [20 ng/ml] und rIL-22BP [1 µg/ml] bei 37°C für 24 Std. stimuliert und danach durchflusszytometrisch analysiert.

3.1.1.3 Isolation und Stimulation von Granulozyten, Th2- und Th17-Zellen, Mastzellen und glatten Muskelzellen

Granulozyten

Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen isoliert und mit Hilfe von anti-Ly-6G MicroBeads (Miltenyi Biotech) über MACS-Aufreinigung gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug 90-95%.

Th2-Zellen

Konventionelle CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden aus der Milz von BALB/c-Mäusen mittels positiver Selektion, über MACS-Aufreinigung (Miltenyi Biotec) gemäß den Angaben des Herstellers, isoliert. Für die Generierung der Th2-Zellen wurden die Zellen *in vitro* durch plattengebundene anti-CD3 (Klon: 145-2C11) [3 µg/ml] und anti-CD28 (Klon: 37.51) [10 µg/ml] Antikörper für 3 Tage in Zellkulturmedium RPMI in Anwesenheit von IL-4 [1000 U/ml], IL-6 [100 U/ml] und anti-IFN γ (Klon: XMG1.2) [20 µg/ml] voraktiviert. An Tag 3 wurden die Zellen in Stimulus-freie Wells transferiert, 1:2 verdünnt und für 2 weitere Tage in RPMI mit IL-4 [200 U/ml], IL-6 [100 U/ml] und Proleukin [100 U/ml] kultiviert. An Tag 5 wurden die ausdifferenzierten Th2-Zellen mit anti-CD3 [1µg/ml] Antikörpern für

24 Std. restimuliert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug etwa 100%.

Mastzellen aus dem Knochenmark (BMMCs)

BMMCs wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen isoliert und unter speziellen Bedingungen *in vitro* ausdifferenziert. Sie wurden für 5 Std. mit Ionomycin [1 µM] (Sigma, Saint Louis, USA) stimuliert.

Die oben genannten Zellen wurden im eigenen Institut für Immunologie generiert und nach RNA-Isolierung und reverser Transkription wurde die cDNA zur Analyse der Genexpression verwendet.

Th17-Zellen

Zellen aus den Lymphknoten einer IL-17-Reportermaus [158] wurden isoliert, unter speziellen Bedingungen *in vitro* zu Th17-Zellen ausdifferenziert und mittels FACS-Sorting aufgereinigt. Die Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. A. Waisman (Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Die RNA-Isolierung und die reverse Transkription wurden am eigenen Institut für Immunologie der Universitätsmedizin in Mainz durchgeführt.

Glatte Muskelzellen

Die extrahierte RNA aus glatten Muskelzellen wurde aus der murinen Aorta isoliert und von C. Kuhlmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heiko J. Luhmann (Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte am eigenen Institut für Immunologie.

3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Gesamtzellzahl zu ermitteln, wurden die Zellen in einem bestimmten Volumen Medium aufgenommen, ein Anteil entnommen, mit Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate ausgezählt. Anschließend wurde der Mittelwert

errechnet und dieser mit dem Kammerfaktor (10^4), dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen, in dem die Zellen aufgenommen wurden, multipliziert. Das Ergebnis entspricht der Gesamtzellzahl, die sich in 1 ml Zellsuspension befindet.

3.1.3 Zytotoxizitätstest

Zum Messen der Überlebensrate und Proliferation wurden C22-Zellen (zum einen in einer Gesamtzellzahl/Well von 1×10^7 und zum anderen von 7×10^6) in einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit zwei unterschiedlichen IL-22-Konzentrationen [33 und 100 ng/ml] für 24 Std. bei 39°C inkubiert; als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Zellen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem „Cell Titer96 Aqueous None-Radioactive Cell proliferation Assay“ (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Die Menge des von lebenden Zellen umgesetzten Produkts MTS²⁰-Tetrazolium, welches bei 490 nm in einem SpectraFlourPlus Reader von Tecan (Creilsheim, Deutschland) gemessen wurde, ist direkt proportional zur Stoffwechselaktivität und damit der Vitalität der Zellen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Microsoft® Programms Excel. Der Test ergab, dass weder die Überlebensrate noch die Proliferationsfähigkeit der C22-Zellen von IL-22 beeinflusst wurden.

3.1.4 Intrazelluläre Färbung

Zur Analyse der Lungenzellen wurden aus den Lungen von sensibilisierten und provozierten Wildtyp- bzw. IL-22-defizienten Mäusen und aus provozierten Kontrolltieren Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese mit PMA²¹/Ionomycin und Brefeldin A (alle von Sigma) in einer 96-Well Platte für 4-6 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer (1xPBS, BSA [1%], Na-Azid [0,02%], EDTA [1 mM]) gewaschen und im Anschluss mit Fc-Rezeptor Block-Antikörpern (anti-CD16/CD32 von BD) und spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Oberflächenmoleküle für 15 min. bei 4°C gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm (von BD, Pharmingen) für 20 min. bei 4°C fixiert. Für die folgenden Waschschrritte wurde

²⁰ MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

²¹ PMA (Phorbol 12 Myristate 13 Acetate)

Saponin-Puffer (1xPBS, Saponin [0,1%], BSA [0,5%], Na-Azid [0,05%]) verwendet und die intrazelluläre Färbung wurde mit dem spezifischen Antikörper, in Saponinpuffer verdünnt, wie oben beschrieben durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die verwendeten Antikörper sind unter 3.1.5 aufgeführt.

3.1.5 Durchflusszytometrie / FACS-Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) lassen sich Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Expression ihrer Oberflächenmoleküle analysieren. Nach der unter 3.1.4 beschriebenen Zellbehandlung wurden die Zellen mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern für 15-30 min. bei 4°C in FACS-Puffer (1xPBS, BSA [1%], Na-Azid [0,02%], EDTA [1 mM]) gefärbt, anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und analysiert. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer LSR2; die Ergebnisse wurden mit dem zugehörigen Programm FACS-Diva Software (BD, Pharmingen) ausgewertet und mit der Software FlowJo bearbeitet.

Verwendet wurden folgende Antikörper zur Analyse der zellulären Oberflächenmoleküle von BMDCs (in Klammern steht der zugehörige Klon): CD11c Pacific Blue (N418), CD86 APC (GL1) und CD80 PE (B7-1) (alle von eBioscience, San Diego, USA).

Zur Detektion der Oberflächenmoleküle von Lungenzellen wurden nachfolgende Antikörper verwendet (in Klammern steht der zugehörige Klon): CD45 PerCP (30-F11), CD4 Pacific blue (RM4-5), CD3 PE-Cy7 (17A2), Sca1 PerCP Cy5.5 (D7), GR-1 Pacific blue (RB6-8C5) (alle von Biolegend, San Diego, USA), CD3 Pacific blue (145-2C44), CD4 PE, FITC (GK1.5), TCR $\gamma\delta$ FITC, PE (GL3), CD8 Pe-Cy7 (53-6.7), CD25 PE (PC61), CD44 FITC (IM7), CD11c PE (HL3), NK1.1 PE (PK136), Ly.6G PE (1A8) (alle von BD Biosciences). Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit IL-22 Alexa-Fluor 647 (3F11) (bezogen von Genetech, San Francisco, USA), IFN- γ PE (XMG1.2) und IL-17A Alexa-Fluor 647 (TC11-18H10) (beide von BD, Pharmingen)²².

²² Diese Färbungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. B. Becher durchgeführt.

3.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.2.1 Western Blot

3.2.1.1 Lyse der Zellen

Nach der Stimulation von C22-Zellen und BMDCs mit rIL-22 bzw. rIL-10 (siehe 3.1.1.1 und 3.1.1.2) wurden die Zellen in 250 µl modifiziertem RIPA-Puffer* 15 min. auf Eis lysiert. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung verwendet und das Lysat anschließend mit 1xLDS Ladepuffer (Tris HCl [106 mM], Tris Base [141 mM], LDS [2%], Glycerol [10%], EDTA [0,51 mM], Bromphenolblau [0,22 mM], Phenolrot [0,175 mM]), versetzt mit DTT (Endkonzentration 0,1 M), für 5 min. bei 95°C aufgekocht.

**modifizierter RIPA-Puffer:(Endkonzentration aller Reagenzien 1x)*

NaCl [150 mM], Tris-HCl [50 mM], Na-Desoxycholat [0,25%], NP-40 [1%], PMSF [100 mM], versetzt mit Phosphatase-Inhibitoren: Na-fluorid [50 mM], Na-pyrophosphat-Decahydrat [10 mM], β-Glycerophosphat-Pentahydrat [10 mM], Na-orthovanadat und Protease-Inhibitoren: AEBSF [100 mM], Bestatin [5 mM], E-64 [1,5 mM], Leupeptin H [2 mM].

3.2.1.2 Messung der Proteinkonzentration

Um die Gesamtprotein-Konzentration zu bestimmen, wurden die Zell-Lysate entweder mit Hilfe des BCA-Kits (Novagen) oder des „660 nm Protein Assay“ Kits (Pierce, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers behandelt, ein BSA-Standard mitgeführt und die Gesamtprotein-Menge, nach photometrischer Messung bei 660 nm am SpectraFlourPlus Reader von Tecan (Creilsheim, Deutschland), mit dem Programm Excel ausgewertet.

3.2.1.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE), Wetblot und Detektion

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 12% Acrylamidgel genutzt und 15-30 µg des Zelllysats pro Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine Immobilon-P Membran (PVDF, Porengröße: 0,45 µm, Millipore, Bedford, USA) mit einem Genie Blotter (Idea Scientific Company, Minneapolis, USA) transferiert, mit 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Germany) in 0,1% TBS Tween 20 (TBST) für 30-60 min. geblockt und nach 3 Waschschritten mit 0,1% TBST für 5 min. mit polyklonalem 1°Antikörper über Nacht bei

Material/Methoden

4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 0,1 % TBST für 5 min. wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten 2°Antikörper für 2 Std. bei RT inkubiert, 3 Mal gewaschen, im Anschluss mit dem SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce, Rockford, USA) entwickelt und mit einem BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS System (BioRad, Hercules, USA) analysiert.

Um die aufgetragene Proteinmenge der verschiedenen Zelllysate im Gel zu überprüfen, wurde die Membran für 30 min. bei 56°C in Strip-Puffer (TrisHCl [62,5 mM], SDS [2%] versetzt mit Mercaptoethanol [0,1M]) gestrippt, geblockt und mit einem polyklonalen 1°Antikörper gegen das gesamte Protein bzw. β -Aktin inkubiert. Die Inkubation mit dem 2°Antikörper und die Detektion erfolgten wie oben beschrieben.

Material/Methoden

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tab. 3-1 Verwendete Antikörper zur Detektion von Proteinen für Western Blot-Analysen

1°Antikörper	Quelle	Verdünnung	in
Phospho-STAT3 (Ser727)	Kaninchen	1:500	5% BSA in 0,1% TBST
STAT3	Kaninchen	1:1000	5% BSA in 0,1% TBST
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
SAPK/JNK (56G8)	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
Phospho-ERK1/2 (p44/42) MAP Kinase (Thr201/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
ERK1/2 (p44/42) MAP Kinase	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) (3D7)	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
p38 MAP Kinase	Kaninchen	1:1000	1% BSA in 0,1% TBST
β-Aktin	Maus	1:7000	5% Milchpulver in 0,1% TBST
Anti-Kaninchen IgG, HRP- gekoppelt	Ziege	1:1000	5% Milchpulver in 0,1% TBST
Anti-Maus IgG, HRP gekoppelt	Ziege	1:3000	5% Milchpulver in 0,1% TBST

pSTAT3 wurde von Upstate, (NY, USA), alle weiteren Antikörper von Cell Signaling (Boston, USA) bezogen.

3.2.1 Isolierung und Lyse von Proteinen aus Mausgeweben

Die Organe (Lungen) wurden nach der Entnahme aus der Maus in einem 50 ml Gefäß (Falcon) in Lysepuffer (1 Tablette (Complete Mini Kit, Roche) gelöst in 10 ml 1xPBS, versetzt mit TritonX-100 [0,05%]) mit einem Polytron PT-2100 Homogenisierungsmixer (Kinematica AG) bei max. Geschwindigkeit zerkleinert. Zellreste wurden zentrifugiert und verworfen, die Überstände abgenommen und als Lungenlysate bei -80°C gelagert. Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

3.2.2 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Analysiert wurden Zellüberstände von stimulierten C22-Zellen, Lungenzelllysate und die Bronchoalveoläre-Lavage (BAL) von Mäusen im Asthma-Modell bezüglich ihrer Zytokin- und Chemokinproduktion.

Es wurden folgende DouSets verwendet: CCL17/TARC, TSLP, IL-33 (alle von R&D Systems) und IL-22 (Antigenix America Inc., USA). Die ELISAs wurden gemäß den Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt.

Zur Detektion wurde das Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (Sigma) genutzt. Nach Zugabe von 2M H₂SO₄ wurde die optische Dichte bei 450 nm an einem SpectraFlourPlus Reader von Tecan gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Microsoft® Programms Excel.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Lungenlysaten

Zuerst wurden adhärenente Zellen direkt im Well einer Zellkulturplatte und nicht-adhärenente Zellen nach Zentrifugation in 1 ml Trizol (Invitrogen) lysiert. Die Lungen wurden mit einem Polytron PT-2100 Homogenisierungsmixer (Kinematica AG) bei max. Geschwindigkeit in einem 50 ml Gefäß (Falcon) in 1 ml Trizol zerkleinert und lysiert, Gewebereste zentrifugiert und die Überstände in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zell- und Lungenlysate wurden im Anschluss bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben wurden 200 µl Chloroform (Roth) zugegeben, gevortext und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 11.500 rpm in einer Mikrozentrifuge bei 4°C zentrifugiert, im Anschluss die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde mit 500 µl Isopropanol (Roth) gefällt, die Proben gevortext und nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde für 10 min. bei 11.500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 75% EtOH (Ethanol (Roth) verdünnt in DEPC-Wasser) gewaschen. Nach Zentrifugation bei 9.000 rpm bei 4°C wurde der Waschschrift wiederholt und die Proben im Anschluss bei -80°C weggefroren. Anschließend wurden die Proben einmal bei 9.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Dann wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser (Gibco) gelöst, bei 55°C für 10-15 min. im Heizblock inkubiert, gevortext und die RNA-Konzentration gemessen.

Alle Arbeitsschritte wurden mit RNase-freien Materialien und DEPC-Wasser durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA

Von den RNA-Proben wurden 3 µl in einem Biophotometer (Eppendorf) mit einer Mikroküvette (1 mm Deckel) hinsichtlich der Konzentration und Reinheit bei 260/280 und 230/260 nm gemessen. Die RNA wurde anschließend auf 1 µg RNA eingestellt, die für die reverse Transkription bzw. den vorherigen DNase-Verdau eingesetzt wurde.

3.3.3 Reverse Transkription

Zunächst wurde bei RNA aus Geweben ein DNase-Verdau (Deoxyribonuclease I-Kit, Invitrogen) durchgeführt. Es wurde folgender Ansatz gemäß des Herstellerprotokolls angewendet:

Tab. 3-2 Reaktionsansatz für einen DNase-Verdau

Reagenzien:	Einfach-Ansatz:
RNA (Probe)	1 µg
10x DNase I Reaktionspuffer	1 µl
DNase I	1 µl
DEPC-H ₂ O	auffüllen auf 10 µl

Nach 15-minütiger Inkubationszeit der DNase I bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1 µl EDTA [25 mM] pro Probe gestoppt. Die DNase-Inaktivierung fand bei 65°C im Heizblock für 10 min. statt. Anschließend wurde die, von genomischer DNA-Kontamination gereinigte, RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Bei RNA, die aus Zellen der Zellkultur isoliert wurde, war ein vorheriger DNase-Verdau nicht nötig.

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein Mastermix (siehe Tab. 3-3) allen Proben zugegeben und diese dann bei 42°C im Heizblock für 1 Std. inkubiert.

Mastermix: (alle Reagenzien von Fermentas)

Tab. 3-3 Reaktionsansatz zur Umschreibung von RNA in cDNA (reverse Transkription)

Reagenz	Einfach-Ansatz
d(NTPs) [10 mM]	2 µl
Oligo d(T) _n [100 µg/ml]	1 µl
Poly (N) ₆ [20 ng/µl]	1 µl
Reaktionspuffer [5x]	4 µl
RNA [1 µg]	11 µl
Reverd Aid M-MuLV Reverse Transkriptase [200U/µl]	1 µl
Summe	20 µl

Anschließend wurden die Proben 1:5 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4 Real-time Polymerase Kettenreaktion

Die Expressionslevel verschiedener Zytokine und Chemokine wurden mittels quantitativer Real-time PCR (auch qRT-PCR genannt) ermittelt. Zur Amplifikation der cDNA des Ziel- und Referenzgens wurden zwei Detektionssysteme verwendet: zum einen ein nicht-spezifisches Detektionssystem mit dem Farbstoff SYBR Green und zum anderen ein spezifisches Detektionssystem mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligonukleotiden (Sonden). Es wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

SYBR Green Real-time PCR

Tab. 3-4 Reaktionsansatz für SYBR Green Real-time PCR

Einfach-Ansatz	Reagenz
12,5 µl	SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)
1 µl	Primer (SP + ASP) [5 pMol/µl]
2,5 µl	cDNA (von 1 µg RNA)
9 µl	DNase-freies Wasser
25 µl	Summe

Tab. 3-5 Programm für SYBR Green Real-time PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	57-60°C	30 sec	50
Elongation	72°C	1 min	

Der Denaturierung geht ein Konfigurationsschritt voraus:

- Hot Start Polymerase-Aktivierung für 15 min. bei 95°C

TaqMan-Sonden Real-time PCR

Tab. 3-6 Reaktionsansatz für TaqMan-Sonden Real-time PCR

Einfach-Ansatz	Reagenz
12,5 µl	TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)
1,25 µl	TaqMan Gene Expression Assay Mix (20x)
11,25 µl	cDNA (von 100 ng/µl RNA)
25 µl	Summe

Alle Reagenzien stammen von Applied Biosystems.

Tab. 3-7 Programm für TaqMan-Sonden Real-time PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	15 sec	
Primeranlagerung	60°C	1 min	50
Elongation	72°C	1 min	

Der Denaturierung gehen zwei Konfigurationsschritte voraus:

- UNG Aktivierung für 2 min. bei 50°C
- Haltezeit der Reaktion für 10 min. bei 95°C

Es wurden entweder Duplikate oder Triplikate jeder Probe analysiert. Die Reaktion fand in einer 96-Well Platte (Thermo Scientific) mit 25 µl Volumen/Well in einem iCycler (Biorad)

Material/Methoden

statt. Die relative mRNA-Expression wurde auf das Referenzgen normalisiert und mit Hilfe der Biorad Software iQ5 wurden die Expressionslevel mit der Δ/Δ^{CT} -Methode ausgewertet.

Die nachfolgenden Primer wurden verwendet:

Tab. 3-8 Verwendete Primer für Real-time PCR

Primer	Sequenz	T _a
mCCL26/Eotaxin-3 SP	GCTTCTATTCTGCTGCTCACGG	59°C
mCCL26/Eotaxin-3 ASP	CACTTCTTCTTGGGGTTCAGCACAG	
mIL-33 SP	CAAAGTTCAGCAGCACCGCA	58°C
mIL-33 ASP	CCCGTGGATAGGCAGAGAAGTT	
mIL-17A SP	GCCCTCAGACTACCTCAACCGT	60°C
mIL-17A ASP	CCAGCTTTCCCTCCGCATT	
mIL-17E SP	GCCCCAGCAAAGAGCAAGAA	57°C
mIL-17E ASP	ACACACACACAAGCCAAGGAGACT	
mCCL17/TARC SP	AGA CAG GCA GAA GGA CCC ATG AAG	60°C
mCCL17/TARC ASP	TAA TCC AGG CAG CAC TCT CGG C	
HPRT SP	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G	57-60°C
HPRT ASP	GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT	
GAPDH SP	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG	57-60°C
GAPDH ASP	TTT CTC GTG GTT CAC ACC C	

Angegeben sind die Primernamen (Sense- und Antisense-Primer), die Sequenzen von 5' nach 3'-Richtung und die Anlagerungstemperatur (T_a).

Alle verwendeten synthetischen Primer wurden mit Hilfe des Vector NTI Programms erstellt und von der Firma Thermo Science bezogen. Sie wurden in 1xTE-Puffer (EDTA [0,5 M], Tris [1M], pH 8) zu einer Stocklösung von 100 pMol/µl gelöst und für den PCR-Ansatz in DNase-freiem H₂O verdünnt, so dass die Endkonzentration bei der qRT-PCR 5 pMol/µl betrug.

Die nachfolgenden TaqMan-Sonden wurden verwendet:

Tab. 3-9 Verwendete TaqMan-Sonden für Real-time PCR

Sonde	Bezeichnung
HPRT1	Mm00446968_m1
mTSLP	Mm00498739_m1
mIL-22	Mm00444241_m1*
mCLCA3	Mm00489959_m1*

Angegeben sind die Bestellnummern der einzelnen Sonden bei Applied Biosystems.

Alle Genexpressions-Assays haben einen FAMTM (6-Carboxy-Fluorescein)-Reporterfarbstoff am 5`-Ende der Sonde und einen nicht-fluoreszierenden Quencher am 3`-Ende.

3.3.5 Konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die konventionelle PCR wurde an einem Cycler Peqstar 96 Universal (Peqlab) durchgeführt und es wurden entweder eine Platinum Polymerase (Invitrogen) oder eine Go Taq Polymerase (Promega) verwendet. Die jeweiligen Endkonzentrationen an PCR-Puffer, dNTPs [2,5 mM] und MgCl wurden nach Angaben des Herstellers zusammengestellt. Die Primer wurden zugegeben, so dass sie in einer Endkonzentration von 10 pMol/µl vorlagen.

Die amplifizierte DNA wurde mittels Agarose Gelelektrophorese (mit Zusatz von 1-3 µl Ethidium-Bromid [10 mg/ml]) gemäß ihrer Größe aufgetrennt und mit einem BioRad Molecular Imager GelDoc XRS System detektiert.

Material/Methoden

Folgende Primer wurden für die Expressions-Analysen verwendet:

Tab. 3-10 Verwendete Primer für konventionelle PCR

Primer	Sequenz	T_a
mIL-22 SP	CCA GCC TTG CAG ATA ACA AC	60°C
mIL-22 ASP	GGA AGG AGC AGT TCT TCG T	
mIL-22R SP	ACA GCT GCC CTG CTT CTT AT	60°C
mIL-22R ASP	ATT TGG GAG TGG AGA GGA TG	
mIL-10R1 SP	GTGGATAGCGTGACTCTGAAAGCA	57°C
mIL-10R1 ASP	TGAAATACTGCTCCGTCGTGATAAG	
mIL-10R2 SP	CGT GGA AGA CAC CAT CAT TG	57°C
mIL-10R2 ASP	TGG TCG AGA AGA AAC CCT TG	
mrIL-22BP SP	GCT GTA TTA CGG GAG GGT GA	57°C
mrIL-22BP ASP	CAA CTC TGG AGG ACG GAG AA	
GAPDH SP	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG	57-60°C
GAPDH ASP	TTT CTC GTG GTT CAC ACC C	

Angegeben sind die Primernamen (Sense- und Antisense-Primer), die Sequenzen von 5' nach 3'-Richtung und die Anlagerungstemperatur (T_a).

3.4 Methoden mit Tieren

3.4.1 Verwendete Mäuse

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universitätsklinik Mainz gezüchtet.

C57BL/6 IL-22-defiziente (IL22^{-/-}) Mäuse wurden in eigener Zucht gemäß den offiziellen Richtlinien gehalten. Die IL-22-defizienten Zuchttiere wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. von Stebut-Borschitz (Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz) bezogen.

Transgene ROR γ -eYFP-Mäuse wurden freundlicherweise von A. Diefenbach zur Verfügung gestellt und an der Universität in Zürich gezüchtet.

