

**Suppression des allergischen Asthmas
durch regulatorische T-Zellen
- Mechanismen und potenzielle
therapeutische Ansätze**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Nina Dehzad

geb. am 3. Juli 1982 in Bad Kreuznach

Mainz, den 06.05.2011

Aus der
III. Medizinischen Klinik
Schwerpunkt Pneumologie
Universitätsmedizin Mainz

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der Promotion

11.08.2011

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit und sämtliche Ergebnisse selbstständig verfasst und erarbeitet wurden und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Mainz, den 06.05.2011

(Nina Dehzad)

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression.

Dehzad N, Bopp T, Reuter S, Klein M, Ullrich N, Stassen M, Schild H, Buhl R, Schmitt E, Taube C.

The Journal of Immunology 2009 Apr 1;182(7):4017-24.

Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2.

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

The Journal of Immunology 2011 Feb 15;186(4):2238-44.

Weitere Publikationen

Regulatory T cells in allergic asthma.

Dehzad N and Taube C

Allergologie 2008, Jahrgang 31, Nr. 6/2008, S. 213-220

Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, Kubach J, Reuter S, **Dehzad N**, Neurath MF, Reifenberg K, Schneider FJ, Schmitt E, Jonuleit H

Blood 2009 Aug 6; 114(6):1263-9.

Mast cells induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease.

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

International Archives of Allergy and Immunology 2010;151(3):214-22.

Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells.

Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E, Bopp T
 Immunity 2010 Aug 27;33(2):192-202.

Nationale und internationale Kongressbeiträge

- Mai 2008 **Der PDE4-Inhibitor Rolipram unterstützt die Treg-vermittelte Suppression im murinen Asthmodell.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, A. Heinz, M. Sieren, R. Wiewrodt, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. 20. Allergie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergie und Klinische Immunologie, Mainz
- Sept 2008 **Enhancement of Treg-mediated suppression by PDE4-inhibitor Rolipram in a murine model of asthma.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, A. Heinz, M. Sieren, R. Wiewrodt, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien, Österreich
- Okt 2008 **PDE4-inhibitor Rolipram supports Treg-mediated suppression in a murine model of Asthma.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, A. Heinz, M. Sieren, R. Wiewrodt, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. 18th European Respiratory Society Annual Congress 2008, Berlin
- Nov 2008 **Die Inhibition des intrazellulären cAMP-Abbaus verstärkt entscheidend die supprimierende Wirkung regulatorischer T-Zellen auf Th2-induzierte Immunantworten im murinen Asthmodell.**

-
- N. Dehzad**, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, A. Heinz, M. Sieren, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Freiburg
- März 2009 **PDE4 Inhibition verstärkt die supprimierende Wirkung regulatorischer T-Zellen auf Th2-induzierte Immunantworten im murinen Asthmodell.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, A. Heinz, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. 21. Allergie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergie und Klinische Immunologie, Mainz
- Mai 2009 **Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression of allergic airway disease.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, A. Heinz, M. Stassen, R. Buhl¹, E. Schmitt, C. Taube. American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA
- Sept 2009 **Regulatory T cells suppress more effective Th1-induced airway disease compared to Th2 responses.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, S. Korn, A. Heinz, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. 19th European Respiratory Society Annual Congress, Wien, Österreich
- Nov 2009 **Die Suppression regulatorischer T-Zellen ist effektiver in Th1-induzierten allergischen Atemwegserkrankungen verglichen zum Th2-vermittelten Krankheitsbild.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, A. Heinz, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Borstel