Für die Experimente wurden Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet.

3.4.2 Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin

Wildtyp- und IL-22-defiziente Mäuse wurden sensibilisiert, indem ihnen an Tag 0 und 14 jeweils 20 μ g des Modellantigens OVA, eingestellt mit 2,25 mg Aluminiumhydroxid (Imject Alum, Pierce, USA) in 100 μ l, intraperitoneal injiziert wurde. 14 Tage nach der letzten Sensibilisierung, wurden die Mäuse für je 20 min. an 3 aufeinanderfolgenden Tagen gegenüber vernebeltem OVA [1% in 1xPBS] unter Verwendung eines Ultraschallverneblers (NE-U17, Omron, Hoofddorp, Niederlande) exponiert. Kontrollmäuse wurden nicht sensibilisiert, sondern nur gegenüber dem Allergen exponiert. 24 bzw. 48 Std. nach der letzten OVA-Provokation wurde die Atemwegsüberempfindlichkeit gemessen. Anschließend wurde die Bronchoalveoläre Lavage durchgeführt und das Lungengewebe für die spätere histologische Aufarbeitung in Formalin fixiert bzw. wurden die Lungenflügel so aufgeteilt, dass entweder RNA und Proteine daraus isoliert werden oder die Lungenzellen für die durchflusszytometrische Messung analysiert werden konnten.

In einigen Experimenten wurde den vorher mit Ketamin-ratiopharm®/Rompun [2%] narkotisierten Wildtyp-Mäusen eine Stunde vor der OVA-Provokation 0,1 μ g, 1 μ g oder 10 μ g rekombinantes IL-22 intranasal zugeführt.

3.4.3 Lungenfunktionsmessung

Der Lungenwiderstand wurde mittels invasiver Messung an narkotisierten, tracheostomiert (mit einer 18G Kanüle) und mechanisch beatmeten Mäusen mit einem computergesteuerten Kleintierbeatmungsgerät (FlexiVent-System, Scireq, Montreal, Kanada) nach inhalativer Gabe von ansteigenden Mengen [6,25; 12,5; 25; 50 und 100 mg/ml] Methacholin ermittelt. Als Basiswert diente die Lungenfunktionsgröße nach Verneblung mit 1xPBS. Nach jeder inhalativen Dosis wurde der Atemwegswiderstand alle 10 Sekunden über einen Zeitraum von 3 min. erfasst. Der jeweils größte Wert des Lungenwiderstands, relativ zu den Basiswerten, wurde gewählt, um den Effekt zu quantifizieren. Dadurch ließ sich die Atemwegsreaktivität anhand einer Dosis-Wirkungskurve bestimmen. Diese wurde mit Hilfe des Microsoft® Programms Excel erstellt²³.

3.4.4 Zytospinpräparate und Lungenhistologie

Nach der Messung des Lungenwiderstands erfolgte eine Bronchoalveoläre Lavage. Dabei wurde 1 ml 1xPBS mit einer 1 ml Spritze durch eine Trachealkanüle in die Trachea hineingegeben und sofort wieder entnommen. Die Gesamtzellzahl, die sich in der entnommenen Lösung befand, wurde danach, wie unter 3.1.2 beschrieben, ermittelt. Zur Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen, wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und mit einem Microscopy Hemacolor ®-Kit (Merck, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. An einem „All-in-one Type“ Fluoreszenz Mikroskop (BZ-Analyzer, Keyence Corporation, Japan) wurden die Zytospinpräparate fotografiert und analysiert. Es wurden insgesamt 200 Zellen ausgezählt und die absolute Zellzusammensetzung der BAL anschließend mit dem Microsoft® Auswerteprogramm Excel erstellt.

Nachdem die BAL entnommen war, wurde daraufhin die Lunge aus jeder Maus präpariert. Diese wurde dann in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Präparaten wurden etwa 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit den Farbstoffen

²³ Messung und Auswertung des Atemwegswiderstands wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. C. Taube (Pneumologie der Universitätsmedizin in Mainz) durchgeführt.

Hämatoxylin/Eosin (HE) und Periodsäure-Leukofuchsin (PAS) angefärbt. Eosin ist ein Farbstoff, der alle azidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot anfärbt, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA. Am Mikroskop wurden die Schnitte anschließend analysiert und fotografiert.

Die peribronchiale²⁴ Entzündung wurde anhand der Schnitte analysiert und mittels semiquantitativer Beurteilung ausgewertet. Die Beurteilung erfolgte hierbei von 0-4, wobei 0 für keine sichtbare Entzündung steht und 1-4 gemäß des Schweregrads der Entzündung gewertet wurde. Es wurden stichprobenartig fünf unterschiedliche Bereiche der Gewebeschnitte ausgewählt und analysiert.

Die Anzahl von Becherzellen wurde durch Auszählung der PAS-positiven Zellen unter dem Mikroskop festgelegt.

3.4.5 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardfehler einer Probe angegeben. Verwendet wurde der gepaarte T-Test bzw. der One-Way ANOVA-Test bei normal verteilten Daten. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

²⁴ peribronchial = Bereich um die Bronchien

4 Ergebnisse

Seit der Entdeckung des Zytokins IL-22 (im Jahr 2000 [63]), wurde immer mehr über seine Rolle bei Entzündungen und Infektionen bekannt. Es stellte sich heraus, dass IL-22 ein Schlüsselprotein bei der antimikrobiellen Abwehr, der Regeneration und der Protektion bei Gewebeschädigung ist. Aktuelle Publikationen zeigen, dass das Zytokin in Mäusen sowohl eine entzündungsfördernde (u.a. bei Hauterkrankungen, wie Psoriasis [98] oder bei Arthritis [159]) als auch entzündungshemmende (u.a. bei entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis [80;160], entzündlichen Lebererkrankungen, wie Hepatitis [161] oder bakteriellen Infektionen [162;163]) Funktionen ausüben kann. Diese duale Rolle des IL-22 bewirkt also entweder protektive oder pathogene Effekte, abhängig vom Gewebemilieu [133].

In dieser Arbeit soll die Funktion und Wirkungsweise des IL-22 im Asthma bronchiale mit Hilfe eines Mausmodells und einer murinen bronchialen Epithelzell-Linie näher analysiert werden.

Die *in vivo* Studien für allergische Atemwegshyperreaktivität (AHR) im Mausmodell wurden in Kooperationen mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. C. Taube aus der Pneumologie der Universitätsmedizin in Mainz und mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. Becher vom Institut für Experimentelle Immunologie in Zürich durchgeführt.

4.1 IL-22-Effekte bei Mäusen im Asthma-Modell

Um den Einfluss von IL-22 im Mausmodell zu prüfen, wurden IL-22-defiziente Mäuse, denen das Gen für IL-22 fehlt, mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verglichen. In weiteren Versuchen wurde die Wirkung der Gabe von exogenem rekombinanten IL-22 (rIL-22) auf Wildtyp-Mäuse untersucht.

Das hierbei verwendete Asthma-Modell beinhaltet zwei Sensibilisierungsschritte, gefolgt von einer Provokationsphase (siehe Abb. 4-1). Bei der Sensibilisierung wird den Mäusen Ovalbumin als Modellantigen, gemischt mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum), zur Verstärkung des Effekts, in den Bauchraum (intraperitoneal) gespritzt. Die nachfolgende Provokation mit dem Modellantigen erfolgt über Verneblung, wodurch die Mäuse das OVA über die Atemwege aufnehmen. Auf diese Weise wird eine allergische Atemwegsüberempfindlichkeit in den Lungen der Mäuse induziert, die als Modell für allergisches Asthma bronchiale anerkannt ist.

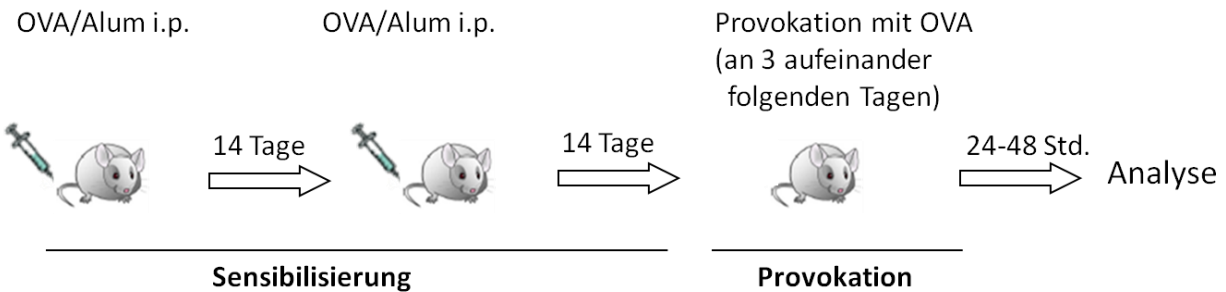


Abb. 4-1 Asthma-Modell mit Ovalbumin als Modellallergen

Sensibilisierung: Im Abstand von 2 Wochen wurde den Mäusen 20 µg des Antigens Ovalbumin (OVA), gemischt mit 2,25 mg des Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum), in 100 µl Gesamtvolumen intraperitoneal (i.p.) gespritzt. 2 Wochen nach der 2. Sensibilisierung folgte eine 20-minütige Provokation mit vernebeltem OVA (1% in PBS) an 3 aufeinander folgenden Tagen. 24 bzw. 48 Stunden danach erfolgte die Analyse der Mäuse.

Ergebnisse

4.1.1 Erhöhte IL-22-Expression nach induzierter Asthma-Reaktion

Gemäß des unter 4.1 beschriebenen Asthma-Modells, wurden zunächst Wildtyp (WT)-Mäuse sensibilisiert und provoziert (sens/prov). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nicht sensibilisiert sondern nur inhalativ provoziert (prov) wurden. Die Lungengewebszellen wurden anschließend auf die Expression von IL-22 und des spezifischen IL-22-Rezeptors (IL-22R) analysiert.

Verglichen mit den Kontrollmäusen war im gesamten Lungengewebe der sens/prov-Mäuse eine erhöhte IL-22 mRNA-Expression zu sehen (Abb. 4-2 A), was durch die Untersuchung der relativen IL-22-Expression mittels quantitativer (q)RT-PCR (Abb. 4-2 B) bestätigt wurde. Erhöhte IL-22-Konzentrationen konnten ebenfalls in der BAL der Mäuse festgestellt werden (Abb. 4-2 C). Die IL-22R mRNA-Expression dagegen war bei beiden Gruppen etwa gleich stark (Abb. 4-2 A, B), was darauf hindeutet, dass der IL-22-Rezeptor unabhängig vom Entzündungszustand des Lungenepithels exprimiert wird.

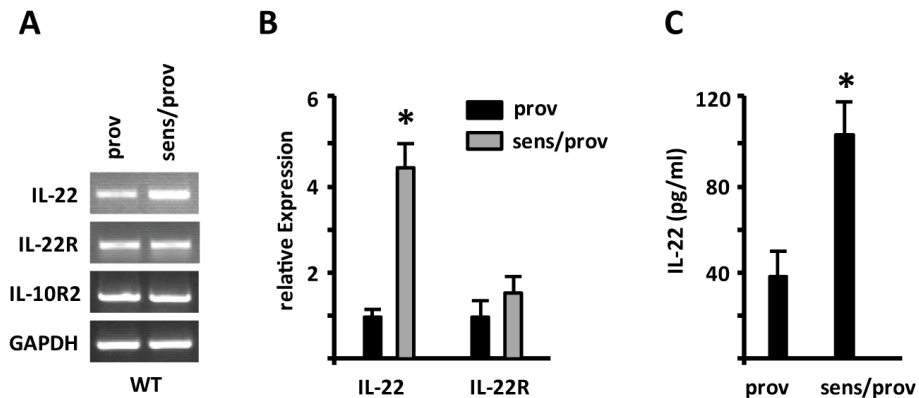


Abb. 4-2 IL-22-Expression nach induzierter Entzündungsreaktion in den Atemwegen von WT-Mäusen

(A, B) IL-22- und IL-22R-Expression in Asthma-induzierten WT-Mäusen im Lungengewebe von provozierten (prov, n=6) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov, n=6) Mäusen. 24 Std. nach der letzten Provokation mit OVA wurde die gesamte Lungen-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern die Genexpression von IL-22 und IL-22R mittels (A) PCR und (B) real-time PCR analysiert. Als Ladekontrolle in (A) diene GAPDH und die relative Expression wurde auf die GAPDH-Expression der WT Kontrolltiere (prov) normalisiert (B).

(C) IL-22-Konzentration in der BAL, 48 Std. nach letzter OVA-Provokation, von provozierten (prov, n=6) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov, n=6) Mäusen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu provozierten Kontrolltieren.

4.1.2 IL-22-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Atemwegshyperreaktion und Entzündung der Atemwege

Da Wildtyp-Mäuse als Folge der Sensibilisierung mit dem Modellantigen und anschließender OVA-Provokation eine erhöhte Menge an IL-22 produzierten (siehe Abb. 4-2 A-C), sollte als nächstes die Rolle des IL-22 bei der Entwicklung der AHR und Entzündung der Atemwege untersucht werden. Dazu wurden IL-22-defiziente-Mäuse und Wildtyp-Mäuse entweder sensibilisiert und provoziert (sens/prov) oder nur inhalativ provoziert (prov) und anschließend einer Lungenfunktionsmessung unterzogen. Dabei wird der Lungenwiderstand abhängig von der inhalierten ansteigenden Methacholindosis (6 bis 100 mg/ml) 48 Std. nach der letzten OVA-Provokation gemessen. Die Methacholinprovokation bewirkt die Stimulation der glatten Muskulatur und induziert eine Obstruktion der Atemwege. Diese bronchiale Hyperreaktivität lässt sich durch einen Anstieg des Atemwegswiderstands nachweisen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sensibilisierte und provozierte IL-22-defiziente Mäuse (IL-22^{-/-} sens/prov) eine signifikant höhere Zunahme des Lungenwiderstands als Reaktion auf steigende Methacholinkonzentrationen aufwiesen, verglichen mit den sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Mäusen (WT sens/prov) (Abb. 4-3 A). Bei den Kontrolltieren, die nur provoziert wurden (IL-22^{-/-} und WT prov), waren die Unterschiede des Lungenwiderstands nicht nachweisbar. Dieses Gesamtergebnis weist darauf hin, dass IL-22 bei der AHR eine entzündungshemmende Wirkung auf das Lungenepithel ausübte und dass der protektive Effekt während der Sensibilisierungsphase auftrat.

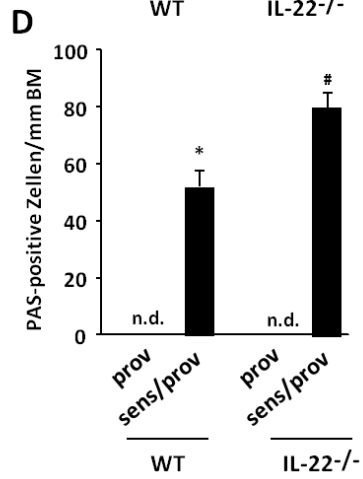
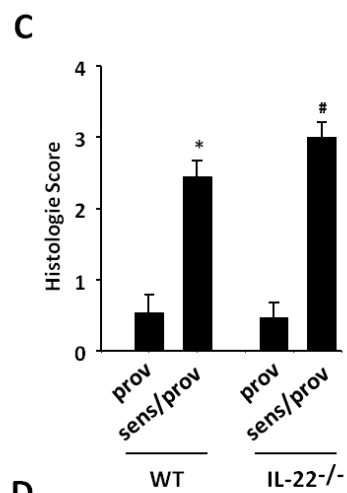
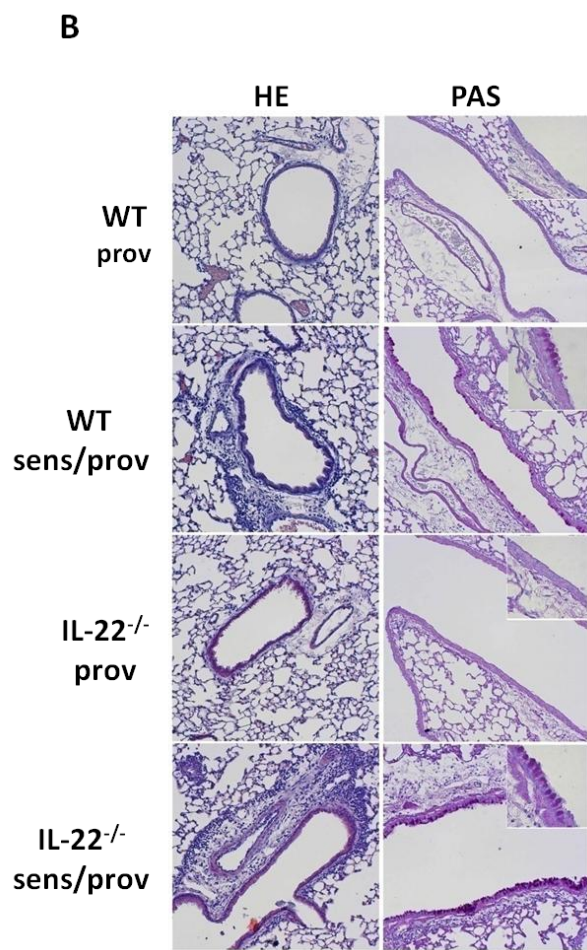
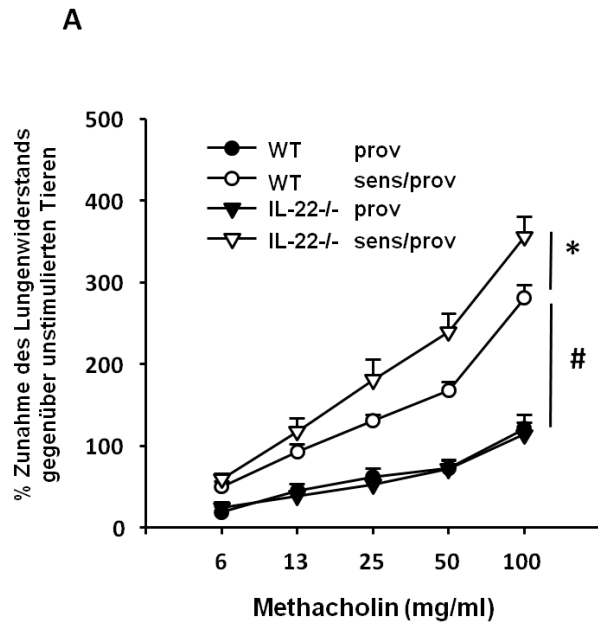
Vergleicht man nun die Zellen aus der BAL der verschiedenen Gruppen unter dem Mikroskop, ist deutlich zu erkennen, dass die Gesamtzellzahl in den IL-22^{-/-} (sens/prov) Mäusen signifikant höher war als in den WT (sens/prov) -Mäusen (siehe Abb. 4-3 E). Unter dem erhöhten Einstrom an Zellen zum Entzündungsort befanden sich vermehrt Neutrophile, T-Lymphozyten und Eosinophile (siehe Abb. 4-3 E). Die Anzahl dieser Zellpopulationen war in den IL-22-defizienten Mäusen ebenfalls signifikant erhöht, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. In den gesunden Kontrolltieren (prov) konnten fast ausschließlich Alveolarmakrophagen als Hauptzellpopulation ausgemacht werden. Die

Ergebnisse

mikroskopischen Aufnahmen zeigen die BAL-Zellen (Abb. 4-3 F). In der Vergrößerung (rechte Bildreihe) lassen sich die Eosinophilen anhand ihrer Morphologie erkennen (mit Pfeilen markiert).

Anschließend wurden die Lungen der Versuchstiere isoliert und histologisch untersucht. Dazu wurden Lungenschnitte angefertigt, die nach Hämatoxylin/Eosin (HE)- und Periodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Färbung analysiert wurden. Die HE-Färbung dient dabei der Erkennung der Zellmorphologie, während die PAS-Färbung für das Erkennen von Substanzen aus dem Mukus angewendet wird (in diesem Fall aktive Clara-Zellen, die zu Mukus-produzierenden Becherzellen transformiert sind). Die Analyse der Lungenschnitte zeigte eine stärkere Färbung des Gewebes (insbesondere die Bronchiolen) der IL-22^{-/-}-sens/prov Mäuse, im Vergleich zu den Kontrolltieren (IL-22^{-/-} prov) (siehe Abb. 4-3 B). Dies lässt auf eine vermehrte Anzahl an Becherzellen und demnach auf eine stärkere Entzündung der Atemwege schließen. Nun wurde eine semiquantitative Beurteilung der Gewebeschnitte durchgeführt, wodurch der Schweregrad der Entzündung festgestellt werden kann (beschrieben im Methodenteil unter 3.4.4). Dabei und bei der Auszählung der schleimproduzierenden Becherzellen (Abb. 4-3 C und D) bestätigten sich die zuvor in den histologischen Schnitten beobachteten Ergebnisse, dass die IL-22-defizienten Tiere eine stärkere Entzündung und eine erhöhte Anzahl an Becherzellen aufwiesen, verglichen mit den Wildtyp-Tieren.

Ergebnisse



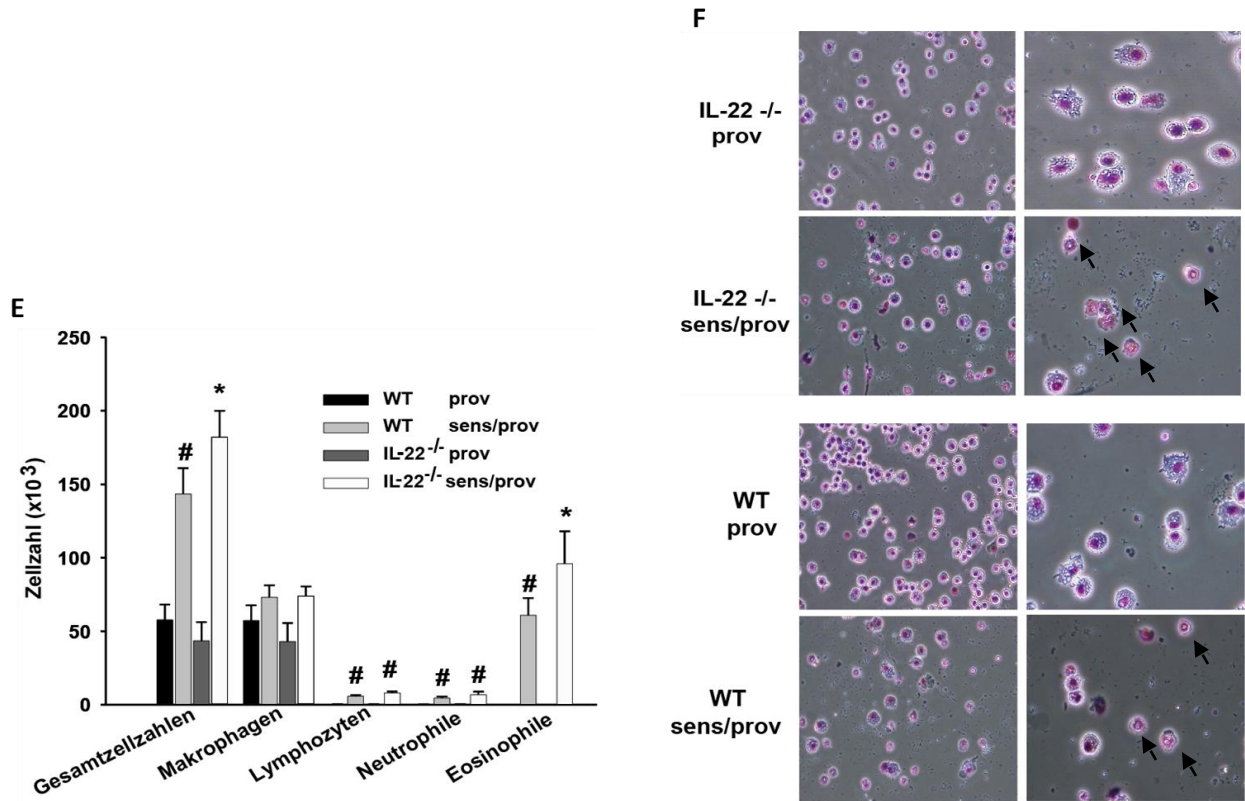


Abb. 4-3 IL-22^{-/-} Mäuse entwickeln eine erhöhte AHR und Entzündung der Atemwege

(A) Messung des Atemwegwiderstands von provozierten (prov, n=12) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov, n=13) IL-22^{-/-} und WT-Mäusen (sens/prov, n=12, prov, n=13). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler von jeweils 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. #p<0,01 (IL-22^{-/-} und WT sens/prov verglichen mit den Kontrolltieren IL-22^{-/-} und WT prov), *p<0,05 (IL-22^{-/-} sens/prov verglichen mit WT sens/prov).

(B) Histologie des Lungengewebes 48 Std. nach der letzten OVA-Provokation von provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) IL-22^{-/-} und WT-Mäusen. Zur Analyse der Zellmorphologie wurden die Lungenschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt. Eine weitere Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS) diente der Färbung von schleimproduzierenden Becherzellen.

(C, D) Histologie-Auswertung von provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) IL-22^{-/-} und WT-Mäusen. Jeweils 12 Tiere pro Gruppe wurden analysiert. In (C) ist das Lungengewebe anhand eines „Scoring“ zur Bestimmung des Schweregrads des entzündeten Lungengewebes dargestellt, wobei ein Ranking von 0-4 durchgeführt wurde. 0 steht für gesundes Gewebe und 1-4 für mittlere bis schwere Schädigung des Gewebes. Es wurden 5 unterschiedliche Ausschnitte der Gewebeproben stichprobenartig ausgewertet. In (D) ist die Anzahl der Becherzellen (PAS positiv gefärbt) pro mm der Basalmembran (BM) angegeben. Diese wurden optisch unter dem Mikroskop ausgezählt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. *p<0,01 (verglichen mit den Kontrolltieren WT prov und IL-22^{-/-} prov), #p<0,05 (verglichen mit allen anderen Gruppen).

(E) Angabe der Gesamtzellzahl und Zellzahlen der einzelnen Zellpopulationen in der BAL. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. #p<0,05 (verglichen mit WT und IL-22^{-/-} prov), *p<0,05 (verglichen mit allen anderen Gruppen). (F) Mikroskopische Bildausschnitte von Zellen aus der BAL von provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) IL-22^{-/-} und WT-Mäusen (linke Bildreihe Übersicht, rechte Bildreihe vergrößerter Ausschnitt, Pfeile markieren Eosinophile).

4.1.3 IL-22-Defizienz führt zur erhöhten Expression Asthma-assoziiierter Mediatoren

Nach der Analyse der Atemwegsfunktionen, der Atemwegshistologie und der Zellpopulationen im Entzündungsbereich von sensibilisierten und provozierten IL-22-defizienten Mäusen, wurde im Folgenden die Expression und Sekretion Asthma-relevanter Proteine mit Hilfe von qRT-PCR und ELISA untersucht.

Verglichen mit den WT (sens/prov) –Mäusen, konnte in den IL-22-/- (sens/prov) Mäusen eine deutlich höhere Expression von CCL17, IL-13, Gob5 und Eotaxin3 festgestellt werden (Abb. 4-4 A). Eine erhöhte Expression lässt sich für CCL17 und IL-13 auch auf Proteinebene bestätigen (Abb. 4-4 B). Weiterhin zeigte sich, dass die IL-33-Produktion bei den sensibilisierten und provozierten Tieren beider Gruppen signifikant erhöht war, verglichen mit den Kontrollmäusen. Eine signifikant höhere TSLP-Produktion war nur bei sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Mäusen (WT sens/prov), im Vergleich zu den provozierten Mäusen (prov), zu detektieren.

Ergebnisse

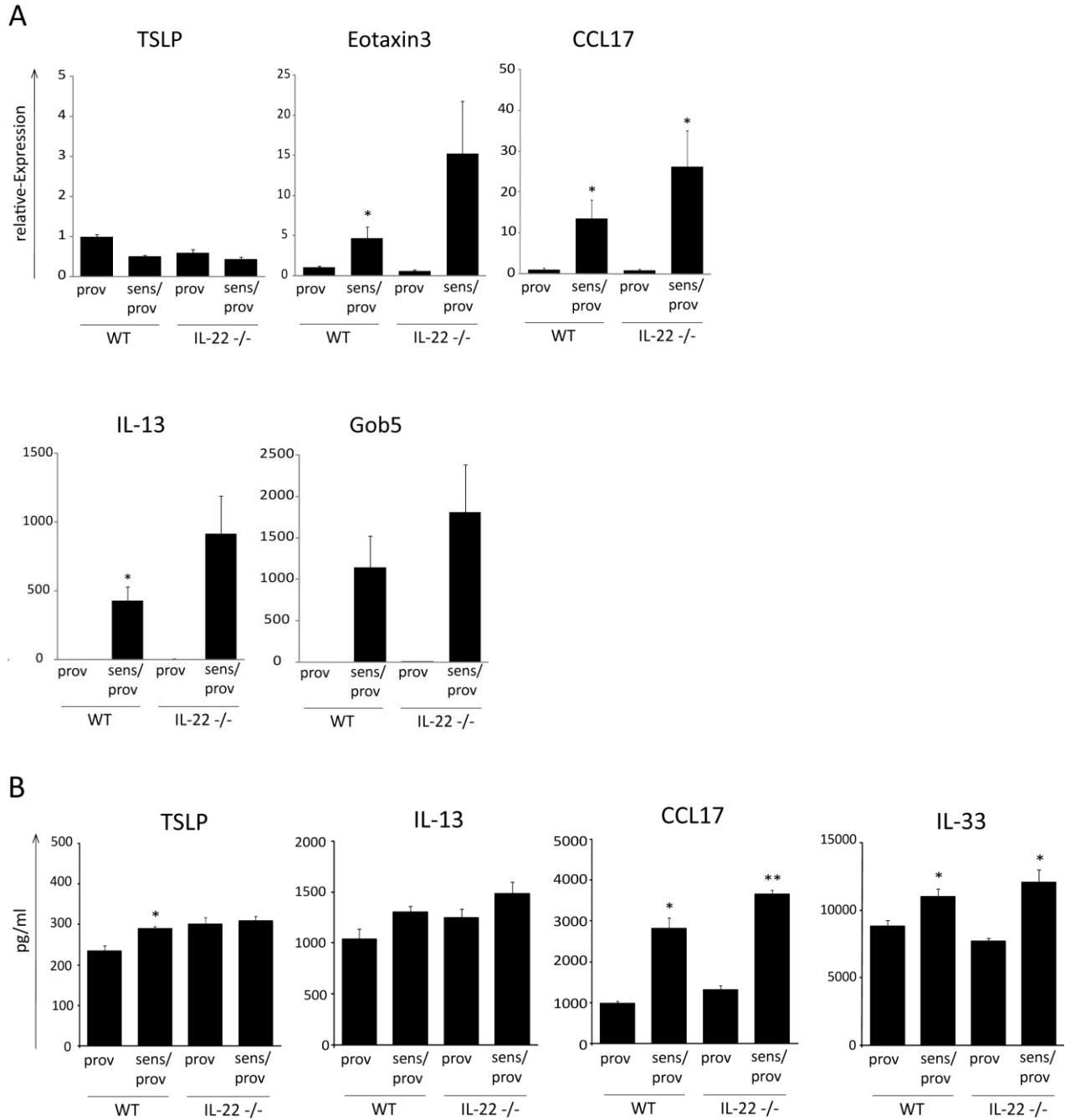


Abb. 4-4 Erhöhte Expression von Asthma-relevanten Proteinen in IL-22-defizienten Mäusen

(A) Relative Expression (ermittelt durch qRT-PCR) bzw. (B) Produktion (ermittelt durch ELISA) von IL-13, CCL17, TSLP, Eotaxin3, Gob5 und IL-33 in Lungengewebe von sensibilisierten und provozierten IL-22-defizienten (IL-22^{-/-} sens/prov, n=5) und WT-Mäusen (WT sens/prov, n=5) und nur provozierten Mäusen (IL-22^{-/-} und WT prov, jeweils n=5). 24 Std. nach der letzten Provokation mit OVA wurde die gesamte Lungen-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern die Genexpression der Zytokine und Chemokine analysiert.

Die relative Expression wurde auf die GAPDH-Expression der WT Kontrolltiere (prov) normalisiert.

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. *p<0,05 (sens/prov verglichen mit den jeweiligen Kontrolltieren (prov) der Gruppe), **p<0,05 (IL-22^{-/-} sens/prov verglichen mit WT sens/prov).

Ergebnisse

Des Weiteren wurden die Lungenzellen der WT- und IL-22^{-/-} Mäuse auf ihre Expression der Th2-Zytokine IL-5 und IL-4, sowie des Th17-Zytokins IL-17A, mit Hilfe der Durchflusszytometrie, analysiert und verglichen.

Wie in Abbildung 4-5 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass die Expression beider Zytokine in sensibilisierten und provozierten Tieren erhöht ist, verglichen mit den Kontrolltieren.

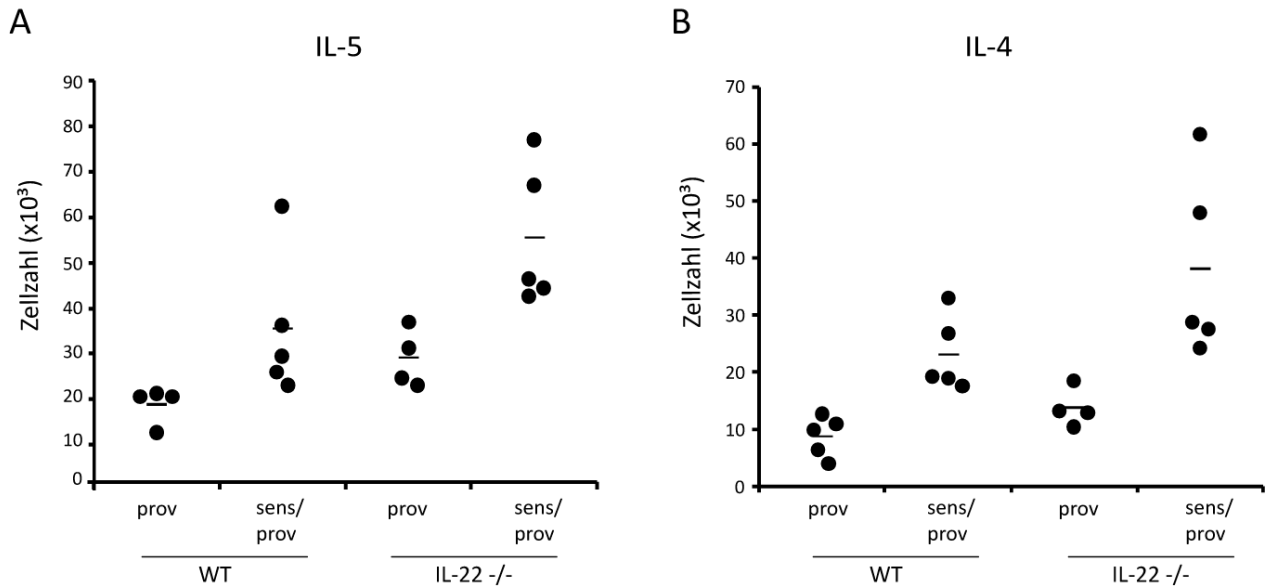


Abb. 4-5 Intrazelluläre Färbung von isolierten Lungenzellen gegen IL-5 und IL-4

Lungenzellen wurden aus provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) WT-Mäusen bzw. IL-22-defizienten (IL-22^{-/-}) Mäusen isoliert, mit Antikörpern gegen IFN- γ und IL-5 bzw. IL-4 intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Anzahl der gesamten IL-5⁺IFN- γ ⁻ (A) bzw. IL-4⁺IFN- γ ⁻ (B) Lungenlymphozyten. Jeder Punkt repräsentiert die Zellzahl aus einer Maus. Angegeben sind die Daten von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Ergebnisse

In den sensibilisierten und provozierten IL-22-defizienten Mäusen konnte eine leicht erhöhte Anzahl IL-17A-produzierender Lymphozyten nachgewiesen werden (Abb. 4-6 A und B). Da diese Erhöhung relativ gering war, wurde im Anschluss die IL-17A-mRNA Expression und IL-17A-Sekretion untersucht. Allerdings konnte auch hier keine erhöhte Expression oder Sekretion des Zytokins festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten auf eine sehr geringe IL-17A-Expression im Lungengewebe hinweisen, welche durch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht detektierbar sind.

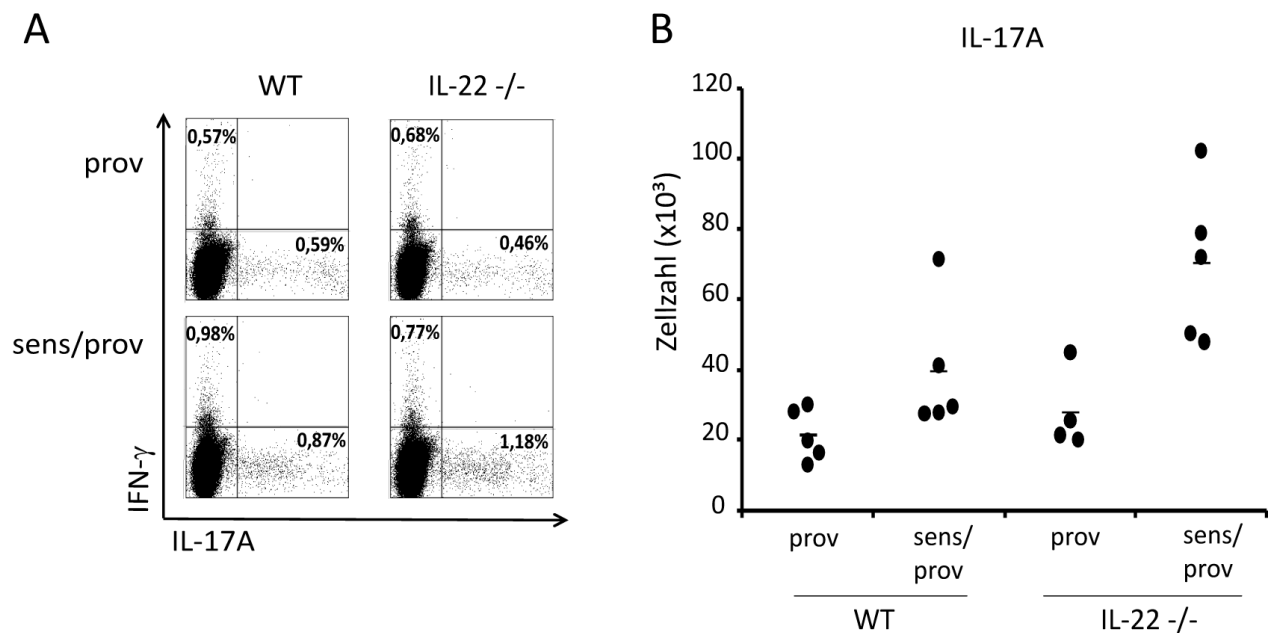


Abb. 4-6 Intrazelluläre Färbung von isolierten Lungenzellen gegen IL-17A

Lungenzellen wurden aus provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) WT-Mäusen bzw. IL-22-defizienten (IL-22^{-/-}) Mäusen isoliert, mit Antikörpern gegen IFN- γ und IL-17A intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In (A) sind repräsentativ die FACS-Daten von jeweils einer Maus jeder Gruppe als „Dot Plot“-Darstellung angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich entweder auf IFN- γ ⁺ bzw. IL-17A⁺ Zellen der gesamten Lungenlymphozyten-Zellzahl. In (B) ist die Anzahl der gesamten IL-17A⁺IFN- γ ⁻ Lungenlymphozyten dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert die Zellzahl aus einer Maus. Angegeben sind die Daten von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die stärker ausgeprägte Zytokin-Expression in IL-22-defizienten Mäusen verdeutlicht, dass das Fehlen von IL-22 eine erhöhte Th2-Antwort und dadurch eine Verstärkung der Atemwegsentzündung bewirkte.

4.1.4 Applikation von rekombinantem IL-22 reduziert die Entstehung von bronchialem Asthma

In den zuvor durchgeführten Versuchen wurde festgestellt, dass IL-22-defiziente Mäuse stärkere Atemwegsentzündungen aufwiesen als Wildtyp-Mäuse. Daher sollte nun untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von rekombinantem IL-22 (rIL-22) zu einer Linderung der induzierten Asthma-Reaktionen in Wildtyp-Mäusen führt.

Das in den folgenden Versuchen verwendete rIL-22 wurde freundlicherweise von der Kooperationsgruppe aus Zürich zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde das rIL-22 mit einem Endotoxintest der Firma Lonza AG auf Kontaminationen überprüft. Da die Endotoxinkonzentration des getesteten rIL-22 $< 0,02$ EU/ μ g betrug, konnten unspezifische Endotoxin-induzierte Effekte bei der Verwendung des rIL-22 ausgeschlossen werden.

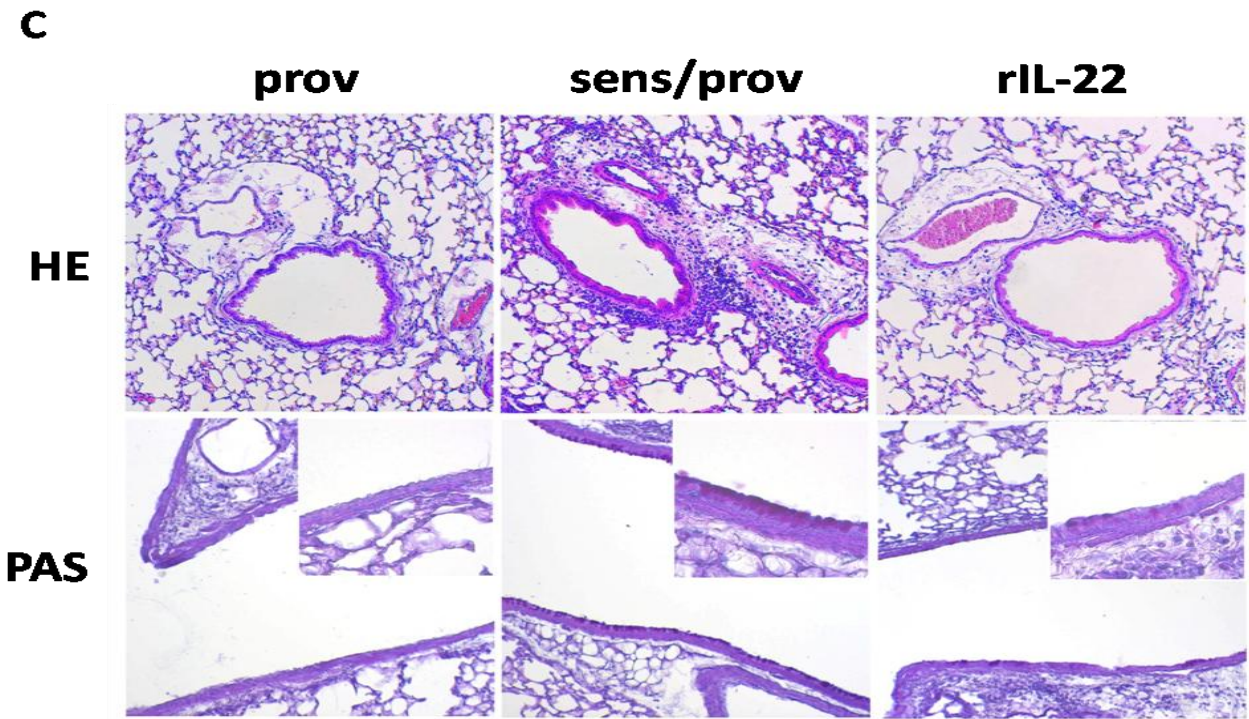
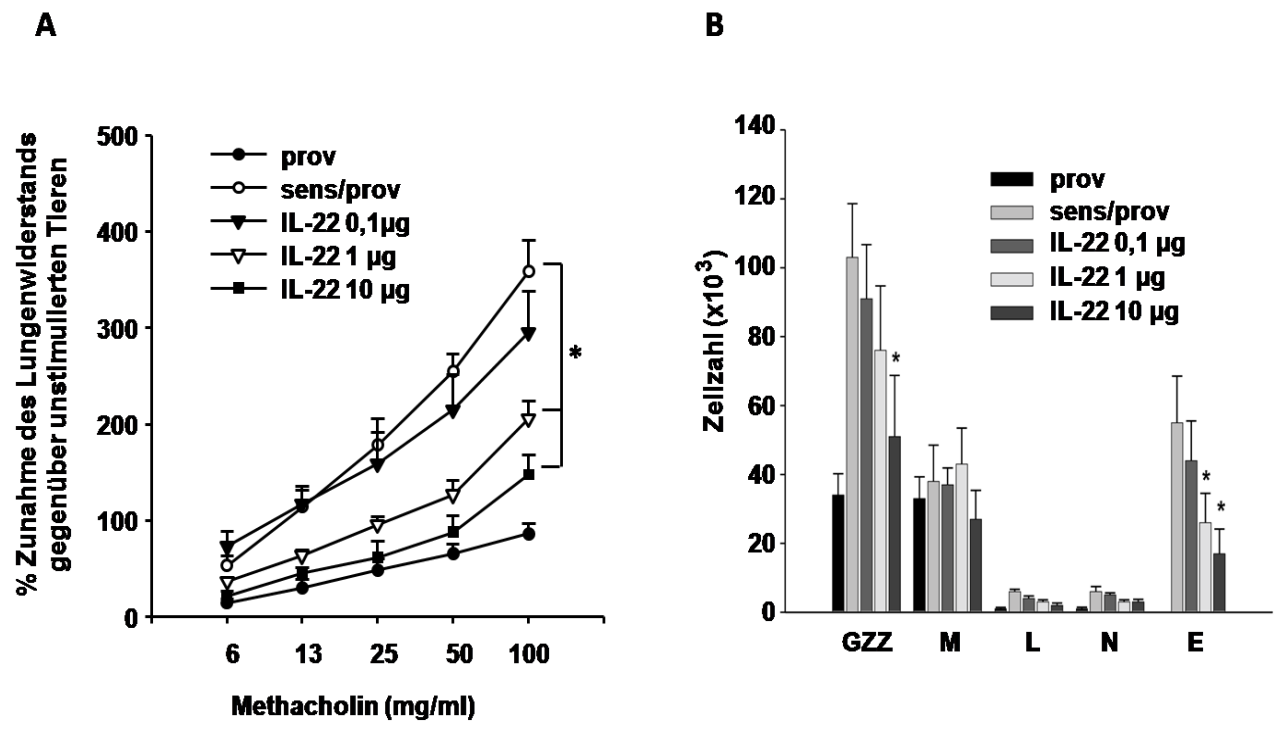
Zunächst wurden die Mäuse nach dem OVA-Modell sensibilisiert und bekamen vor der Provokation rIL-22 intranasal verabreicht. Um einen Einfluss des verabreichten rIL-22 auf die Induktion der Atemwegsentzündung auszuschließen, wurden nicht-sensibilisierte Mäuse mit rIL-22 behandelt und nach OVA-Provokation analysiert. Bei der Messung des Atemwegswiderstands konnten keine beeinflussenden Effekte des rIL-22 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den rIL-22 behandelten sens/prov Mäusen wurde zunächst eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Wie in Abbildung 4-7 A zu sehen ist, verringerte sich der Atemwegswiderstand mit zunehmender rIL-22-Konzentration. Des Weiteren wurden die in die Lunge infiltrierenden Zellen in der BAL der behandelten Tiere analysiert, um festzustellen ob die rIL-22-Behandlung ebenfalls inhibierende Auswirkungen auf die Entzündung der Atemwege hatte. Es zeigte sich, dass die Gesamtzellzahl der infiltrierten Lungenzellen bei Mäusen, die mit der höchsten rIL-22-Konzentration (10 μ g) behandelt wurden, signifikant reduziert war (Abb. 4-7 B). Bei der Einzelzellanalyse fiel auf, dass die Anzahl der Eosinophilen ebenfalls signifikant reduziert war, verglichen mit den rIL-22-unbehandelten Mäusen. Als nächstes wurden die Lungengewebe der Tiere hinsichtlich ihres Entzündungszustands histologisch untersucht. Mit Hilfe der HE- und PAS-Färbungen konnte festgestellt werden, dass die peribronchiale Entzündung in

Ergebnisse

Lungengewebe von rIL-22-behandelten Mäusen schwächer war, als in den sensibilisierten und provozierten WT-Tieren (Abb. 4-7 C).