- März 2010 **Die Suppression regulatorischer T-Zellen ist effektiver in Th1-induzierten allergischen Atemwegserkrankungen verglichen zum Th2-vermittelten Krankheitsbild.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, A. Heinz, M. Stassen, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., Hannover
- Mai 2010 **Th1-induced allergic airway disease is more susceptible to nTreg-mediated suppression in contrast toTh2 responses.**
N. Dehzad, T. Bopp, S. Reuter, H. Martin, M. Jung, S. Korn, A. Heinz, M. Stassen², R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube. American Thoracic Society International Conference, New Orleans, USA
- Sept 2010 **IL-22 as a negative regulator of allergic airway disease.**
N. Dehzad, C. Tertilt, G. Gyülveszi, K. Kreymborg, K. Schneeweiß, E. Michel, S. Reuter, H. Martin, J.C. Renauld, R. Buhl, B. Becher, C. Taube. 20th European Respiratory Society Annual Congress, Barcelona, Spanien
- Nov 2010 **The role of IL-22 in allergic airway disease.**
N. Dehzad, C. Tertilt, G. Gyülveszi, K. Kreymborg, K. Schneeweiß, E. Michel, S. Reuter, H. Martin, J.C. Renauld, R. Buhl, B. Becher, C. Taube. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Berlin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.2	T-Zellen.....	6
1.2.1	Th1 und Th2 Zellen	6
1.2.2	Regulatorische T-Zellen (Tregs).....	8
1.2.3	Suppression von CD4 ⁺ T-Zellen durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ nTregs.....	10
1.2.4	Phosphodiesterase (PDE) 4.....	12
1.3	Tregs in Tiermodellen des allergischen Asthmas	15
1.4	Tregs in Patienten mit allergischem Asthma.....	18
1.5	Treg-basierte therapeutische Ansätze gegen allergisches Asthma	19
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien und Medienzusätze.....	26
2.1.4	Puffer und Medien	28
2.1.5	Enzyme	29
2.1.6	Zytokine	30
2.1.7	Antikörper.....	30
2.1.7.1	Antikörper für Zellseparation und –kultur.....	30
2.1.7.2	Antikörper für Durchflusszytometrie.....	32
2.1.7.3	ELISA-Antikörper	33
2.1.8	Histologische Reagenzien.....	33
2.1.9	Mausstämme	34
2.2	Methoden	35

2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.2.1.2	Anreinigung und Kultivierung von T-Zellen	37
2.2.1.2.1	Milzpräparation und Herstellung von Einzelzellsuspensionen	37
2.2.1.2.2	Zellseparation mittels MACS	37
2.2.1.2.3	Anreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen (nTregs).....	38
2.2.1.2.4	Aktivierung und Expansion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ nTregs	39
2.2.1.2.5	Anreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.....	40
2.2.1.2.6	Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen	41
2.2.1.3	Kokultivierung von T-Zellen.....	42
2.2.1.3.1	Bestimmung der Zellproliferation.....	43
2.2.1.4	Durchflusszytometrie.....	44
2.2.1.4.1	Zelloberflächenmarkierung für Durchflusszytometrie.....	45
2.2.1.4.2	Foxp3-Färbung für Durchflusszytometrie	46
2.2.1.4.3	Färbung intrazellulärer Zytokine.....	46
2.2.1.4.4	Durchflusszytometrische Zellseparation mit FACS.....	47
2.2.1.5	Proteinbestimmung mittels ELISA	48
2.2.1.5.1	Nachweis von Zytokinen mit Sandwich-ELISA	48
2.2.1.5.2	cAMP-ELISA.....	50
2.2.2	Experimentelle Tiermodelle	50
2.2.2.1	Vorbereitung der Zellen für Zelltransfer	51
2.2.2.2	Färbung der Th-Zellen mit CFSE	51
2.2.2.3	Modell einer akuten Atemwegserkrankung.....	52
2.2.2.4	Modell einer chronischen Atemwegserkrankung	54
2.2.3	Lungenfunktionsmessung	56
2.2.3.1	Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent™-System	58
2.2.3.1.1	Inbetriebnahme des flexiVent™-Systems.....	58
2.2.3.1.2	Durchführung der Messung und Auswertung	60
2.2.4	Entnahme der bronchoalveolären Lavage (BAL).....	61