Um in diesem Modell zusätzlich die Produktion der beiden Asthma-relevanten Proteine IL-13 und CCL17 zu kontrollieren, wurden ihre Konzentrationen in der BAL untersucht. Wie erwartet, wurden erhöhte IL-13- und CCL17-Konzentrationen bei den unbehandelten sens/prov Mäusen detektiert. Dagegen waren die Konzentrationen bei den rIL-22-behandelten Mäusen, abhängig von der verabreichten rIL-22-Dosis, signifikant erniedrigt (Abb. 4-7 D, E). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass rIL-22 einen maßgeblichen Einfluss auf die Induktion der allergischen Atemwegsentszündungsreaktion hatte und dass es durch die Behandlung mit rIL-22 zu einer Abnahme der Produktion des Th2-spezifischen Zytokins IL-13 und des Chemokins CCL17 kam.



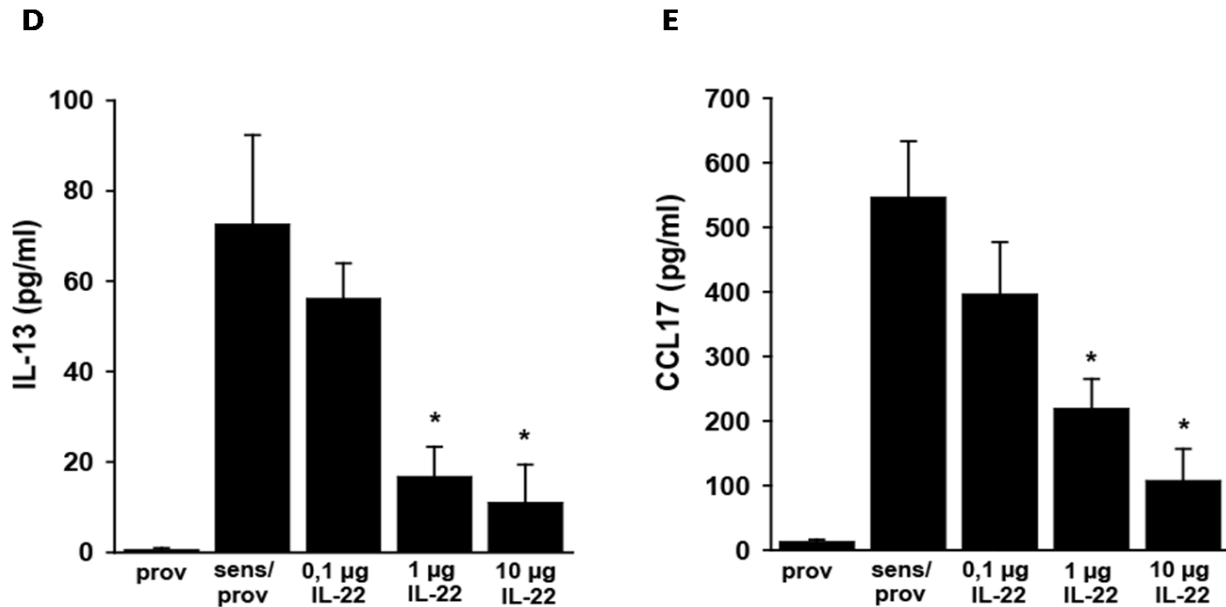


Abb. 4-7 Exogene IL-22-Applikation führt zur reduzierten Atemwegshyperreaktion und Zytokinproduktion

Analyse von sensibilisierten und provozierten (sens/prov, n=12) WT-Mäusen und WT-Mäusen, die vor jeder Provokationsphase mit rIL-22 ([1-10 µg], intranasal, n=12) behandelt wurden, 48 Std. nach der letzten OVA-Provokation. Tiere, die nur provoziert (prov, n=5) wurden, dienten als Negativkontrollen.

(A) Messung des Atemwegwiderstands. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, $p^* < 0,05$ verglichen mit sensibilisierten/provozierten Mäusen die nicht mit rIL-22 behandelt wurden (sens/prov).

(B) Analyse der Zellmorphologie und Auszählung der BAL-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, *Abkürzungen:* GZZ (Gesamtzellzahl), M (Alveolarmakrophagen), L (Lymphozyten), N (Neutrophile), E (Eosinophile) $p^* < 0,05$ verglichen mit sensibilisierten/provozierten Mäusen, die nicht mit rIL-22 behandelt wurden.

(C) Histologische Analyse von Lungengewebe mit Hilfe von HE- und PAS-Färbung. Untersucht wurden oben genannte Mäuse (sens/prov und prov) und Mäuse, die mit 10 µg rIL-22 vor der Provokation behandelt wurden.

(D,E) Messung der IL-13- (D) und CCL17- (E) Konzentrationen in der BAL (mittels ELISA).

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. $p^* < 0,05$ verglichen mit sensibilisierten und provozierten (sens/prov) Mäusen und mit 0,1 µg rIL-22 behandelten Tieren.

4.2 IL-22-Effekte und ausgelöste Mechanismen in bronchialen Epithelzellen

In den zuvor beschriebenen *in vivo* Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass IL-22-defiziente Mäuse eine verstärkte AHR und verstärkte Entzündungsreaktionen aufwiesen und dass die exogene Gabe von rekombinantem IL-22 eine Reduktion dieser Reaktionen bewirkte. Es ist anzunehmen, dass IL-22 seinen Einfluss auf Epithelzellen ausübt. Die Effekte von IL-22 auf bronchiale Epithelzellen und die Mechanismen dieser Protektion sollten daher in einem *in vitro*-System aufgedeckt werden.

4.2.1 Expression von IL-22 und des IL-22-Rezeptorkomplexes

Um zunächst zu klären, welche Zellen in der Lunge auf IL-22 reagieren und welche Zellen dieses Zytokin exprimieren, wurden verschiedene Zelltypen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems analysiert. Dazu wurden Th2-Zellen, Th17-Zellen, Granulozyten, Dendritische Zellen, Mastzellen, glatte Muskelzellen und die murine Clara-Zell-Linie C22 entweder stimuliert oder unbehandelt auf die IL-22-, IL-22R-, IL-10R1- und IL-10R2-Expression untersucht (Abb.4-8). Die murine Clara-Zell-Linie C22 fungiert hier als Modell für bronchiale Epithelzellen.

Es zeigte sich, dass IL-22 in der Mischpopulation der Gesamt-T-Zellen (naiven und aktivierten), Th17-Zellen, BMDCs (naiven und aktivierten) und aktivierten BMMCs exprimiert wurde. Die Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes (bestehend aus der IL-22R- und IL-10R2-Kette) wurde dagegen tatsächlich nur in den Epithelzellen detektiert.

Dieses Ergebnis zeigt also, dass ausschließlich die C22-Zellen in der Lage sind auf IL-22 zu reagieren, da nur diese Zellen den IL-22-Rezeptorkomplex exprimieren.

Ergebnisse

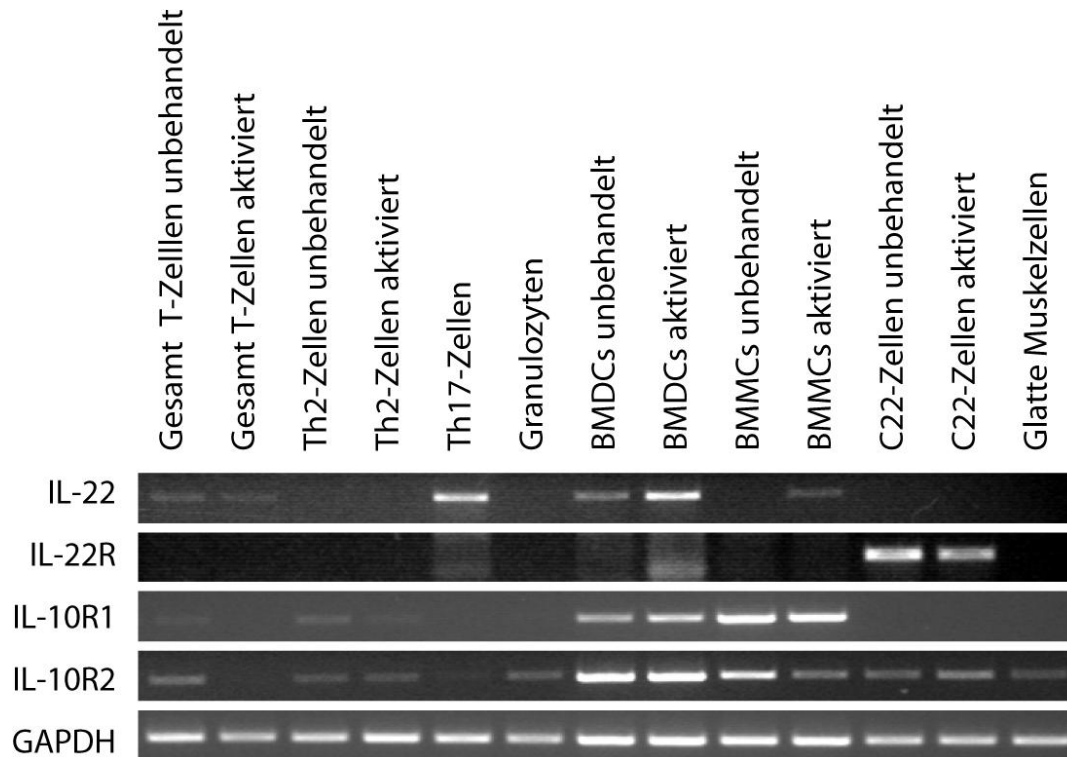


Abb. 4-8 Expression von IL-22 und der Ketten des IL-22- und IL-10-Rezeptorkomplexes

Expression der IL-10R1/2- und IL-22R-Ketten und von IL-22 aus isolierter Gesamt-RNA unterschiedlicher Zelltypen. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die zu analysierenden Gene mit spezifischen Primern detektiert. Die Expression von GAPDH diente als Kontrolle zur Überprüfung der Intaktheit der cDNA.

Stimulation der Zellen:

Gesamt-T/Th2-Zellen: anti-CD3/CD28 prästimuliert für 3 Tage, anti-CD3 [1 µg/ml] restimuliert für 24 Std., BMDCs: LPS [100 ng/ml] für 5 Std., BMMCs: Ionomycin [1 µM] für 5 Std., C22-Zellen: rIL-13 [20 ng/ml], rTNFα [5 ng/ml] für 5 Std.

Abkürzungen:

BMDCs (Bone marrow-derived dendritic cells, Dendritische Zellen aus dem Knochenmark), BMMCs (Bone marrow-derived mast cells, Mastzellen aus dem Knochenmark), GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

4.2.2 Aktivierung der Signalwege in bronchialen Epithelzellen nach IL-22-Stimulation

Mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests (beschrieben im Methodenteil unter 3.3.1) wurde zunächst nachgewiesen, dass das verwendete rIL-22 weder das Überleben noch die Proliferation der Epithelzellen nach 24-stündiger Stimulation beeinflusste.

Um zu testen, welche Signalwege durch rIL-22 in C22-Zellen ausgelöst werden, wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Aktivierung von STAT3, ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 nach unterschiedlich langer rIL-22-Behandlung (bis zu 30 min.) untersucht. Die stärkste Phosphorylierung für den Transkriptionsfaktor STAT3 und die MAP-Kinasen SAPK/JNK konnte nach 10-15 min. festgestellt werden, wohingegen für die Aktivierung der Kinasen ERK-1/2 und p38 kürzere Stimulationszeiten von 1-5 min. ausreichten (siehe Abb. 4-9 A-D). Diese Ergebnisse bestätigen die durch rIL-22 ausgelösten Mechanismen, die auch in anderen Zellen (u. a. in der Haut oder im Gastrointestinaltrakt) untersucht und beschrieben wurden [75;81;91;162;164-166].

In der Abbildung 4-9 E ist die Detektion der STAT3-Phosphorylierung in C22-Zellen gezeigt. Hier wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen rIL-22-Konzentrationen stimuliert, um zu testen, ob geringe rIL-22-Konzentrationen für die STAT3-Aktivierung ausreichten. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 10 ng/ml genügte, um die Tyrosin-Phosphorylierung zu induzieren. Diese rIL-22-Mengen wurden in einigen der folgenden Versuche verwendet.

Ergebnisse

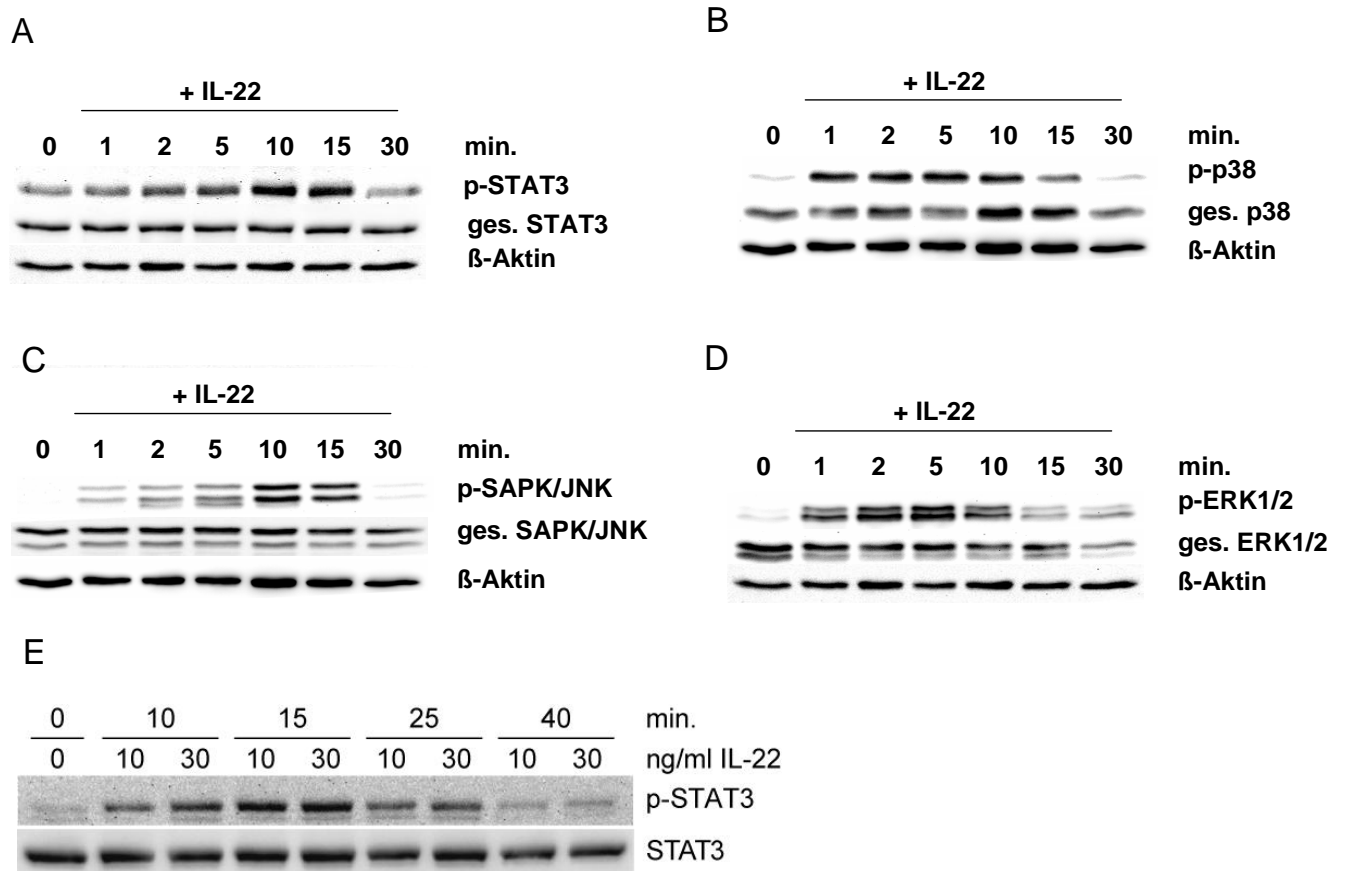


Abb. 4-9 Aktivierung von STAT3, ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 in C22-Zellen nach IL-22-Stimulation

C22-Zellen wurden mit rIL-22 [100 ng/ml] (A-D) bzw. [10 und 30 ng/ml] (E) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern die Aktivierung der entsprechenden Proteine nachgewiesen. Als Kontrolle des Gesamtproteins wurde das nicht-phosphorylierte Protein detektiert und als Ladekontrolle diente β-Aktin (A-D).

Repräsentative Darstellungen für 2-3 unabhängig durchgeführte Experimente.

Abkürzungen:

STAT3 (signal transducer and activator of the transcription 3), ERK1/2 (extracellular signal-related kinases 1/2), SAPK/JNK (stress-activated protein-kinases/ c-Jun N-terminal kinases), p38 (p38 mitogen activated protein kinase)

Ergebnisse

4.2.2.1 Im Vergleich zu bronchialen Epithelzellen bleiben Dendritische Zellen von der inhibierenden Wirkung des IL-22 unbeeinflusst

Im Hinblick auf die Aussage der Publikation von Schnyder et al., dass der Transfer von rIL-22-behandelten Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs) in Versuchsmäuse eine induzierte Asthma-Reaktion reduziert [167], wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt. Da, wie anhand der Abbildung 4-8 zu sehen ist, keine IL-22R-Kette bei BMDCs detektiert werden konnten, wurde die Signalkaskade bezüglich der Phosphorylierung des STAT3-Moleküls untersucht, die normalerweise von IL-22 induziert wird. Als Kontrolle wurden die BMDCs mit rekombinantem IL-10 (rIL-10) behandelt, von dem bekannt ist, dass es die STAT3-Aktivierung bei DCs induziert [168]. Das Ergebnis (Abb. 4-10) zeigt deutlich, dass die STAT3-Aktivierung bei C22-Zellen von rIL-22 (A) und bei den BMDCs ausschließlich durch rIL-10 und nicht durch rIL-22 (A, B) ausgelöst wurde.

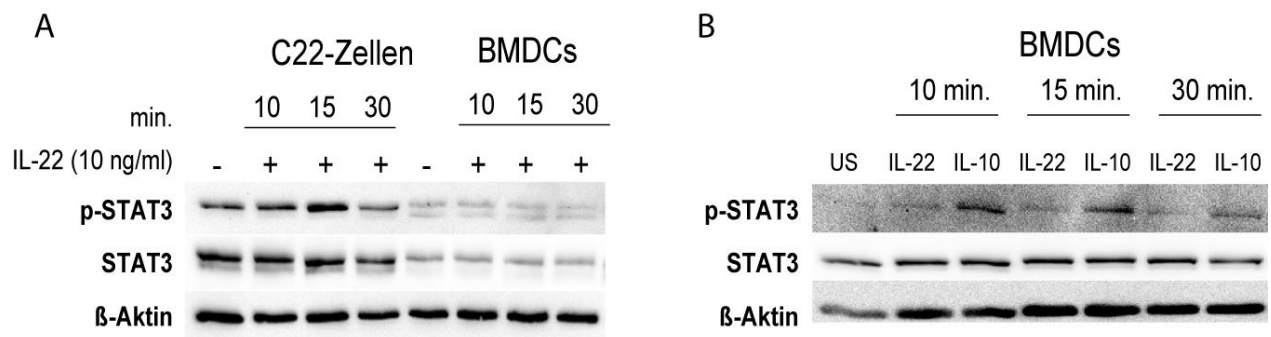


Abb. 4-10 Phosphorylierung von STAT3 in C22-Zellen und BMDCs nach Aktivierung mit IL-22 bzw. IL-10

C22-Zellen (A) bzw. BMDCs (A, B) wurden mit rIL-22 [10 ng/ml] bzw. mit rIL-10 [10 ng/ml] für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und nach Lyse der Zellen wurden sie hinsichtlich ihrer STAT3-Aktivierung mit Hilfe von Western Blot analysiert.

Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Als Kontrolle des Gesamtproteins wurde das nicht-phosphorylierte Protein detektiert und als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Ergebnisse

Schnyder et al. zeigten, dass BMDCs, wenn sie mit rIL-22 behandelt wurden, eine signifikant verminderte OVA-Aufnahme und Hochregulation der Aktivierungsmarker CD86 und CD80 aufweisen. Nach den bisherigen Beobachtungen aus den vorangegangenen Versuchen in dieser Arbeit, sollte IL-22 keinen Einfluss auf BMDCs ausüben. Interessant war dennoch, die Ergebnisse aus der Publikation durch eine Wiederholung der Experimente zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden aus dem Knochenmark präparierte DCs in gleicher Weise mit OVA und rIL-22 behandelt, wie in der Studie [167] beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit dem supprimierend wirkenden rIL-10 behandelt, um eine Kontrolle für den zu untersuchenden IL-22-Effekt mitzuführen. Als weitere Kontrolle wurde das rIL-22 mit Hilfe seines Antagonisten IL-22BP neutralisiert, um den Effekt des rIL-22 wieder aufzuheben. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass es kaum zu Unterschieden bezüglich der OVA-Aufnahme bei den verwendeten Stimuli kam. Eine verminderte OVA-Aufnahme konnte bei rIL-22-Anwesenheit, im Gegensatz zu der von Schnyder et al. postulierten Aussage, in den durchgeführten Experimenten, nicht beobachtet werden (Abb. 4-11 A).

Als nächstes wurde die Regulation der DC-Aktivierungsmarker untersucht. Da der Stimulus für die Aussage der Studie irrelevant war, wurde LPS, in An- und Abwesenheit der immunmodulatorisch wirkenden Zytokine, anstatt Ovalbumin, verwendet. Es stellte sich heraus, dass rIL-22 in den Experimenten keine Reduktion der CD86- und CD80-Moleküle induzierte, während die mit rIL-10 behandelten Zellen eine erwartete signifikant verminderte Expression beider Aktivierungsmarker aufwiesen (siehe Abb. 4-11 B, C).

Anhand dieser Versuche, konnte kein IL-22-Effekt beobachtet werden, der sich bei BMDCs inhibitorisch auswirkte. Dadurch konnte die Aussage aus der Studie von Schnyder et al. nicht bestätigt werden.

Ergebnisse

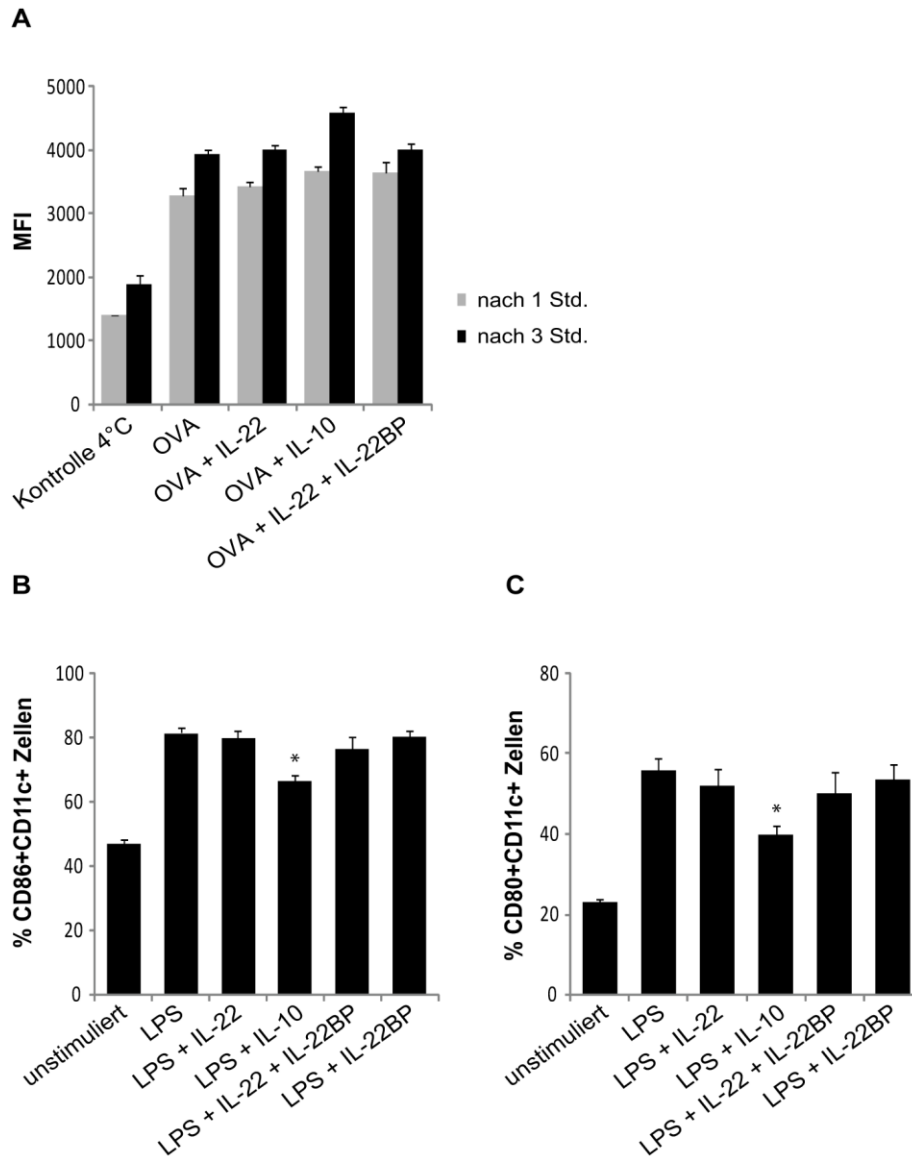


Abb. 4-11 IL-22 hat keinen Einfluss auf die OVA-Aufnahme und die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle in BMDCs

DCs wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen isoliert und ausdifferenziert. (A) Die Zellen wurden mit rIL-22 [20 ng/ml] und rIL-10 [20 ng/ml] bei 37°C für 3 Std. vorinkubiert und im Anschluss mit OVA-Alexa 647 [10 ng/ml] für 30 min. stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium verworfen und die Zellen in Medium ohne Stimuli für 1 bzw. 3 weitere Std. bei 37°C inkubiert und danach durchflusszytometrisch die OVA-Aufnahme analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit OVA bei 4°C stimuliert wurden und als weitere Kontrolle diente die Neutralisierung des IL-22 mit rIL-22BP [1 µg/ml]. Angegeben sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ± Standardfehler von Triplikaten von 2-3 unabhängig durchgeführten Experimenten. (B, C) Die Zellen wurden mit LPS [100 ng/ml] in An- und Abwesenheit von rIL-22 [20 ng/ml], rIL-10 [20 ng/ml] und rIL-22BP [1 µg/ml] bei 37°C für 24 Std. stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen, mit rIL-22 + rIL-22BP und mit rIL-22BP alleine stimulierte Zellen. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Aktivierungsmarker CD86 (B) und CD80 (C) analysiert. Angegeben sind Mittelwerte in %-Angaben der CD11c⁺ Zellen ± Standardfehler von Triplikaten von 2-3 unabhängig durchgeführten Experimenten. *p < 0,05 verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

4.2.3 IL-22 übt einen inhibierenden Einfluss auf die durch IL-13 und TNF α induzierte CCL17-Produktion von C22-Zellen aus

Bronchiale Epithelzellen werden bei der Entwicklung des Asthma bronchiale unter anderem von den Zytokinen IL-13 und TNF α aktiviert. Beide Zytokine werden bei der allergischen Atemwegsentzündung vermehrt produziert und wirken entzündungsfördernd auf bronchiale Epithelzellen [10;54]. Außerdem wird vermutet, dass die Kombination beider Zytokine, einen synergistischen Effekt auf die Entzündungsreaktion beim allergischen Asthma ausübt [169]. Das Chemokin CCL17 spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, da bronchiale Epithelzellen nach IL-13- und TNF α -Stimulation dieses verstärkt sezernieren (siehe Einleitung 1.1.2.2). Zudem konnte auch in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Produktion von CCL17 bei IL-22-defizienten Mäusen, denen eine AHR induziert wurde, signifikant erhöht ist (siehe Abb. 4-4 B).

Zunächst wurde die Regulation der spezifischen IL-22-Rezeptor-Kette in der Clara-Zell-Linie untersucht. Durch qRT-PCR-Analysen konnte beobachtet werden, dass C22-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem IL-13 (rIL-13) und TNF α (rTNF α) für unterschiedliche Zeiten (2-8 Stunden) die IL-22-Rezeptor-Kette, unabhängig vom Aktivierungszustand der Zellen, exprimierten. Unabhängig von der Stimulationszeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Expressionslevel der stimulierten Zellen und der unbehandelten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um dann herauszufinden nach welcher Stimulationszeit die höchste CCL17-Expression in der Clara-Zell-Linie zu detektieren ist, wurden die Zellen mit rIL-13 als Einzelstimulus und in Kombination mit rTNF α in einer Kinetik für 2-8 Stunden aktiviert. Es zeigte sich, dass die CCL17-Expression bis zu einer Aktivierungszeit von 6 Stunden anstieg, während sich die Expression nach 8 Stunden wieder stark reduzierte (Abb. 4-12 A). Außerdem ist hier der synergistische Effekt von rIL-13 und rTNF α deutlich zu erkennen. Als nächstes sollte getestet werden, ob sich rIL-22 inhibierend auf die Entzündung der Atemwege auswirken kann. Dazu wurden C22-Zellen in An- und Abwesenheit von rIL-22 vorinkubiert und im Anschluss mit rIL-13 oder rTNF α alleine und in Kombination aktiviert. Wie im Vorversuch bereits gezeigt wurde, kam es durch rIL-13- bzw. rIL-13- und rTNF α -Stimulation zu einem

Ergebnisse

Anstieg der CCL17-Expression in den rIL-22-unbehandelten Zellen. Interessanterweise zeigt sich bei den Zellen, die mit rIL-22 vorinkubiert wurden, eine signifikante Reduktion der CCL17 Expression (Abb. 4-12 B, C).

Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die inhibierende Wirkung von IL-22 auf die Aktivierung der bronchialen Epithelzellen.

Ergebnisse

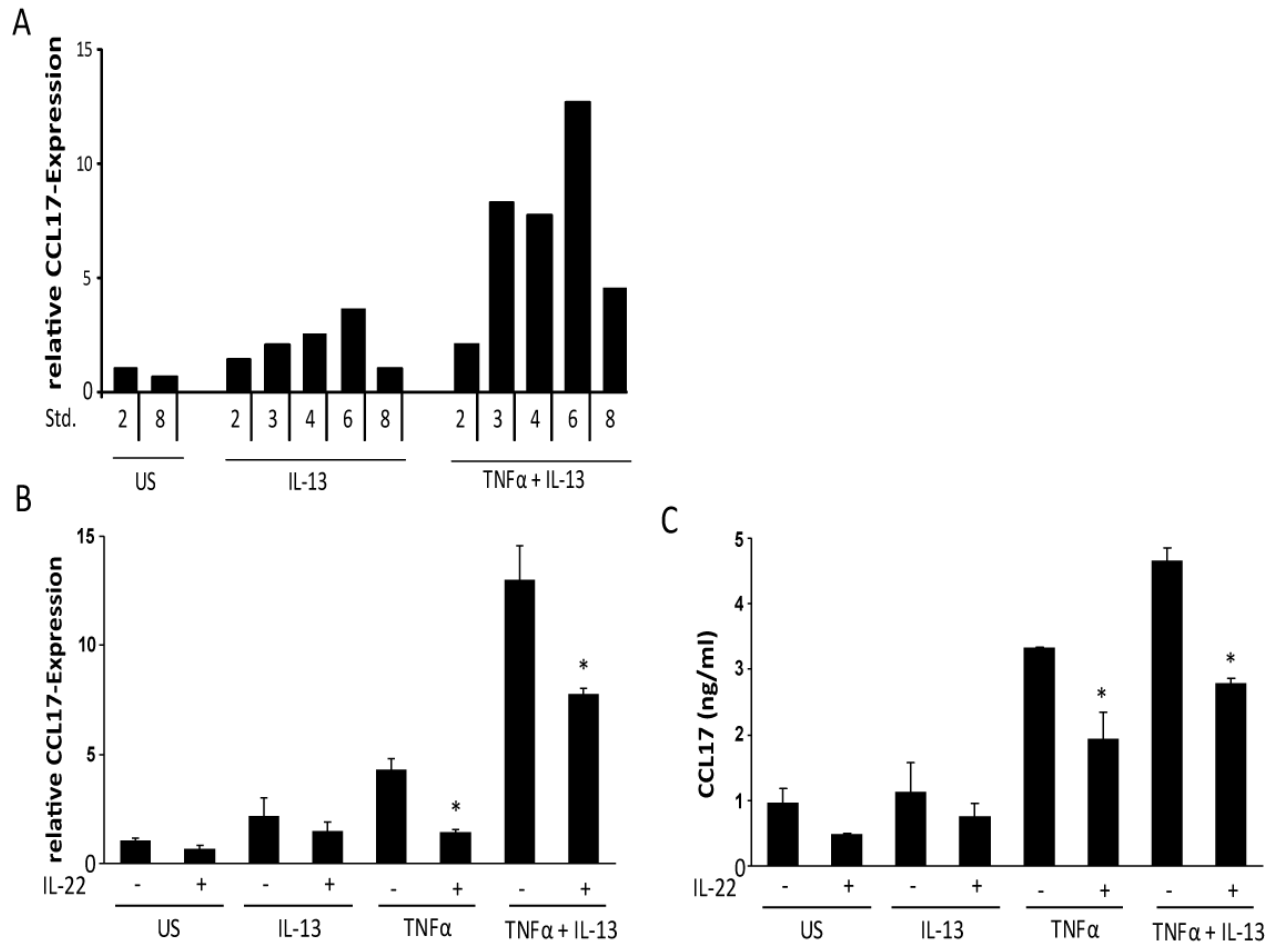


Abb. 4-12 Induzierte CCL17-Expression in aktivierten C22-Zellen und Reduktion durch IL-22

(A) C22-Zellen wurden mit rIL-13 [20 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] für die angegebenen Zeitpunkte aktiviert. Als Kontrolle blieben die Zellen unstimuliert. Die relative CCL17-Expression wurde mit qRT-PCR ermittelt.

Das Ergebnis ist repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente.

(B, C) C22-Zellen wurden mit (IL-22+) bzw. ohne (IL-22-) rIL-22 [100 ng/ml] für 4 Std. vorinkubiert und im Anschluss mit rIL-13 [60 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] für (B) 5 Std. und (C) 48 Std. aktiviert.

(B) Die relative CCL17-Expression wurde in Triplikaten mit qRT-PCR ermittelt und auf relative GAPDH-Expression normalisiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 4 unabhängig durchgeführten Experimenten. * $p < 0,05$ verglichen mit Zellen, die mit rTNF α alleine und mit der Kombination aus beiden Zytokinen in Abwesenheit von rIL-22 stimuliert wurden.

(C) Die CCL17-Produktion der aktivierten Zellen wurde mit Zellüberständen nach 48 Stunden mittels ELISA gemessen.

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von Triplikaten von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. * $p < 0,05$ verglichen mit Zellen, die mit rTNF α alleine und mit der Kombination aus beiden Zytokinen in Abwesenheit von rIL-22 stimuliert wurden.

4.2.4 Effekte des IL-22 auf die Expression Asthma-assoziiierter Proteine

Nach der Analyse des IL-22-Einflusses auf CCL17, sollten nun die Asthma-assoziierten Proteine Gob5, IL-25 und TSLP untersucht werden.

Analog zu den *in vivo* Studien konnte das für die Mukus-Produktion relevante Protein Gob5 ebenfalls in der aktivierten Clara-Zell-Linie detektiert werden. Durch rIL-13-Stimulation wurde die Gob5-Expression deutlich induziert, welche durch die Anwesenheit von rIL-22 komplett reduziert werden konnte (Abb. 4-13 A). Das Zytokin IL-25, das wiederum die Th2-Zytokinproduktion fördert, zeigte in rIL-13-stimulierten C22-Zellen eine signifikant erhöhte Expression, die durch rIL-22 signifikant herabgesetzt wurde (Abb. 4-13 B).

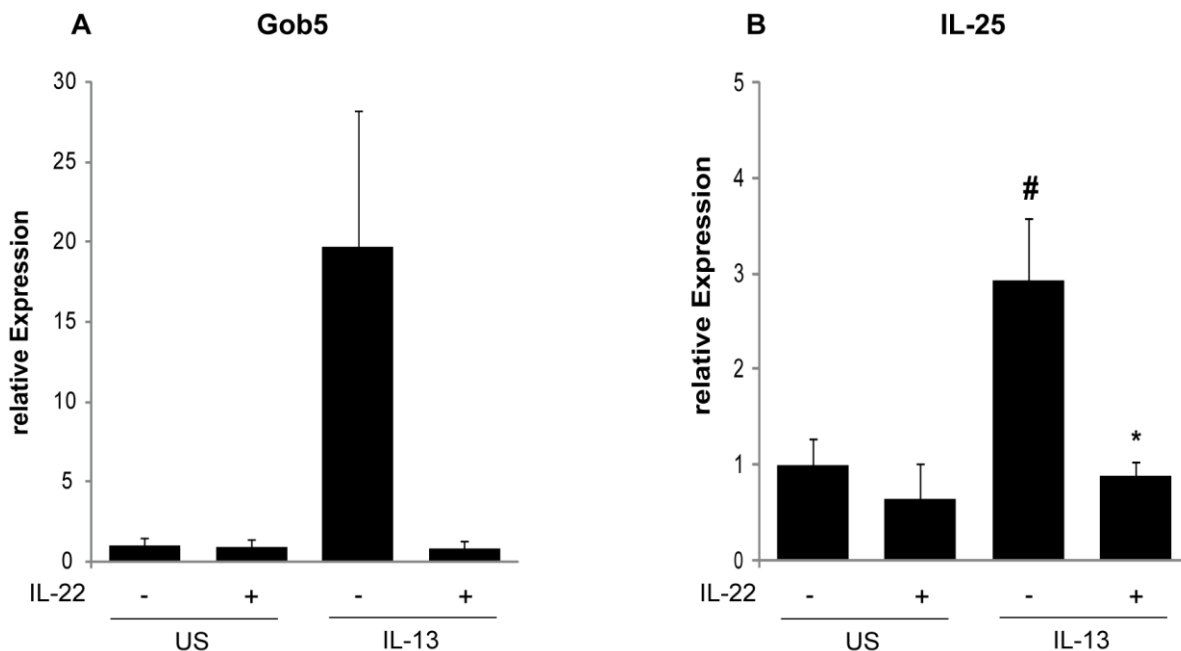


Abb. 4-13 IL-22 wirkt inhibitorisch auf die durch IL-13 ausgelöste Gob5- und IL-25-Expression

C22-Zellen wurden mit (+) bzw. ohne (-) rIL-22 [10 ng/ml] für 4 Std. vorinkubiert und im Anschluss mit rIL-13 [60 ng/ml] für 5 Std. aktiviert.

Die relative Expression von Gob5 (A) und IL-25 (B) wurde in Triplikaten mit qRT-PCR ermittelt und auf relative GAPDH-Expression normalisiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 4-6 unabhängig durchgeführten Experimenten. $p^* < 0,02$ verglichen mit rIL-13 stimulierten Zellen in Abwesenheit von rIL-22; $p\# < 0,01$ verglichen mit unstimulierten Zellen.

Ergebnisse

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das Zytokin TSLP in der Clara-Zell-Linie durch die Induktion des entzündungsfördernden Zytokins rTNF α schwach erhöht exprimiert wurde. Ein reduzierender IL-22-Effekt war aber auch hier zu erkennen (Abb. 4-14 A und B).

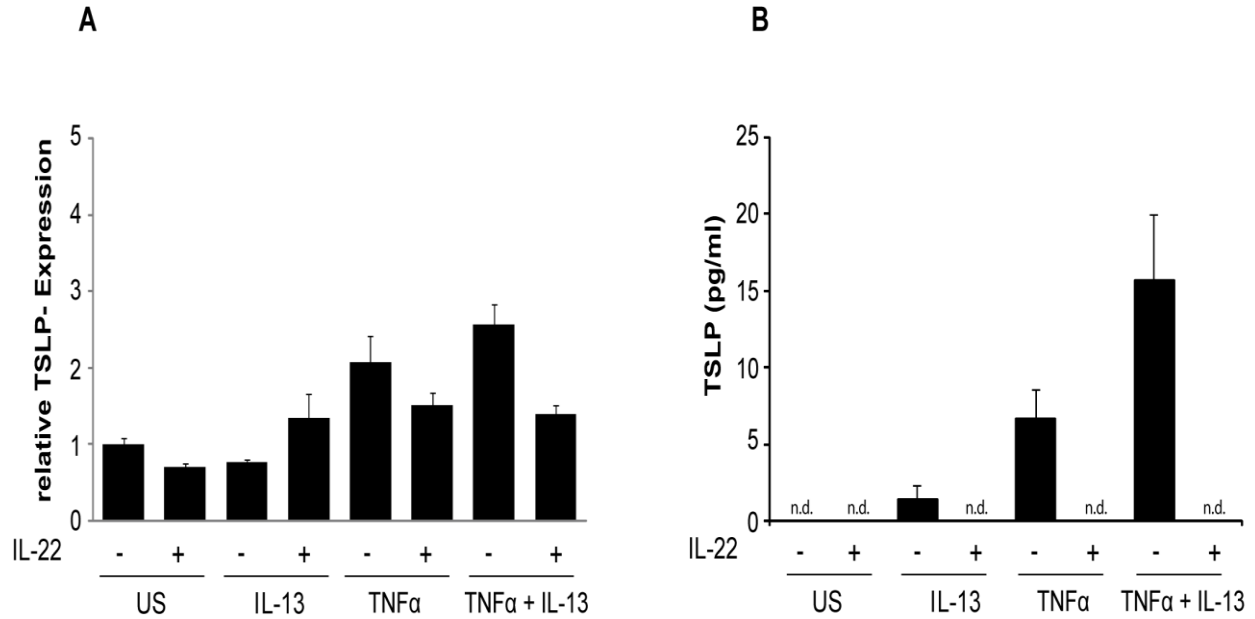


Abb. 4-14 TSLP-Expression und -Sekretion werden durch IL-22 inhibierend beeinflusst

C22-Zellen wurden mit (+) bzw. ohne (-) rIL-22 [10 ng/ml] für 4 Std. vorinkubiert und im Anschluss mit rIL-13 [60 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] für (A) 5 Std. und (B) 48 Std. aktiviert.

(A) Die relative Expression von TSLP wurde in Triplikaten mit qRT-PCR ermittelt und auf relative GAPDH-Expression normalisiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 4-6 unabhängig durchgeführten Experimenten.

(B) Die Zellüberstände wurden nach 48 Std. abgenommen und mittels ELISA die Produktion von TSLP gemessen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von Triplikaten von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Abkürzung „n.d.“ steht für „nicht detektierbar“.

4.2.5 Aufhebung des inhibitorischen Effekts von IL-22 durch seinen natürlichen Antagonisten IL-22BP

Die Expression des natürlich vorkommenden IL-22-Antagonisten, des IL-22 Bindeproteins (IL-22BP), konnte bisher in unterschiedlichen Geweben (z. B. in lymphatischen Organen, im respiratorischen und gastrointestinalen System und in der Haut) nachgewiesen werden [72;82;85;86]. Dies konnte im Lungengewebe von Wildtyp-Mäusen mit induzierter AHR und Mäusen, die nur inhalativ provoziert wurden, bestätigt werden (Abb. 4-15A). Die zelluläre Quelle für das Bindeprotein in diesen Geweben ist allerdings noch unklar [72;82;85;86].

Um zu prüfen, ob der zuvor beobachtete inhibitorische Effekt auf CCL17 auch ausschließlich auf rIL-22 zurückzuführen ist, wurde das Interleukin mit seinem natürlichen Antagonisten neutralisiert. Die IL-22-Neutralisation wurde zunächst durch die Detektion des phosphorylierten STAT3 getestet. Die Stimulation mit rIL-22 in Kombination mit der höchsten IL-22BP-Konzentration (400 ng/ml) löste bei einer 10-minütigen Stimulation der Zellen eine deutliche Abschwächung der durch rIL-22 induzierten STAT3 Phosphorylierung aus (Abb. 4-15 B), wodurch die Funktionalität der IL-22 Neutralisation bewiesen wurde.

Im Anschluss wurde die CCL17-Expression in stimulierten Zellen hinsichtlich der IL-22-Blockade mit IL-22BP analysiert. Die durch rIL-13 und rTNF α induzierte CCL17-Produktion und die rIL-22-bedingte CCL17-Reduktion ließen sich durch das IL-22 Bindeprotein wieder aufheben (Abb. 4-15 C).

Es scheint somit, dass die Inhibition der CCL17-Expression tatsächlich auf den IL-22-Effekt zurückzuführen war.

Ergebnisse

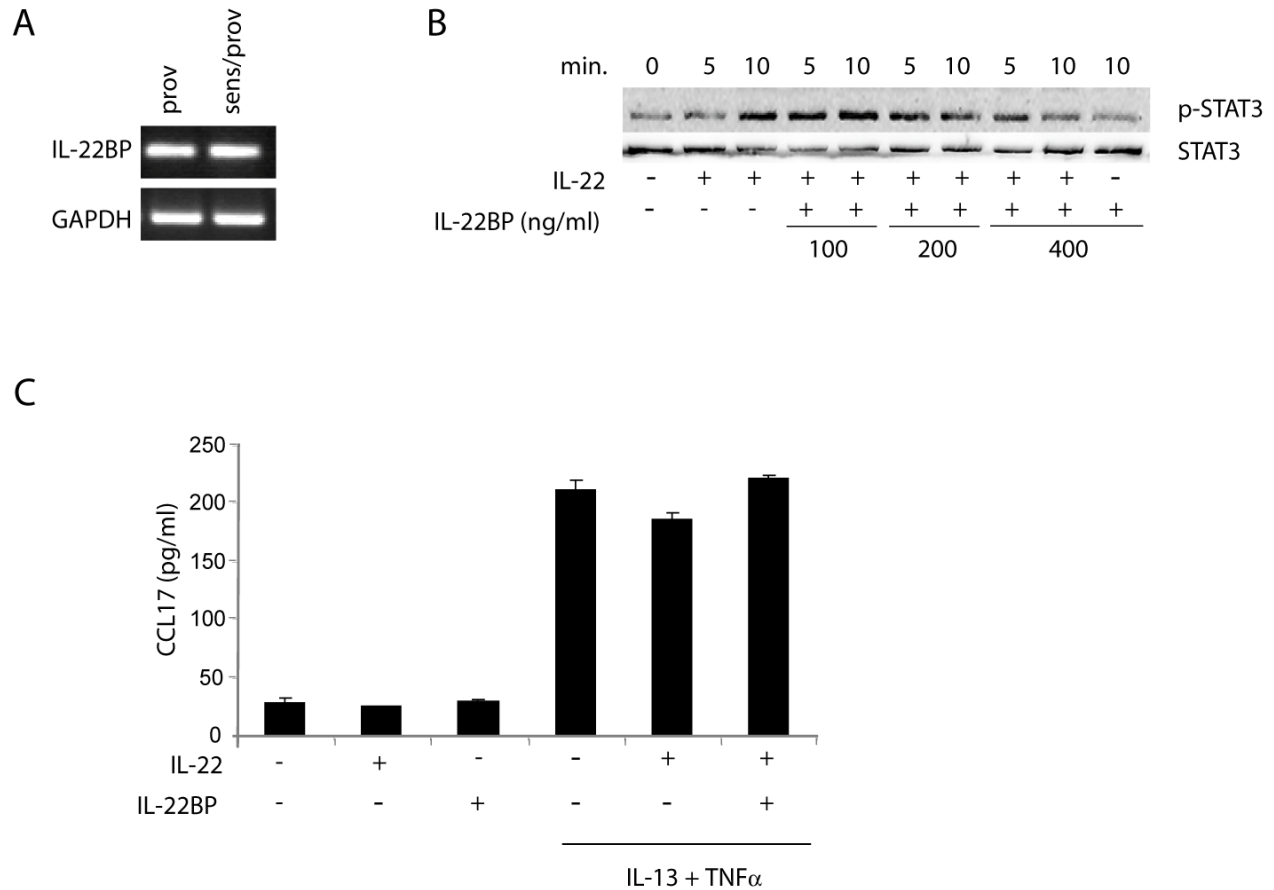


Abb. 4-15 Aufhebung des inhibitorischen IL-22-Effekts durch IL-22-Neutralisierung mit IL-22BP

(A) IL-22BP-Expression im Lungengewebe von provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) WT-Mäusen. 24 Std. nach der letzten Provokation mit OVA wurde die gesamte Lungen-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern die Genexpression von IL-22BP mittels PCR analysiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

(B) C22-Zellen wurden mit rIL-22 [100 ng/ml], in An- (+) und Abwesenheit (-) des rIL-22BP [100, 200, 400 ng/ml], für 5 und 10 min. stimuliert und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrolle des Gesamtproteins wurde das nicht-phosphorylierte Protein detektiert.