2.2.5	Differenzierung von BAL Zellen mittels Zytospin	61
2.2.6	Präparation der Lungenzellen	62
2.2.7	Präparation des trachealen Lymphknotens (tLN).....	62
2.2.8	Histologie	63
2.2.8.1	Fixierung der Lunge für histologische Analysen	63
2.2.8.2	Paraffin-Einbettung der fixierten Lungen	63
2.2.8.3	Paraffin-Schnitte.....	64
2.2.8.4	Entparaffinierung der Präparate	64
2.2.8.5	Histologische Färbungen.....	64
2.2.8.5.1	H&E-Färbung (Hämatoxylin-Eosin)	64
2.2.8.5.2	PAS –Färbung (Perjodsäure-Leukofuchsin)	65
2.2.9	Statistische Analyse	66
3	Ergebnisse.....	67
3.1	Die nTreg-vermittelte Suppression von Th2 Zellen wird durch PDE4-Inhibition verstärkt.	67
3.2	Die Behandlung mit PDE4-Inhibitor verbessert die suppressive Fähigkeit der preTregs auf eine Th2-vermittelte AHR	70
3.3	Die kombinierte Gabe von preTregs und PDE4-Inhibitor reduziert die Th2-induzierte Eosinophilie in den Atemwegen.	73
3.4	PDE4-Inhibition und preTreg-Transfer verringern die Th2-induzierte Becherzellmetaplasie und Inflammation des Lungengewebes.....	74
3.5	Die Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor verstärkt die preTreg-vermittelte Erhöhung der cAMP-Spiegel in den Th2 Zellen in vivo.	77
3.6	In einem therapeutischen Modell reduzieren preTregs und PDE4-Inhibition die allergische Atemwegserkrankung.....	79
3.7	Die therapeutische Wirkung der cAMP-Stabilisierung wird auch durch andere PDE4-Inhibitoren vermittelt.	83
3.8	Auch die Th1-induzierte allergische Atemwegserkrankung wird durch preTregs beeinflusst.....	86
3.9	Im Gegensatz zur Th2-basierten Atemwegsentzündung wird die Th1-induzierte Inflammation in der Lunge durch preTregs effektiv supprimiert.	87

3.10	preTregs supprimieren die Akkumulation und Proliferation von Th1 und Th2 Zellen in der Lunge in vivo.	93
3.11	Die effektivere nTreg-vermittelte Suppression der Th1-induzierten Atemwegserkrankung kann nicht auf eine höhere lokale nTreg-Präsenz oder erhöhte cAMP-Spiegel in supprimierten Th1 Zellen zurückgeführt werden.....	96
3.12	Verglichen zu Th2 Zellen demonstrieren Th1 Zellen eine höhere Empfindlichkeit auf die nTreg-vermittelte Suppression in vitro.	100
4	Diskussion.....	104
4.1	Die höhere suppressive Kapazität der nTregs nach Voraktivierung ist auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus zurückzuführen.....	105
4.2	Die Inhibition des cAMP-Abbaus unterstützt die nTreg-basierte Suppression in vitro und im Modell der allergischen Atemwegserkrankung.....	106
4.3	Eine allergische Atemwegserkrankung kann nicht nur von Th2 Zellen sondern auch von Th1 Zellen hervorgerufen werden.....	109
4.4	Eine Th1-induzierte Atemwegserkrankung kann im Gegensatz zur Th2-geprägten Erkrankung durch preTreg-Gabe effektiv behandelt werden.....	111
4.5	Die effektivere nTreg-vermittelte Suppression der Th1-induzierten Atemwegserkrankung begründet sich weder in einer höheren lokalen nTreg-Präsenz noch in erhöhten cAMP-Spiegel in supprimierten Th1 Zellen.	113
4.6	Ausblicke.....	114
5	Zusammenfassung	117
6	Abstract	119
7	Literaturverzeichnis	121
8	Abkürzungsverzeichnis	134
9	Lebenslauf	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Beteiligung von T-Zellsubpopulationen an der Induktion diverser Phänotypen der allergischen Atemwegserkrankung.....	5
Abbildung 2:	Die nTreg-vermittelte Suppression CD4 ⁺ T-Effektorzellen.	14
Abbildung 3:	Nimmt die nTreg-vermittelte Suppression Einfluss auf unterschiedliche Phänotypen der allergischen Atemwegserkrankung?.....	22
Abbildung 4:	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ voraktivierte nTregs (preTregs) nach Anreinigung.....	40
Abbildung 5:	Zytokinproduktion isolierter und polarisierter CD4 ⁺ Th1 und Th2 Zellen. ...	42
Abbildung 6:	Zeitprotokoll des experimentellen Mausmodells einer akuten Atemwegserkrankung	54
Abbildung 7:	Zeitprotokoll des experimentellen Mausmodells einer chronischen Atemwegserkrankung	55
Abbildung 8:	Die invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent™-System.....	59
Abbildung 9:	Die PDE4-Inhibition in Th2 Zellen erhöht deren Empfänglichkeit für die nTreg-vermittelte Suppression.	68
Abbildung 10:	Durch PDE4-Inhibition wird die Suppressivität der preTregs durch Hemmung des cAMP Abbaus erhöht.	70
Abbildung 11:	Die Inhibition von PDE4 verstärkt die Fähigkeit der preTregs, die AHR in einem prophylaktischen, akuten Modell zu supprimieren.....	72
Abbildung 12:	Die Inflammation in der BAL ist signifikant reduziert, sobald PDE4 in Anwesenheit von preTregs inhibiert wird.....	74
Abbildung 13:	Die kombinierte Gabe von Rolipram und preTregs inhibiert die Entzündung des Lungengewebes und die Becherzellmetaplasie.....	75
Abbildung 14:	Die In vivo-Applikation von Rolipram verstärkt die nTreg-vermittelte Suppression durch Stabilisierung des cAMP-Gehalts in den Th2 Zellen. ..	78
Abbildung 15:	Die Applikation von preTregs hat im therapeutischen Modell nur marginale Effekte auf die AHR.....	80
Abbildung 16:	Die PDE4-Inhibition verstärkt die suppressive Fähigkeit der preTregs in einem therapeutischen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung...	82