(C) C22-Zellen wurden mit rIL-13 [60 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] für 24 Std. stimuliert. Sie wurden vorher entweder mit rIL-22 [40 ng/ml] (IL-22+ IL-22BP-) oder nach 1-stündiger Inkubation mit rIL-22BP [4 μ g/ml] (IL-22+ IL-22BP+) für 4 Std. vorinkubiert. Als Kontrollen blieben Zellen unstimuliert oder wurden nur mit rIL-22 bzw. rIL-22BP stimuliert. Die Zellüberstände wurden nach 24 Std. abgenommen und die CCL17-Produktion mittels ELISA ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von Triplikaten von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.2.6 Untersuchung des IL-22-Effekts auf die LPS-induzierte CCL17-Expression in C22-Zellen

Die nachfolgenden *in vitro* Versuche sollten Aufschluss über den IL-22-Effekt bei der Aktivierung von bronchialen Epithelzellen durch einen weiteren Stimulus geben, der unabhängig von den auftretenden Stimuli bei der Asthma-Reaktion ist. Aus diesem Grund wurde das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien (LPS) als Stimulus verwendet und die induzierte CCL17-Expression überprüft.

Die zunächst durchgeführte LPS-Titration ließ darauf schließen, dass LPS im Allgemeinen eine starke Expression des Chemokins CCL17 in den bronchialen Epithelzellen hervorruft (Abb. 4-16 A). Diese Aktivierung der C22-Zellen war konzentrationsabhängig und wurde durchgeführt, um herauszufinden, welche LPS-Konzentration eine starke CCL17-Produktion induzierte. In gleichem Maße wie bei der IL-13- und TNF α -Stimulation lässt sich auch bei den LPS-stimulierten Zellen wieder deutlich die inhibierende Wirkung des rIL-22 erkennen (Abb. 4-16 B). Des Weiteren konnte auch der inhibierende Einfluss des rIL-22 durch Neutralisierung mit IL-22-BP wieder aufgehoben werden (Abb. 4-16 C). Diese Beobachtung wurde durch die Verwendung eines anti-IL-22 Antikörpers, durch dessen Anwendung dasselbe Ergebnis erzielt wurde, untermauert (Abb. 4-16 D).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CCL17-Expression in C22-Zellen nicht ausschließlich durch rIL-13 und rTNF α , sondern auch durch LPS gesteigert exprimiert wird und dass sich die Expression durch das Zytokin IL-22 inhibieren lässt.

Ergebnisse

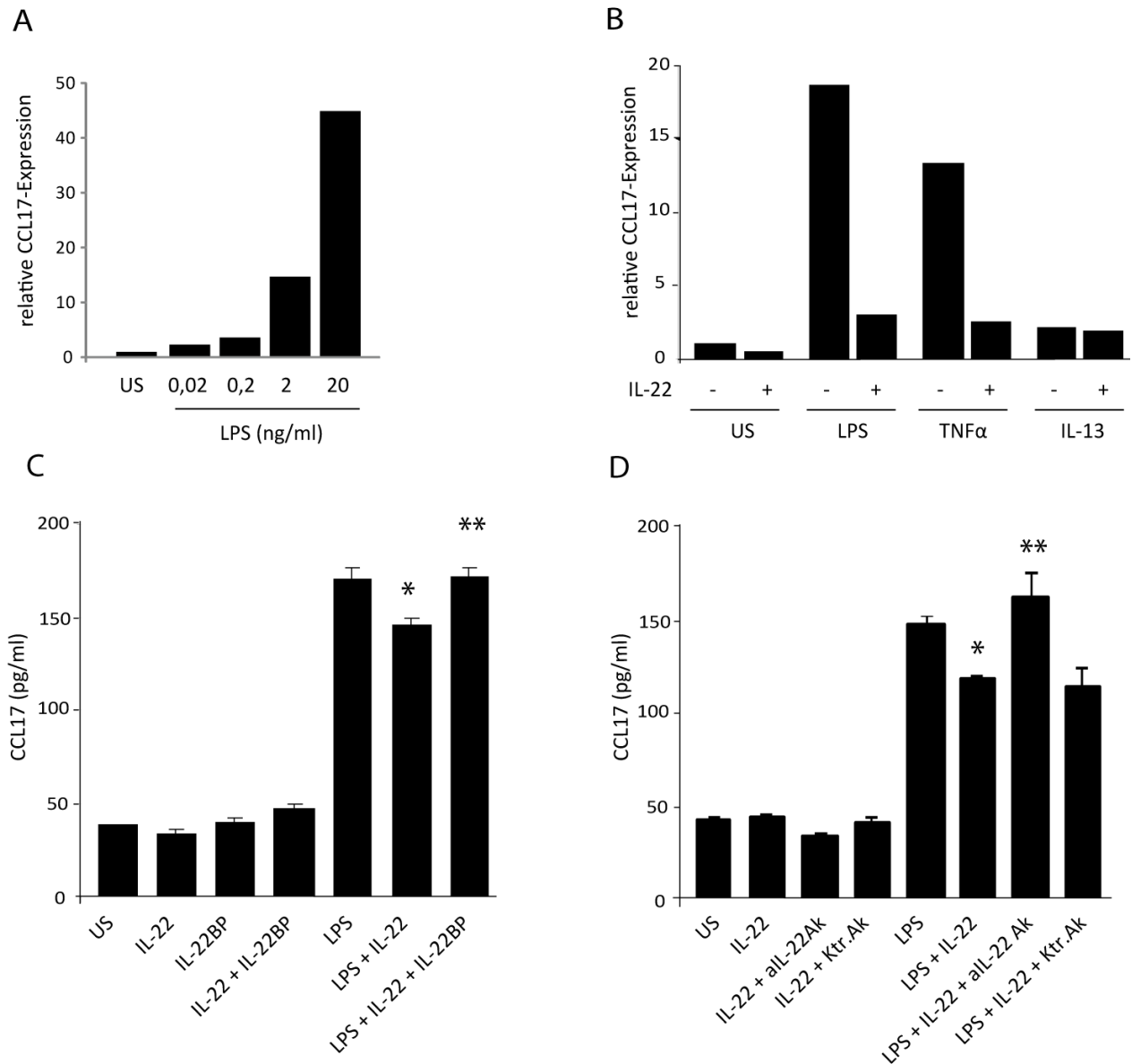


Abb. 4-16 CCL17-Expression in LPS-induzierten C22-Zellen

C22-Zellen wurden mit (A) titrierten LPS-Konzentrationen, (C, D) 10 ng/ml LPS bzw. (B) LPS [5 ng/ml], rIL-13 [60 ng/ml] und rTNF α [5 ng/ml] für 5 Std. aktiviert. Die Zellen wurden zuvor mit/ohne rIL-22 [10 ng/ml] für 4 Std. vorinkubiert. Das rIL-22 wurde 1 Std. mit (C) rIL-22 BP [1 μ g/ml], mit (D) anti-IL-22 Antikörper (aIL-22 Ak) [25 μ g/ml] bzw. IgG Isotypkontroll Antikörper (Ktr. Ak) [25 μ g/ml] bei 37°C inkubiert, bevor die 4-stündige Präinkubation mit den Zellen und die LPS-Aktivierung für 24 Std. erfolgte.

(A,B) Die Gesamt-RNA wurde isoliert und nach RT wurde die cDNA mit spezifischen Primern auf die CCL17-Expression hin untersucht. Die relative CCL17-Expression wurde in Triplikaten mit qRT-PCR ermittelt und auf relative GAPDH-Expression normalisiert.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Versuche.

(C,D) Zellüberstände wurden nach 24-stündiger Stimulation abgenommen und mit Hilfe von ELISA die CCL17-Produktion ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler von Triplikaten von 2-3 unabhängig durchgeführten Experimenten. $p^* < 0,04$ verglichen mit LPS stimulierten Zellen, $p^{**} < 0,03$ verglichen mit LPS + rIL-22 stimulierten Zellen.

4.3 Identifizierung IL-22-produzierender Zellen nach induzierter AHR

Die Funktion des IL-22 und die Mechanismen, die durch das Zytokin ausgelöst werden, wurden im Mausmodell und anhand von Zellkultur-Studien näher untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass IL-22 nach induzierter AHR vermehrt in der Lunge produziert wurde (Abb. 4-2 A-C). Die Frage nach der Zellpopulation, die dieses Zytokin in den Atemwegen sezerniert, blieb bislang jedoch noch ungeklärt.

Um herauszufinden, welche Zellen als Quelle für die IL-22-Produktion in Frage kommen könnten, wurden die Lungenzellen der Mäuse aus dem hier verwendeten Asthma-Modell isoliert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Zunächst wurde eine Färbung der spezifischen Oberflächenmoleküle durchgeführt. Darauf folgte eine intrazelluläre Färbung der isolierten Lungenzellen, um Zytokine zu detektieren. Es wurden folgende Zellpopulationen analysiert (in Klammern steht der zugehörige Detektions-Antikörper, der gegen das jeweilige Molekül gerichtet ist):

- Granulozyten (Gr-1, Ly.6G)
- Dendritische Zellen (CD11c)
- Natürliche Killerzellen und NKT-Zellen (NK1.1)
- hämatopoetische Stammzellen (Sca1, CD90)
- lymphoide Zellen (CD45)
- T-Helfer-Zellen (CD3, CD4)
- Zytotoxische T-Zellen (CD3, CD8)
- $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR)

Des Weiteren wurde die Expression der Moleküle CD25 und CD44 untersucht - aufgrund von lymphoiden Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems, welche unter anderem diese Oberflächenmoleküle und IL-22 und/oder IL-17 exprimieren [170].

Ergebnisse

Beispielsweise beschreiben Buonocore et. al intestinale IL-17-produzierende Zellen, die einen ähnlichen Phänotyp wie LTi-ähnliche Zellen („LTi-like cells“) aufweisen: IL-7R⁺CD44⁺NKp46⁻CCR6⁺CD25⁺RORγ⁺.

Intrazellulär wurde auf die Zytokine IL-22, IL-17A und IFN-γ gefärbt. Der Transkriptionsfaktor RORγt, der unter anderem in unreifen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, in Th17-Zellen und in LTi-Gewebezellen exprimiert wird, konnte nicht direkt mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden. Deshalb wurde für die Detektion ein transgener Mausstamm („RORγ-eYFP²⁵-Reporter“ genannt) verwendet, bei dem alle Zellen, die im Laufe der Zeit den Transkriptionsfaktor exprimieren, parallel dazu das Protein YFP produzieren.

Es konnte eine erhöhte Anzahl an CD45 positiven IL-22-produzierenden Zellen in den sens/prov-Mäusen detektiert werden (Abb. 4-17 A und B). Die Mehrzahl der Zellen war negativ für die Oberflächenmarker CD4, CD8, NK1.1, CD11c, Gr-1 und den γδT-Zellrezeptor (γδTCR) und positiv für die Stammzellmarker hämatopoetischer Zellen, CD90 und Scal (Abb. 4-17 A und ungezeigte Daten) sowie für CD44 und CD25 (Abb. 4-18 A).

Diese IL-22-produzierenden Zellen können demnach gemäß den phänotypischen Oberflächenmarkern folgendermaßen charakterisiert werden:

CD45⁺Lin⁻Scal⁺CD44⁺CD25⁺RORγt⁺ ²⁶.

Um herauszufinden, ob diese Zellen mit den schon beschriebenen intestinalen Zellen in Verbindung gebracht werden könnten und um sie einer spezifischen Zellpopulation des angeborenen Immunsystems zuweisen zu können, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden.

²⁵ eYFP = enhanced Yellow Fluorescent Protein

²⁶ Lin steht hier für Lineage (= Abstammungslinie) und wird als Bezeichnung für die Stammzellmarker der spezifischen Zelltypen verwendet. Durch diese Oberflächenmarker sind die unterschiedlichen Zellen des Immunsystems eindeutig charakterisierbar.

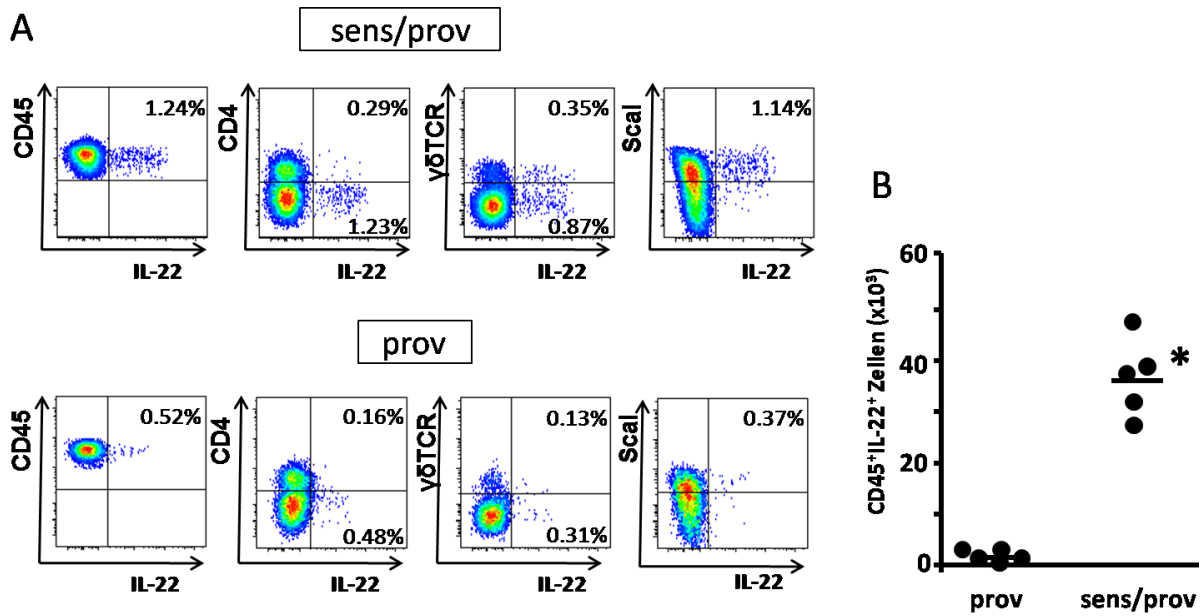


Abb. 4-17 Oberflächen- und intrazelluläre IL-22-Färbung von isolierten Lungenzellen

Repräsentative Darstellung der Oberflächen- und Intrazellulärfärbung von isolierten Lungenzellen aus provozierten (prov, n=5, untere Bildreihe) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov, n=5, obere Bildreihe) Wildtyp-Mäusen, 24 Std. nach der letzten OVA-Provokation. In (B) ist die Gesamtanzahl der CD45⁺IL-22⁺ Lungenzellen als „Dot Plot“-Diagramm dargestellt, wobei jeder Punkt repräsentativ für eine Maus aus 2 unabhängig durchgeführten Versuchen steht. *p<0,05 verglichen mit provozierten Kontroll-Tieren.

Ergebnisse

Des Weiteren zeigte sich, dass die IL-22-produzierenden Zellen auch ein wenig IL-17A und ROR γ t, jedoch kein IFN- γ , produzierten (Abb. 4-18 B, C).

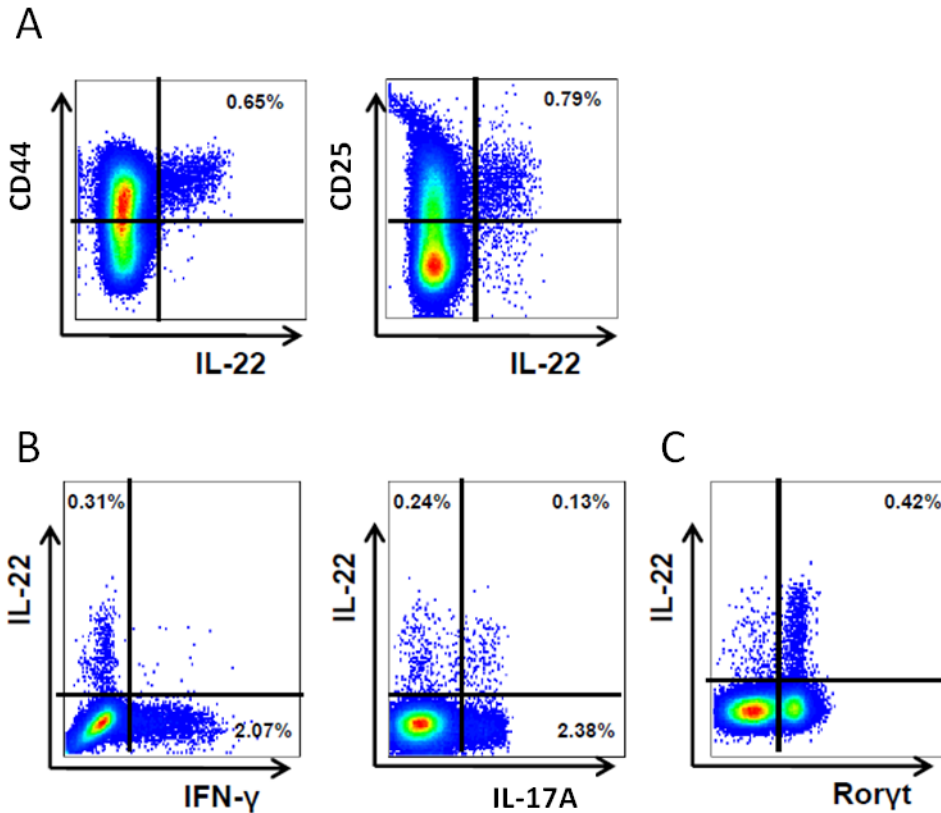


Abb. 4-18 Analyse der Zytokinproduktion und Oberflächenmoleküle von infiltrierenden Lungenzellen

Repräsentative Darstellung der Oberflächen- und Intrazellulärfärbung von isolierten Lungenzellen aus sensibilisierten und provozierten Mäusen, 24 Std. nach der letzten OVA-Provokation.

In (A) sind CD44⁺ und CD25⁺ Lungenzellen, die IL-22 produzieren, dargestellt. In (B) ist die IFN- γ -, IL-17A und IL-22-Produktion der Lungenzellen dargestellt. (C) zeigt die Expression von ROR γ t in IL-22-produzierenden Lungenzellen, isoliert aus sensibilisierten und provozierten ROR γ -eYFP-Mäusen. Analysiert wurden die Zellen hinsichtlich ihrer YFP-Expression, welche direkt vergleichbar mit der ROR γ t-Expression ist. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Expression des jeweiligen untersuchten Zytokins der gesamten untersuchten Lungenzellen.

5 Diskussion

Asthma bronchiale ist ein akutes Gesundheitsproblem, das etwa 300 Millionen Menschen weltweit betrifft und zählt mit einer dramatisch steigenden Prävalenz zu den häufigsten chronischen Erkrankungen [1]. Asthma ist nicht heilbar und die meisten Patienten benötigen eine lebenslange Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden und β -Sympathomimetika. Trotz dieser Behandlung kann es zu Verschlechterungen des Krankheitsbildes kommen, die einen stationären Aufenthalt und eine Therapie mit systemischen Kortikosteroiden notwendig machen und zu langfristigen pathologischen Prozessen der Lunge führen, welche die Lungenfunktion dauerhaft verschlechtern können. Aus diesen Gründen ist es dringend notwendig, neue Erkenntnisse über die Abläufe dieser Erkrankung, die involvierten Immunzellen und die beteiligten Proteine zu erlangen, die zu neuen Therapieansätzen führen können.

5.1 IL-22 fungiert als negativer Regulator bei der experimentell induzierten Asthma-Reaktion

Parallel zu dieser Forschungsarbeit wurden zwei ähnliche Studien zur Analyse des IL-22 bei der Asthma-Erkrankung durchgeführt. Diese erst kürzlich veröffentlichten und bislang einzigen Studien von Schnyder et al. [167] und Besnard et al. [171] unterstützen die aufgestellte Hypothese, dass IL-22 einen inhibierenden Einfluss auf die allergische Asthma-Erkrankung ausübt. Die 1. Studie (von Schnyder et al.) stützt sich allerdings auf die Annahme, dass der direkte Effekt von rekombinantem IL-22 auf *in vitro* differenzierte BMDCs aus WT-Mäusen für die beobachtete reduzierte AHR ausschlaggebend ist [167]. Die Aussage wird jedoch aktuell noch kontrovers diskutiert, da die Expression des IL-22-Rezeptors bislang noch nie in Dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte [133]. Diese Beobachtung konnte ebenfalls durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigt werden (Abschnitt 4.2.1). Hier konnte gezeigt werden, dass weder die für den membranständigen IL-22-Rezeptorkomplex essentielle IL-22R-Kette in BMDCs aus WT-Mäusen exprimiert wurde noch dass in mit rIL-22 behandelten BMDCs die IL-22-spezifische Signalkaskade über Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3

Diskussion

induziert wurde (Abschnitt 4.2.2.1). Auch die Analyse der mRNA, mit Hilfe der sensitiven qRT-PCR-Methode, zeigte keine Hochregulation des IL-22R-Gens in diesen Zellen, verglichen mit C22-Zellen, welche das Gen sehr stark exprimierten (Daten zu diesem Versuch sind nicht gezeigt).

In der oben genannten 1. Studie [167] wurde zur Untersuchung der Rolle des IL-22 bei der pulmonalen allergischen Immunantwort ein Mausmodell zur Induktion der allergischen AHR verwendet, das dem in dieser Arbeit vorgestellten sehr ähnlich war. Zusätzlich verwendete die Gruppe noch ein Modell mit transferierten BMDCs. Es wurden zwei Arten für die Sensibilisierung der Mäuse genutzt: zum einen wurde den Tieren das Allergen + Adjuvans-Gemisch (OVA/Alum) subkutan (s.c.) an den Tagen 0 und 7 injiziert und zum anderen wurden *in vitro* mit OVA behandelte BMDCs intravenös (i.v.) injiziert. Die s.c. behandelten Tiere wurden eine Woche nach der letzten Sensibilisierung, zweimal (an den Tagen 14 und 16) mit dem Modellallergen inhalativ provoziert und 48 Std. nach der letzten Provokation wurden die Lungen analysiert. Die einmal mit BMDCs sensibilisierten Mäuse, wurden dreimal (an den Tagen 8, 9 und 10) inhalativ mit OVA provoziert und nach 24 Std. analysiert. In der 2. Studie [171] wurde ein Mausmodell zur Induktion der allergischen AHR verwendet, in dem die Mäuse ausschließlich mit OVA (ohne Adjuvans) an den Tagen 0 und 7 s.c. sensibilisiert und an den Tagen 14, 15 und 16 intranasal provoziert wurden. Nach 24 Std. erfolgte die Analyse.

In dieser Forschungsarbeit konnte in Lungenlysaten und der BAL von WT-Mäusen, die nach dem vorgestellten Asthma-Modell behandelt wurden, eine erhöhte pulmonale Expression von IL-22 festgestellt werden (Abschnitt 4.1.1). Diese Beobachtung konnte durch die Ergebnisse der beiden Studien [167;171], bei denen die IL-22-Konzentration in Homogenisaten von Lungen aus s.c. sensibilisierten und provozierten Mäusen gemessen wurde, bestätigt werden. In Mäusen, die nicht sensibilisiert, sondern nur mit OVA provoziert worden waren und in unbehandelten Kontrolltieren, wurden keine erhöhten IL-22-Konzentrationen nachgewiesen. Dieses Ergebnis korrelierte ebenfalls mit den Beobachtungen der Gruppen [167;171]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die IL-22R-Kette in Lungenzellen der sensibilisierten und provozierten und der ausschließlich

Diskussion

mit OVA provozierten Mäuse unabhängig von der Entzündungsreaktion gleichermaßen reguliert wurde.

Um den Effekt des IL-22 bei der Asthma-Reaktion zu untersuchen, wurden IL-22-defiziente Mäuse hinsichtlich der Asthma-typischen Symptome analysiert. Als Kontrolltiere dienten jeweils WT-Mäuse. Es konnte eine signifikante Erhöhung des Atemwegswiderstands gegenüber einer Methacholin-Provokation in den IL-22-defizienten Mäusen beobachtet werden. Weitere Analysen der BAL-Zusammensetzung und der Lungenhistologie zeigten, dass erhöhte Mengen an inflammatorischen Zellen, darunter vermehrt Eosinophile, in der Lunge zu finden waren. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei IL-22-Defizienz eine stärkere Entzündung der Atemwege vorlag, als in WT-Tieren (Abschnitt 4.1.2). Dieses Ergebnis korrelierte jedoch nicht mit den Ergebnissen der 2. Studie, in der beschrieben wird, dass in IL-22-defizienten Mäusen eine Reduktion der AHR und reduzierte Mengen inflammatorischer Zellen in der BAL beobachtet wurden [171]. Allerdings wurde in den beiden oben genannten Studien gezeigt, dass in den analysierten Mäusen die Neutralisierung des natürlich vorkommenden IL-22 durch die Verwendung von anti-IL-22 Antikörpern während der aerosolischen Provokation mit OVA eine verstärkte Atemwegsentszündung bewirkte. Nachgewiesen wurde eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen und Neutrophilen in der BAL, erhöhte Aktivität der eosinophilen Peroxidase und verstärkte Produktion von Zytokinen und Chemokinen im Lungengewebe der Mäuse [167;171]. Dass IL-22 für die Induktion einer Neutrophilie in den Atemwegen eine Schlüsselrolle einnehmen könnte, konnte allerdings anhand einer weiteren Studie ausgeschlossen werden [140].

5.2 Asthma-assoziierte Mediatoren werden in pulmonaler IL-22-Abwesenheit in der Lunge von Wildtyp-Mäusen stärker exprimiert als in Anwesenheit des Zytokins

Da die induzierte Entzündungsreaktion der Atemwege auf dem Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Zytokine und Chemokine beruht und diese ein Mikromilieu bilden, welches für die Ausprägung der biologischen Eigenschaften des IL-22 verantwortlich ist, wurden die Genexpression und Sekretion einiger Proteine, die bei Asthma bronchiale eine

Diskussion

Schlüsselrolle spielen, in den IL-22-defizienten Mäusen näher untersucht. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus der Studie von Besnard et al. [171], konnte - mit Ausnahme des Proteins TSLP - eine deutliche Erhöhung der Genexpression und Produktion der untersuchten Proteine IL-13, CCL17, Eotaxin3, Gob5 und IL-33 in IL-22-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.3). Auffällig war, dass die Proteine in den meisten Fällen auf einem höherem Level in IL-22-defizienten Tieren (sens/prov) exprimiert wurden, verglichen mit den WT-Tieren (sens/prov). Im Fall des CCL17 war die Konzentration in den IL-22-defizienten Mäusen signifikant höher, als in den WT-Mäusen (Abb. 4-4 B). Diese Feststellung lässt vermuten, dass das Chemokin bei Asthma bronchiale eine starke Relevanz ausübt. Warum das Protein TSLP eine Ausnahme bildet und in den IL-22-defizienten Mäusen nicht erhöht sezerniert wird, ist in diesem Fall nicht zu erklären. Eine Vermutung ist, dass sich die Abwesenheit von IL-22 negativ auf die TSLP-Expression ausübt. Welcher Mechanismus allerdings hierbei betroffen sein könnte, kann nicht geklärt werden, da die WT-Tiere wie erwartet signifikant erhöhte Mengen des Proteins sezernierten. Die erhöhte Gob5-Regulation korrelierte mit den akkumuliert vorliegenden Becherzellen, die in den histologisch analysierten Lungenschnitten der IL-22-defizienten Mäuse (sens/prov), dargestellt in Abbildung 4-3 B, durch PAS-Färbung detektiert wurden. Gleiches gilt für die erhöhte Eotaxin3-Regulation, welche mit dem erhöhten Einstrom an Eosinophilen in die Lunge, nachgewiesen durch die Zählung der Zellen und die morphologische Analyse dieser Population in der BAL (Abb. 4-3 E und F), übereinstimmte. Die hohe CCL17-Konzentration im Lungengewebe wies daraufhin, dass vermehrt T-Lymphozyten in die Lunge gelockt wurden, was ebenfalls, wie in Abbildung 4-3 E zu erkennen ist, nachgewiesen werden konnte. Dass das immunsuppressiv wirkende IL-10 und das proinflammatorisch wirkende IFN- γ nach der Induktion der AHR hochreguliert wurde, konnte durch ELISA-Analysen der BAL ausgeschlossen werden. Es gab keine größeren Unterschiede bei der Expression beider Proteine in IL-22-defizienten und WT-Tieren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus der Studie von Besnard et al. [171].

Des Weiteren konnte, mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen der gesamten Lungenlymphozyten, eine leicht erhöhte Anzahl an IL-17A-produzierenden Zellen in den

Diskussion

Mäusen mit IL-22-Defizienz (sens/prov) detektiert werden, im Vergleich zu den WT-Tieren (Abb. 4-6 A, B). Da diese Population aber prozentual betrachtet nur in einer sehr geringen Zellzahl gegenüber allen Lungenlymphozyten vorlag und die IL-17A-Genexpression und -Produktion nicht mittels qRT-PCR und ELISA detektierbar waren, wies dies darauf hin, dass IL-17A nur in geringen Mengen in der Lunge von Atemwegserkrankten Mäusen aufzufinden war. Die nachgewiesene IL-4- und IL-5-Produktion (Abb. 4-5) stammte in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit von Th2-Zellen - den Hauptproduzenten - die bei der Atemwegsentzündung hohe Mengen dieser beiden Zytokine ausschütten. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Zytokine von anderen Zellen sezerniert wurden. Es wurde eine neu entdeckte Zellpopulation von Leukozyten des angeborenen Immunsystems beschrieben, welche die Fähigkeit besitzt IL-5, IL-13, IL-17 und/oder IL-22 zu produzieren. Diese so genannten „Nuocytes“ [173] wurden bei der experimentellen Induktion einer Asthma-ähnlichen Reaktion mit Hilfe von parasitischen Würmern entdeckt. Welche Zellen in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten für die Ausschüttung der beiden Zytokine IL-22 und IL-17A in Frage kommen könnten, wird später im Abschnitt 5.6 näher beschrieben. Insgesamt kann anhand der vorgestellten Ergebnisse aber klar herausgestellt werden, dass die pulmonale Abwesenheit von IL-22 in den Mäusen eine verstärkte Expression von Proteinen induziert, welche mit dem Schweregrad der Entzündung korreliert.

5.3 Bronchiale Epithelzellen fungieren als Zielzellen für IL-22 und ihre Stimulation wird durch den Einfluss des Zytokins gehemmt

Da viele der bei der Asthma-Erkrankung auftretenden Proteine, eingeschließend der im Abschnitt 5.2 erwähnten, von stimulierten Epithelzellen ausgeschüttet werden, lag der Fokus auf dem *in vitro*-Modell, der murinen Clara-Zell-Linie C22. Bislang wurden Epithelzellen als die Hauptzielzellen für IL-22 in der Literatur beschrieben. Dies konnte in Experimenten dieser Arbeit bestätigt werden, die zeigten, dass ausschließlich diese nicht-hämatopoetischen Zellen beide Ketten des IL-22R-Komplexes exprimierten, im Vergleich zu anderen untersuchten Zellpopulationen des Immunsystems (Abb. 4-8). Die Ausbildung der allergischen Atemwegserkrankung und damit die Entstehung einer AHR und

Diskussion

Becherzellhyperplasie, ist eng verbunden mit der Produktion der weiter oben beschriebenen Zytokine und Chemokine (siehe auch Einleitung Abschnitt 1.1.2.2). Besonders die T-Lymphozyten werden durch CCL17 in die Lunge gelockt und produzieren dort entzündungsfördernde Stimulanzen (wie beispielsweise die Zytokine IL-13 und TNF α), die auf die umliegenden Epithelien einwirken. Diese werden dadurch wiederum verstärkt aktiviert, so dass eine Vielzahl an Proteinen ausgeschüttet wird, die daraufhin mit weiteren Immunzellen reagieren und es zu Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen kommt. Es wurde schon nachgewiesen, dass IL-22 einen direkten Einfluss auf Epithelzellen ausübt (Abb. 4-8). Um die Mechanismen zu untersuchen, die durch die Bindung des IL-22 an seinen spezifischen Rezeptor ausgelöst werden, wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, der schon in murinen und humanen Epithelzellen des Darms und der Leber [80;138] beschrieben wurde und welcher spezifisch für IL-22 ist [66], analysiert. Es ist bekannt, dass IL-22 die Phosphorylierung von STAT1, 3 und 5 induziert. Dass IL-22 über die Phosphorylierung des STAT3-Moleküls sowie über den MAP-Kinase Weg (ERK1/2, SAPK/JNK, p38) fungiert, konnte in der pulmonalen Clara-Zell-Linie C22 ebenfalls bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die nicht zu erwartende, aber dennoch aufgetretene Detektion des phosphorylierten STAT3 in unstimulierten Zellen könnte sein, dass durch Wachstumsfaktoren oder andere Zytokine, die über die gp130 Zytokin-Familie interagieren und sich im Medium befanden, der Transkriptionsfaktor (ohne IL-22-Einfluss) phosphoryliert wurde [174]. Als nächstes konnte der IL-22-Effekt auf die C22-Zellen, die durch Stimulation mit IL-13, TNF α und einer Kombination aus beiden Stimulanzen in eine künstliche Asthma-ähnliche Entzündungssituation versetzt wurden, anhand der reduzierten Expression und Produktion des Chemokins CCL17 aufgedeckt werden (Abschnitt 4.2.3). Hierbei resultierte die Stimulation der C22-Zellen mit den proinflammatorisch wirkenden Zytokinen IL-13 und TNF α in einer erhöhten CCL17-Expression (Abb. 4-12 A, B, C). Interessanterweise ließ sich bei der Genexpression sowie der Proteinanalyse beobachten, dass ein basaler Level des Chemokins schon in den unstimulierten Epithelzellen exprimiert wurde, die Inkubation dieser Zellen mit rIL-22 allerdings auch hier eine Reduktion des Expressionslevels verursachte. Diese Ergebnisse ließen sich durch die Aktivierung der C22-Zellen mit dem Modellprotein LPS bestätigen, welches hier als ein Asthma-unabhängiger Stimulus eingesetzt wurde (Abschnitt 4.2.6).

Diskussion

Durch Neutralisation des rIL-22 mit Hilfe seines natürlich vorkommenden Antagonisten IL-22 Bindeprotein und durch einen spezifischen monoklonalen anti-IL-22 Antikörper, konnte ausgeschlossen werden, dass die durch rIL-22 ausgelöste Inhibierung der Chemokin-Produktion durch Mitwirkung eines anderen Suppressor-Proteins ausgelöst wurde (Abschnitt 4.2.5 und 4.2.6).

5.4 Direkte Effekte des IL-22 auf die bronchiale Clara-Zell-Linie C22

Im murinen OVA-Modell für allergisches Asthma wurden Umbauvorgänge des Atemwegepithels sehr schnell, schon 6 Stunden nach der Allergen-Provokation beobachtet. Die zu 80% im murinen respiratorischen Epithel ubiquitär vorhandenen Clara-Zellen transformieren in dieser Zeit, hauptsächlich induziert durch IL-13, zu Mukusproduzierenden-Becherzellen [175]. IL-13 ist ein Schlüsselzytokin, das für die Becherzellhyperplasie und Mukus-Produktion (durch Induktion der MUC5A/C-Expression) verantwortlich ist. Anhand der vorgestellten Analysen der relativen Genexpression von Gob5 (dem Vorläufer-Gen des MUC5A/C-Gens), IL-25 und TSLP, in den mit rIL-13 und rTNF α stimulierten C22-Zellen, konnte die oben beschriebene Situation bestätigt werden. Durch die IL-13-Stimulation wurde Gob5 stark und IL-25 signifikant erhöht exprimiert, während es in Anwesenheit von rIL-22 zu einer deutlichen Reduktion der Expression kam (vgl. Abb. 4-13 A und B). rTNF α bewirkte bei beiden Zytokinen keine signifikant erhöhte Expression (Daten nicht gezeigt). Da IL-25 direkten Einfluss auf die Induktion der Th2-Zytokin-Produktion, die pulmonale Eosinophilie und AHR ausübt [30;176], stimmten die *in vitro* Daten mit den zuvor *in vivo* beobachteten Ergebnissen der erhöhten Expression der Asthma-assoziierten Mediatoren, der erhöhten AHR und Becherzellhyperplasie (Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3) in den IL-22-defizienten Mäusen überein. Es konnte hier zum ersten Mal der negative Einfluss des rIL-22 auf die IL-25-Expression in der bronchialen Clara-Zell-Linie aufgezeigt werden. Die TSLP-Expression konnte durch beide Stimuli rIL-13 und rTNF α induziert werden, wobei auch hier die Anwesenheit von rIL-22 deutlich reduzierend auf die Expression und Sekretion des Zytokins einwirkte (Abb. 4-14). Die Analyse der IL-33-Genexpression und -Sekretion erbrachte keine Unterschiede in den untersuchten Gruppen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war für die Analyse der Epithelzellen allerdings zu erwarten, weil bekannt ist, dass sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit eines Stimulus,

Diskussion

IL-33 im Nukleus der Zellen gespeichert wird. Sobald die Zellen lysiert werden, kommt es zur Freisetzung des biologisch inaktiven (bei Apoptose) bzw. aktiven IL-33 (bei Nekrose). Es können demnach keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen hinsichtlich der IL-33-Expression festgestellt werden [172].

5.5 Die exogene Applikation von IL-22 während der Provokationsphase bewirkt eine Abschwächung der AHR

Wie schon unter Abschnitt 5.1 beschrieben, wurde parallel zu der hier durchgeführten Arbeit eine Studie publiziert, welche die Rolle von IL-22 bei Dendritischen Zellen analysierte [167]. Schnyder et al. untersuchten BMDCs, die *in vitro* mit OVA in An- und Abwesenheit von rIL-22 und rIL-17A inkubiert wurden, hinsichtlich der OVA-Aufnahme und ihrer Aktivierung über die Regulation der Oberflächenmoleküle DC80, CD86 und CD40. Anhand ihrer Ergebnisse postulierte die Gruppe, dass die Inkubation mit rIL-22 und mit rIL-17A eine reduzierte Aktivierung der BMDCs bewirkte, was anhand der reduzierten OVA-Aufnahme und erniedrigten Expression der Aktivierungsmarker auf den Zellen nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse ließen sich durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und durch die Ergebnisse von Besnard et al. [171] allerdings nicht bestätigen (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Paradoxerweise diente in der publizierten 1. Studie [167] das bislang als proinflammatorisch angesehene Zytokin IL-17A als Kontrolle zur Inhibierung der BMDC-Aktivierung. Es wurde zwar anhand mehrerer Mausmodell-Studien für AHR bislang vermutet, dass IL-17A essentiell für die Generierung einer allergischen Atemwegsentzündung ist, jedoch ausschließlich die oben genannte Studie besagt, dass IL-17A protektive Eigenschaften bei der induzierten allergischen Atemwegsentzündung aufweist [156]. Diese Gruppe war also bislang die einzige, die postulierte, dass die Th17-Zytokine IL-17 (A und F) und IL-22 in gleicher Weise negative Regulatoren bei allergischem Asthma sind [177]. Doch obwohl BMDCs als Hauptzielzellen für IL-22 angegeben wurden und der inhibierende Einfluss auf die AHR durch die *ex vivo* mit IL-22-behandelten BMDCs erklärt werden, die vor der OVA-Provokationsphase in die Mäuse transferiert wurden, kam es zu Übereinstimmungen mit Ergebnissen aus einigen der hier vorgestellten Experimente. Die IL-22-Anwesenheit resultierte in einer reduzierten

Diskussion

pulmonalen Anlockung von Eosinophilen. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen der Gruppe, die eine verminderte Aktivität der eosinophilen Peroxidase-Aktivität im Gewebe und eine reduzierten Produktion des Th2-Zell-anlockenden Chemokins CCL17 feststellten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Gruppe durch Verwendung von rIL-17A-behandelten BMDCs. Durch die intratracheale Gabe von rekombinantem IL-22 kurz vor der OVA-Provokation, konnte in dieser Forschungsarbeit sowie in der Studie von Besnard et al. in zuvor sensibilisierten Mäusen eine verminderte AHR, durch Messung des Atemwegswiderstands, eine Abnahme der Becherzellhyperplasie und eine Reduktion der IL-13- und CCL17-Produktion, verglichen mit den WT-Tieren, nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.1.4). Direkte Effekte des IL-22 auf glatte Muskelzellen in der Lunge, konnten bei der exogenen rIL-22-Gabe ausgeschlossen werden, da diese Zellen keinen IL-22R exprimierten (vgl. Abb. 4-8). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass in nicht sensibilisierten Mäusen, die mit rIL-22 behandelt wurden, keine Effekte bezüglich der Atemwegsentzündung auftraten (Daten nicht gezeigt). Obwohl diese Resultate zum Teil sehr ähnlich zu denen von Schnyder et al. waren, widersprechen sich die Hauptaussagen bezüglich der Zielzellen, auf die das rIL-22 Einfluss ausübt. Möglicherweise bindet rIL-22 an einen noch unbekanntem Rezeptor, der auch auf BMDCs exprimiert wird und dadurch andere Signalwege, als die bisher bekannten Wege über die MAP-Kinasen und STAT3-Phosphorylierung, aktiviert. Da in dieser Forschungsarbeit aber das Interesse an den hier als Hauptzielzellen in Frage kommenden bronchialen Epithelzellen lag, standen diese im Mittelpunkt der Arbeit. Weitere Untersuchungen von BMDCs im Zusammenhang mit rIL-22 bei allergischem Asthma müssten durchgeführt werden, um diese kontroversen Ergebnisse erklären zu können.

5.6 Identifizierung und Charakterisierung IL-22-produzierender Zellen in der Lunge von Mäusen nach induzierter AHR

Es ist bekannt, dass hauptsächlich Th17-Zellen für die Sezernierung der beiden Zytokine IL-17 und IL-22 verantwortlich sind. Hinweise auf eine wichtige Funktion dieser Zellen im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen finden sich z.B. in Nachweisen erhöhter Konzentrationen von IL-17 im Sputum von Asthma-Patienten [142] und erhöhten

Diskussion

Konzentrationen von IL-22 in der BAL bei verschiedenen entzündlichen Lungenerkrankungen beim Menschen [178]. Auch in T-Zellen aus Lymphknoten von Mukoviszidose-Patienten wurde eine erhöhte Produktion von IL-22 beobachtet. Im Mausmodell hat sich gezeigt, dass IL-22-defiziente Mäuse schlechter in der Lage sind, eine pulmonale Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* abzuwehren [162]. Da allerdings in letzter Zeit immer mehr neue Untergruppen von IL-22- und/oder IL-17-produzierenden Zellen gefunden werden (siehe auch Einleitung Abschnitt 1.1.5), die zum Teil auch dem angeborenen Immunsystem angehören, sollten in dieser Arbeit die IL-22-produzierenden Zellen in der Lunge bei Mäusen mit induzierter AHR identifiziert und charakterisiert werden (Abschnitt 4.3). IL-22-produzierende Zellen konnten in sensibilisierten und provozierten WT-Mäusen, nicht aber in den ausschließlich provozierten Kontrolltieren, detektiert werden. Diese Zellen waren positiv für den lymphoiden Immunzellmarker CD45 und für die Oberflächenmarker CD25 und CD44, jedoch konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Zellen keine der typischen Oberflächenmarker für lymphoide Zellen des adaptiven Immunsystems aufwiesen. Diese Zellpopulation sammelte sich, nach der Provokation mit dem Modellallergen, in der Lunge an und es konnte eine geringe Expression des Zytokins IL-17A, allerdings nicht von IFN- γ , festgestellt werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines ROR γ t-Reportermaus-Modells festgestellt, dass diese Zellen ebenfalls den Transkriptionsfaktor ROR γ t exprimierten. Der Phänotyp dieser Zellen ähnelt einer erst kürzlich beschriebenen intestinalen Zellpopulation des angeborenen Immunsystems, der ebenfalls die typischen Zelltyp-Marker für reife lymphoide Zellen fehlen und die für lymphoide Vorläuferzellen typische Rezeptoren exprimieren, welche in Zusammenhang mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors ROR γ t gebracht werden [179]. Es sind bislang verschiedene Zelltypen des angeborenen Immunsystems beschrieben worden [180]. CD90⁺ScaI⁺ lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems, wurden von Buonocore et al. im Darm von Mäusen aus einem Colitis-Modell beschrieben [181]. Diese Zellen werden von IL-23 induziert und exprimieren IL-17, IL-22 und IFN- γ . Es ist bekannt, dass ROR γ t notwendig für die Entwicklung von LTi-Zellen und IL-22-produzierenden LTi-ähnlichen Zellen ist [122;123;127;182]. Buonocore et al. fanden eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in den CD90⁺ScaI⁺ intestinalen lymphoiden Zellen [181]. Luci und Sanos et al. [122;123] identifizierten CD3⁺NKp46⁺ Zellen im murinen Darm, die

Diskussion

mehrere stimulatorische NK-Zell-Rezeptoren (wie NKp46) exprimieren, sich allerdings von diesen Zellen dadurch unterscheiden, dass sie weder die Fähigkeit besitzen Tumorzellen abzutöten noch IFN- γ nach vorheriger Stimulation zu exprimieren. Diese sogenannten „ROR γ t⁺NKp46⁺ Zellen“ sind allerdings fähig, relativ schnell IL-22 zu produzieren. Die Zellpopulation des murinen Darms (und eine ähnliche IL-22-produzierende Zellpopulation im humanen Darm [121;122]) scheint für den Erhalt der epithelialen Homöostase und Gewebeheilung relevant zu sein, da die Neutralisation von IL-22 oder die Depletion dieser Zellpopulation zu einer Inhibierung der Expression anti-mikrobieller Proteine (wie RegIII β , RegIII γ) führt [123].