Abbildung 17:	Der PDE4-Inhibitor Piclamilast verstärkt die suppressive Kapazität der preTregs in einem therapeutischen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung.	85
Abbildung 18:	preTregs zeigen eine höhere suppressive Kapazität in Th1-induzierter AHR verglichen mit Th2-vermittelter AHR.....	87
Abbildung 19:	preTregs haben keinen Einfluss auf die Th2-induzierte Akkumulation eosinophiler Granulozyten in der BAL, supprimieren aber effektiv die Th1-vermittelte neutrophile Infiltration.....	88
Abbildung 20:	Der Transfer von preTregs reduziert effizient die Th1-vermittelte Entzündung des Lungengewebes und die Th2-induzierte Becherzellmetaplasie.	90
Abbildung 21:	Die effektive, nTreg-basierte Suppression der Th1-induzierten AHR und Atemwegsinflammation ist ein dosisabhängiger Effekt.	92
Abbildung 22:	preTregs supprimieren die Einwanderung OVA-spezifischer Th1 und Th2 Zellen in die Lunge in vergleichbarem Maße.	94
Abbildung 23:	preTregs supprimieren in vivo effektiver die Zellproliferation der Th1 Zellen verglichen zu jener der Th2 Zellen.	95
Abbildung 24:	In Lunge und tLN waren in Th1/preTreg- und Th2/preTreg-Empfängern vergleichbare Mengen an nTregs detektierbar.	97
Abbildung 25:	In der Lunge werden von preTregs vergleichbare Mengen an cAMP auf Th1 und Th2 Zellen übertragen.	99
Abbildung 26:	Die höhere Sensibilität der Th1 Zellen auf die nTreg-vermittelte Suppression ist nicht auf einen verstärkten cAMP-Transfer in die supprimierte Zelle zurückzuführen.	100
Abbildung 27:	Die Proliferation der Th1 Zellen wird durch die nTreg-vermittelte Suppression stärker beeinflusst als die Th2 Zellproliferation.	101
Abbildung 28:	Im Vergleich zur Th2-gesteuerten Zytokinsekretion wird die Th1-basierte Zytokinproduktion von preTregs effektiver supprimiert.	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Geräte.....	23
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3	Chemikalien und Medienzusätze.....	26
Tabelle 4	Puffer und Medien.....	28
Tabelle 5	Enzyme.....	29
Tabelle 6	Zytokine	30
Tabelle 7	Antikörper für Zellseparation und -expansion	30
Tabelle 8	Antikörper für Zellkultur	31
Tabelle 9	Antikörper für Durchflusszytometrie	32
Tabelle 10	ELISA-Antikörper	33
Tabelle 11	Histologische Reagenzien.....	33
Tabelle 12	Mausstämme	34