In Bezug auf Lungenerkrankungen wurden bislang NKT-, $\gamma\delta$ T-Zellen und Th17-Zellen als IL-22-sezernierende Zellen beschrieben. Während $\gamma\delta$ T-Zellen als protektiv gegen eine ausgelöste Lungenfibrose durch induzierte IL-22-Ausschüttung [183] beschrieben wurden, wurden Th17-Zellen als Hauptproduzenten bei einer durch Bleomycin induzierten Atemwegsentzündungsreaktion deklariert [184]. Bei dieser Studie wirkt das IL-22 ohne die Mitwirkung von IL-17A entzündungsfördernd auf den Bleomycin-Stimulus, während es bei Zugabe von IL-17A zu einer entzündungslindernden Reaktion in den behandelten Mäusen kommt. Die in dieser Forschungsarbeit detektierten IL-22-produzierenden Lungenzellen nach induzierter AHR, waren größtenteils negativ für die Stammzellmarker von lymphoiden Zellen des adaptiven Immunsystems (wie oben schon beschrieben), einige CD4⁺ T- und $\gamma\delta$ T-Zellen konnten aber detektiert werden. Da die Hauptzellpopulation jedoch positiv für ScaI, CD45, CD25, CD44 und ROR γ t war, ist anzunehmen, dass diese zur Population der angeborenen lymphoiden Zellen zählt, welche schon zuvor im Darm beschrieben wurden, auch wenn die Zellen kein IFN- γ exprimierten. Die als „CD45⁺Lin⁻ScaI⁺CD44⁺CD25⁺ROR γ t⁺“ charakterisierten Zellen wurden bisher noch nicht bei Asthma bronchiale beschrieben. Da aber viele Parallelen zwischen dem Darm- und dem Lungenepithel gezogen werden können, liegt es nahe, dass es sich bei diesen Zellen um einen ähnlichen Phänotyp handelt.

5.7 Ausblick und heutiger Stand der Forschung zu möglichen Therapieansätzen

Im Hinblick auf die Asthma-Erkrankung gibt es schon eine Reihe vielfältiger Therapieansätze, die im Maussystem erfolgreich waren. Bis es zu klinischen Studien am Menschen kommt, vergeht jedoch lange Zeit und nur einige wenige Therapieansätze kommen letztendlich auch zum Einsatz. Auf eine recht neue und interessante Studie wird im Weiteren kurz eingegangen, weil die beschriebene „Zelltherapie“ mit dem suppressiv wirkenden IL-10 ebenfalls eine innovative Möglichkeit suggeriert, die aus dieser Forschungsarbeit gewonnen Erkenntnisse über das IL-10-verwandte Interleukin-22 als neue Therapieform einzusetzen.

Viele Studien zeigen, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) eine Schlüsselrolle beim Schutz vor Immunantworten auf harmlose Aeroantigene einnehmen [185]. Durch die Depletion dieser CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ T-Zellen im Mausmodell für experimentelles Asthma resultiert eine erhöhte AHR und Entzündung der Atemwege. Diese Reaktion zeigt, dass Tregs für die Inhibierung der Asthma-Symptome essentiell sind. Beim Menschen sind die allergenspezifischen IL-10-produzierenden T-Zellen allerdings nur bei gesunden nicht-Allergikern in hoher Anzahl vorhanden [186]. In Asthma-Patienten scheinen die vorhandenen Tregs ihre inhibitorischen Fähigkeiten verloren zu haben [19]. Es konnte gezeigt werden, dass BMDCs aus Wildtyp-Mäusen generiert wurden, die ein IL-10-Transgen besitzen [187]. Diese wurden *in vitro* mit OVA behandelt und durch einmalige intratracheale Injektion in Versuchsmäuse (vor der Sensibilisierungsphase) transferiert. Nach dem Transfer dieser „OVA-IL-10-DCs“ kam es zur transienten Genexpression von IL-10 in den Mäusen. Nachdem die Tiere mit OVA provoziert und im Anschluss analysiert worden waren, konnte festgestellt werden, dass sie eine verminderte AHR sowie eine reduzierte eosinophile Atemwegsentzündung und weitere reduzierte Asthma-Symptome aufwiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese BMDCs die Fähigkeit besitzen, eine lang anhaltende Antigen-spezifische Toleranz in experimentellem Asthma zu induzieren. Die BMDCs sind fähig, die Asthma-Reaktion zu unterdrücken und eine schon bestehende Reaktion zu inhibieren. Es konnte beobachtet werden, dass transferierte „OVA-IL-10-DCs“ in IL-10-defizienten Mäusen die Asthma-Reaktion nicht unterdrücken konnten. Dies zeigte, dass die transgenen BMDCs ihre regulatorischen Effekte zusätzlich über die Induktion von

Diskussion

natürlichen Tregs ausüben, wodurch die Asthma-Symptome durch einen IL-10-abhängigen Weg supprimiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass BMDCs IL-22 exprimieren (vgl. Abb. 4-8), wären diese Zellen für eine Therapie mit dem Zytokin geeignet. Könnte man, im Hinblick auf die vorgestellte „Zelltherapie“, BMDCs in Zukunft so generieren, dass sie in Asthma-Patienten zusätzlich zu IL-10 vermehrt IL-22 sezernieren würden, so könnte diese kombinierte Methode der Überexpression von pulmonal supprimierend wirkender Zytokine eine mögliche neue Therapiemöglichkeit darstellen. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass IL-22 als negativer Regulator bei der experimentellen Asthma-Erkrankung im murinen System fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinantem IL-22, sogar nach vorhergehender Sensibilisierung, eine reduzierende Wirkung auf die ausgelöste Atemwegshyperreaktion und Atemwegsentszündung induzierte. Diese Feststellung bietet neben der oben erwähnten Möglichkeit der „Zelltherapie“ ebenfalls Ideen für neue Möglichkeiten zur „inhalativen Therapieform“ mit IL-22 für Asthma-Patienten an.

6 Abkürzungen

a	anti
Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreaktion
Alum	Aluminiumhydroxid
Ak	Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMDCs	bone marrow derived dendritic cells
BMMCs	bone marrow derived mast cells
bzw.	beziehungsweise
CCR	CC chemokine receptors
CCL	CC chemokine ligand(s)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DC(s)	Dendritische Zelle(n)
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
ERK1/2	Extrazelluläre Signal-regulierbare Kinasen 1 und 2
etc.	et cetera
et al.	und andere
eYFP	enhanced Yellow Fluorescent Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-22BP	IL-22 Bindeprotein

Abkürzungen

IFN- γ	Interferon- γ
IRF4	interferon-regulatory factor 4
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
Jak1	Januskinase 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase(n)
LPS	Lipopolysaccharid
LTi cells	lymphoid tissue inducer cells
m	murin
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)
MEK	MAPK/ERK Kinase
mRNA	messenger RNA
ml	Milliliter
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
NK-Zelle(n)	natürliche Killerzelle(n)
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
OVA	Ovalbumin
pg	Pikogramm
p38	p38 mitogenaktivierte Protein Kinase(n)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
prov	provoziert
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
r	rekombinant
R	Rezeptor

Abkürzungen

RNA	Ribonucleic acid
RSK	ribosomale S6 Kinase(n)
ROR γ t	retinoic acid-related orphan receptor γ t
ROR α	retinoic acid-related orphan receptor α
RT	reverse Transkription
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinase(n)
sens	sensibilisiert
Std.	Stunde(n)
STAT	signal transducer and activator of the transcription
Tab.	Tabelle
Th	T-Helferzelle
TGF β	Transforming Growth Factor β
Tregs	regulatorische T-Zellen
TRAF	TNF receptor associated factor
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tyk2	Tyrosinkinase 2
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

1. Wilson DH, Adams RJ, Tucker G, Appleton S, Taylor AW, Ruffin RE. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. *Med J Aust* 2006; 184:226-9.
2. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151:297-307.
3. Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. *Curr Drug Targets* 2010; 11:957-70.
4. Robays LJ, Maes T, Joos GF, Vermaelen KY. Between a cough and a wheeze: dendritic cells at the nexus of tobacco smoke-induced allergic airway sensitization. *Mucosal Immunol* 2009; 2:206-19.
5. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, Zhu M, Iwakura Y, Savage PB, DeKruyff RH, Shore SA, Umetsu DT. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 2008; 205:385-93.
6. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368:804-13.
7. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
8. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:30-7.
9. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:761-71.
10. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:218-30.
11. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:749-86.
12. Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 2007; 217:168-85.

Literaturverzeichnis

13. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:676-80.
14. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1279-84.
15. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:478-86.
16. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med* 2008; 59:281-92.
17. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:59-75.
18. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 2007; 148:53-63.
19. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608-15.
20. Singh G, Katyal SL. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997; 17:141-3.
21. Singh G, Katyal SL. Clara cell proteins. *Uteroglobin/Clara Cell Protein Family* 2000; 923:43-58.
22. BOERS JAME, AMBERGEN ANTO, THUNNISSEN FRED. Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1585-91.
23. Elizur A, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Griffin GL, deMello DE, Senior RM. Clara cells impact the pulmonary innate immune response to LPS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:L383-L392.
24. Johansson S, Wennergren G, Aberg N, Rudin A. Clara cell 16-kd protein downregulates T(H)2 differentiation of human naive neonatal T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:308-14.
25. Hung CH, Chen LC, Zhang Z, Chowdhury B, Lee WL, Plunkett B, Chen CH, Myers AC, Huang SK. Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:664-70.
26. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Ziegler SF, Sarfati M, Delespesse G. Thymic stromal lymphopoietin is released by human

Literaturverzeichnis

- epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007; 204:253-8.
27. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, Robinson D, Zhang G, Zhao J, Lee TH, Corrigan C. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005; 174:8183-90.
 28. Nagata Y, Kamijuku H, Taniguchi M, Ziegler S, Seino K. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144:305-14.
 29. Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, Shu J, Suto E, Zhang J, Diehl L, Austin CD, Meng YG, Tan M, Bullens SL, Seeber S, Fuentes ME, Labrijn AF, Graus YM, Miller LA, Schelegle ES, Hyde DM, Wu LC, Hymowitz SG, Martin F. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest* 2007; 117:3868-78.
 30. Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007; 204:1509-17.
 31. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009; 15:410-6.
 32. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002; 169:443-53.
 33. Dolgachev V, Petersen BC, Budelsky AL, Berlin AA, Lukacs NW. Pulmonary IL-17E (IL-25) production and IL-17RB+ myeloid cell-derived Th2 cytokine production are dependent upon stem cell factor-induced responses during chronic allergic pulmonary disease. *J Immunol* 2009; 183:5705-15.
 34. Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, Hamid Q. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:590-6.
 35. Tamachi T, Maezawa Y, Ikeda K, Kagami S, Hatano M, Seto Y, Suto A, Suzuki K, Watanabe N, Saito Y, Tokuhisa T, Iwamoto I, Nakajima H. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:606-14.

Literaturverzeichnis

36. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1484-90.
37. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:103-10.
38. Silver MR, Margulis A, Wood N, Goldman SJ, Kasaian M, Chaudhary D. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm Res* 2010; 59:207-18.
39. Kearley J, Buckland KF, Mathie SA, Lloyd CM. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:772-81.
40. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van RN, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 2009; 183:6469-77.
41. Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, Lemiere C, Martin JG, Hamid Q. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 2009; 183:5094-103.
42. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1999; 11:81-8.
43. Kawasaki S, Takizawa H, Yoneyama H, Nakayama T, Fujisawa R, Izumizaki M, Imai T, Yoshie O, Homma I, Yamamoto K, Matsushima K. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 2001; 166:2055-62.
44. Berin MC, Eckmann L, Broide DH, Kagnoff MF. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:382-9.
45. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di LP, Casoni G, Bellettato C, Buonsanti C, Miotto D, Mapp C, Villa A, Arrigoni G, Fabbri LM, Sinigaglia F. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2001; 107:1357-64.
46. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2000; 165:2205-13.

Literaturverzeichnis

47. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, Hirai K. Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy* 2002; 57:173-7.
48. Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T. Synergistic effect of TNF-alpha and either IL-4 or IL-13 on VCAM-1 expression by cultured human corneal fibroblasts. *Cornea* 2003; 22:557-61.
49. Terada N, Nomura T, Kim WJ, Otsuka Y, Takahashi R, Kishi H, Yamashita T, Sugawara N, Fukuda S, Ikeda-Ito T, Konno A. Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1923-31.
50. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010; 11:577-84.
51. Pease JE, Williams TJ. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S212-S221.
52. Palmqvist C, Wardlaw AJ, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol* 2007; 151:725-36.
53. Nakanishi A, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Ashida Y, Shirafuji H, Fujisawa Y, Nishimura O, Fujino M. Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:5175-80.
54. Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Lin BP, Schofield B, Sealson SC, Li XM. Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1256-63.
55. Reuter S, Heinz A, Sieren M, Wiewrodt R, Gelfand EW, Stassen M, Buhl R, Taube C. Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. *Eur Respir J* 2008; 31:773-82.
56. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22:374-82.
57. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:267-72.
58. Ramos-Barbon D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 27:3-21.
59. Hamelmann E, Takeda K, Haczku A, Cieslewicz G, Shultz L, Hamid Q, Xing Z, Gauldie J, Gelfand EW. Interleukin (IL)-5 but not immunoglobulin E reconstitutes airway

- inflammation and airway hyperresponsiveness in IL-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:327-34.
60. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, Delespesse G, Nagai H. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:62-8.
61. Wang J, Palmer K, Lotvall J, Milan S, Lei XF, Matthaei KI, Gauldie J, Inman MD, Jordana M, Xing Z. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. *J Clin Invest* 1998; 102:1132-41.
62. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther* 2002; 94:185-211.
63. Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000; 164:1814-9.
64. Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, Muller RD, John T. Interleukin-10 and Articular Cartilage: Experimental Therapeutical Approaches in Cartilage Disorders. *Curr Gene Ther* 2009.
65. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
66. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000; 275:31335-9.
67. Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K, Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggle K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekhar YA. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; 104:9-19.
68. Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Peat JD, Vazquez N, Pestka S, Donnelly RP, Kotenko SV. Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* 2000; 1:442-50.
69. Jiang H, Su ZZ, Lin JJ, Goldstein NI, Young CS, Fisher PB. The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9160-5.

Literaturverzeichnis

70. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4:69-77.
71. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4:63-8.
72. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renaud JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 2001; 167:3545-9.
73. Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shah NK, Smirnov SV, Anantha S, Dickensheets H, Dumoutier L, Renaud JC, Zdanov A, Donnelly RP, Kotenko SV. Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* 2004; 172:2006-10.
74. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:315-24.
75. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21:241-54.
76. Sabat R, Wallace E, Endesfelder S, Wolk K. IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11:601-12.
77. Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:367-80.
78. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174:3695-702.
79. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom BE, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med* 2009; 87:523-36.
80. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkuhn T, Goke B, Auernhammer CJ, Dambacher J. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G827-G838.

Literaturverzeichnis

81. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129:969-84.
82. Gruenberg BH, Schoenemeyer A, Weiss B, Toschi L, Kunz S, Wolk K, Asadullah K, Sabat R. A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta. *Genes Immun* 2001; 2:329-34.
83. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 2001; 166:7096-103.
84. Wei CC, Ho TW, Liang WG, Chen GY, Chang MS. Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes Immun* 2003; 4:204-11.
85. Weiss B, Wolk K, Grunberg BH, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun* 2004; 5:330-6.
86. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, Dillon SR, Gao Z, Gilbert T, Madden K, Schlutsmeyer S, Yao L, Whitmore TE, Chandrasekher Y, Grant FJ, Maurer M, Jelinek L, Storey H, Brender T, Hammond A, Topouzis S, Clegg CH, Foster DC. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9511-6.
87. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 2001; 166:7090-5.
88. Jones BC, Logsdon NJ, Walter MR. Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure* 2008; 16:1333-44.
89. Logsdon NJ, Jones BC, Josephson K, Cook J, Walter MR. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22:1099-112.
90. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007; 178:5973-81.
91. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008; 118:534-44.

Literaturverzeichnis

92. Weber GF, Schlautkotter S, Kaiser-Moore S, Altmayr F, Holzmann B, Weighardt H. Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect Immun* 2007; 75:1690-7.
93. Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, Asadullah K, Volk HD, Sabat R. Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? *Genes Immun* 2005; 6:8-18.
94. Wilson MS, Feng CG, Barber DL, Yarovinsky F, Cheever AW, Sher A, Grigg M, Collins M, Fouser L, Wynn TA. Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J Immunol* 2010; 184:4378-90.
95. Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 2009; 206:2059-66.
96. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res* 2006; 16:902-7.
97. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271-9.
98. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445:648-51.
99. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:281-6.
100. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24:677-88.
101. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235-8.
102. Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007; 8:958-66.
103. Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2009; 39:1480-93.

Literaturverzeichnis

104. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33.
105. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441:231-4.
106. Spolski R, Leonard WJ. Cytokine mediators of Th17 function. *Eur J Immunol* 2009; 39:658-61.
107. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179-89.
108. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28:29-39.
109. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:41-52.
110. Liu Y, Yang B, Zhou M, Li L, Zhou H, Zhang J, Chen H, Wu C. Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol* 2009; 39:1472-9.
111. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; 9:650-7.
112. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:3-19.
113. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10:857-63.
114. Ciric B, El-behi M, Cabrera R, Zhang GX, Rostami A. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Immunol* 2009; 182:5296-305.
115. Hamada H, Garcia-Hernandez ML, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL, Dutton RW. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 2009; 182:3469-81.

Literaturverzeichnis

116. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002; 168:5397-402.
117. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1244-52.
118. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009; 31:321-30.
119. Monteleone G, Pallone F, Macdonald TT. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20:185-91.
120. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009; 31:331-41.
121. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457:722-5.
122. Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, Hardwigsen J, Anguiano E, Banchereau J, Chaussabel D, Dalod M, Littman DR, Vivier E, Tomasello E. Influence of the transcription factor ROR gamma t on the development of NKp46(+) cell populations in gut and skin. *Nature Immunology* 2009; 10:75-82.
123. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, Diefenbach A. ROR gamma t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46(+) cells. *Nature Immunology* 2009; 10:83-91.
124. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008; 29:958-70.
125. Satoh-Takayama N, Dumoutier L, Lesjean-Pottier S, Ribeiro VS, Mandelboim O, Renaud JC, Vosshenrich CA, Di Santo JP. The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *J Immunol* 2009; 183:6579-87.
126. Norian LA, Rodriguez PC, O'Mara LA, Zabaleta J, Ochoa AC, Cella M, Allen PM. Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism. *Cancer Res* 2009; 69:3086-94.

Literaturverzeichnis

127. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, Fibbe WE, Cornelissen JJ, Spits H. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127(+) natural killer-like cells. *Nature Immunology* 2009; 10:66-74.
128. Marchesi F, Martin AP, Thirunarayanan N, Devany E, Mayer L, Grisotto MG, Furtado GC, Lira SA. CXCL13 expression in the gut promotes accumulation of IL-22-producing lymphoid tissue-inducer cells, and formation of isolated lymphoid follicles. *Mucosal Immunol* 2009; 2:486-94.
129. Crellin NK, Trifari S, Kaplan CD, Cupedo T, Spits H. Human NKp44+IL-22+ cells and LTi-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells. *J Exp Med* 2010; 207:281-90.
130. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, Littman DR, O'Shea JJ. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med* 2009; 206:35-41.
131. Goto M, Murakawa M, Kadoshima-Yamaoka K, Tanaka Y, Nagahira K, Fukuda Y, Nishimura T. Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22. *Cell Immunol* 2009; 254:81-4.
132. Wahl C, Wegenka UM, Leithauser F, Schirmbeck R, Reimann J. IL-22-dependent attenuation of T cell-dependent (ConA) hepatitis in herpes virus entry mediator deficiency. *J Immunol* 2009; 182:4521-8.
133. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:365-79.
134. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162:5337-44.
135. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, Khatcherian A, Gonzalez J, Pierson KC, White TR, Pensabene C, Coats I, Novitskaya I, Lowes MA, Krueger JG. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; 159:1092-102.
136. Kawaguchi M, Onuchic LF, Huang SK. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, but not p38 and c-Jun N-terminal kinase, is involved in signaling of a novel cytokine, ML-1. *J Biol Chem* 2002; 277:15229-32.
137. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-

Literaturverzeichnis

- 10R2 chain (IL-10R β) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 2001; 276:2725-32.
138. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002; 277:33676-82.
139. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol* 2010; 31:354-61.
140. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CM, Wright JF, Fouser LA. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* 2007; 179:7791-9.
141. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 2003; 97:726-33.
142. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 2006; 7:135.
143. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1185-7.
144. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1293-8.
145. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007; 8:369-77.
146. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; 190:624-31.
147. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorasio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119:3573-85.

Literaturverzeichnis

148. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999; 162:494-502.
149. Hartupee J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *J Immunol* 2007; 179:4135-41.
150. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 2008; 180:7423-30.
151. Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 Suppl 1:51-4.
152. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol* 2010; 184:1663-74.
153. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, Mathieu C, Ceuppens JL. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:42-50.
154. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZH. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 2008; 181:6117-24.
155. Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:720-30.
156. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006; 203:2715-25.
157. deMello DE, Mahmoud S, Ryerse J, Hoffmann JW. Generation and characterization of a conditionally immortalized lung clara cell line from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; 38:154-64.
158. Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Cutting edge: an IL-17F-CreEYFP reporter mouse allows fate mapping of Th17 cells. *J Immunol* 2009; 182:1237-41.

Literaturverzeichnis

159. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, Matthys P. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 2009; 60:390-5.
160. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009; 206:1465-72.
161. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 2004; 39:1332-42.
162. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14:275-81.
163. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008; 14:282-9.
164. Nagalakshmi ML, Rasclé A, Zurawski S, Menon S, Waal Malefyt R. Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *International Immunopharmacology* 2004; 4:679-91.
165. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; 27:647-59.
166. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006; 36:1309-23.
167. Schnyder B, Lima C, Schnyder-Candrian S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine* 2010; 50:220-7.
168. Melillo JA, Song L, Bhagat G, Blazquez AB, Plumlee CR, Lee C, Berin C, Reizis B, Schindler C. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J Immunol* 2010; 184:2638-45.
169. Kim HB, Kang MJ, Lee SY, Jin HS, Kim JH, Kim BS, Jang SO, Lee YC, Sohn MH, Kim KE, Hong SJ. Combined effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 polymorphisms on bronchial hyperresponsiveness in Korean children with asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:774-80.

Literaturverzeichnis

170. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; 12:21-7.
171. Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, Renauld JC, Willart M, Lambrecht B, Teixeira MM, Charron S, Fick L, Erard F, Warszawska K, Wolk K, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D. Dual Role of IL-22 in Allergic Airway Inflammation and its Cross-Talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med* 2011.
172. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:282-7.
173. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010; 464:1367-70.
174. Lim S, Caramori G, Tomita K, Jazrawi E, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 2004; 59:505-14.
175. Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, DeMayo FJ, Burns AR, Smith C, Reynolds SD, Stripp BR, Dickey BF. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:382-94.
176. Sharkhuu T, Matthaei KI, Forbes E, Mahalingam S, Hogan SP, Hansbro PM, Foster PS. Mechanism of interleukin-25 (IL-17E)-induced pulmonary inflammation and airways hyper-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1575-83.
177. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:821-6.
178. Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Millar AB. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:220-6.
179. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:479-89.
180. Veldhoen M, Withers DR. Immunology. Innate lymphoid cell relations. *Science* 2010; 330:594-5.
181. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010; 464:1371-5.

Literaturverzeichnis

182. Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* 2004; 5:64-73.
183. Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. gammadelta T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 2010; 207:2239-53.
184. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010; 207:1293-305.
185. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev* 2006; 212:238-55.
186. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. 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* 2004; 199:1567-75.
187. Henry E, Desmet CJ, Garze V, Fievez L, Bedoret D, Heirman C, Faisca P, Jaspar FJ, Gosset P, Jacquet AP, Desmecht D, Thielemans K, Lekeux P, Moser M, Bureau F. Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J Immunol* 2008; 181:7230-42.

Danksagung

Angaben zur Person

Erklärung