1. Einleitung

Das Immunsystem hat zwei zentrale Aufgaben: Mit seinen Abwehrmechanismen schützt das Immunsystem den Organismus vor Pathogenen wie Viren, Bakterien und Parasiten. Außerdem bewahrt es den Körper davor, dass körpereigene, autoreaktive Zellen entstehen, die Autoimmunreaktionen auslösen können. Diese für den Organismus lebenswichtigen Funktionen werden in einem Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem ausgeübt. Das angeborene Immunsystem umfasst Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen und gilt als erste Verteidigungslinie gegen eindringende Krankheitserreger. Dendritische Zellen (DCs) gelten als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität. Sie nehmen Antigene im peripheren Gewebe auf und fungieren als antigenpräsentierende Zellen im Lymphknoten. Wird das Antigen dort von einer spezifischen T-Zelle erkannt, wird eine adaptive Immunantwort initiiert. Die T-Zelle wird aktiviert, sie proliferiert und differenziert zu einer antigenspezifischen T-Effektorzelle (z. B. Th1 oder Th2 Zelle), die dann mit Hilfe von freigesetzten Zytokinen und Chemokinen eine Immunantwort in Gang setzt. In welche T-Helfer (Th)-Subpopulation sich die CD4⁺ T-Effektorzellen differenzieren, entscheidet sich nach Art des präsentierten Antigens und nach dem zum Aktivierungszeitpunkt vorherrschenden Zytokinmilieu (1). Dominieren am Ort der Entzündung die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-12, ist eine Differenzierung der aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu IFN- γ produzierenden Th1 Zellen begünstigt, die vor allem gegen intrazelluläre Pathogene vorgehen können (2). IL-4 dagegen induziert die Entwicklung IL-4 produzierender Th2 Zellen, z. B. während einer Infektion mit großen, mukosalen Parasiten (3). Werden derartige Immunreaktionen von Antigenen ausgelöst, die eigentlich harmlos für den Organismus sind, spricht man von einer Überempfindlichkeit des Immunsystems, einer *Allergie*.

1.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist eine komplexe immunologische Erkrankung der Atemwege und die weltweit am weitesten verbreitete, chronische Erkrankung. Asthma ist bei etwa 5% der Erwachsenen und sogar 10% der Kinder nachweisbar. In

den häufigsten Fällen entwickelt sich die Krankheit bereits in der Kindheit, wobei sowohl exogene Auslöser (z. B. Virusinfektionen, Allergenexposition, Kontakt mit Lipopolysacchariden) als auch genetische Prädisposition (z. B. Atopie) zur Erkrankung beitragen können. Asthma bronchiale wird besonders charakterisiert durch chronisch entzündliche Veränderungen in Lunge und Atemwegen. Typische Symptome dieser Krankheit sind Kurzatmigkeit, Husten, erhöhte Atemwegsschleimproduktion, bis hin zu anfallsweiser Luftnot. Pathophysiologische Merkmale des Asthmas sind bronchiale Hyperreaktivität, bronchiale Entzündung und Atemwegsobstruktion. Auf die Reizung mit einer bronchokonstriktiven Substanz (z. B. Methacholin) reagieren die Atemwege von Asthma-Patienten im Gegensatz zu solchen von gesunden Menschen empfindlich, was als bronchiale Hyperreaktivität oder auch Atemwegsüberempfindlichkeit (*Airway hyperresponsiveness*, AHR) bezeichnet wird. In solchen Fällen sind die Atemwege verengt und der Atemwegswiderstand erhöht (4). Die bronchiale Hyperreaktivität kann nach diesem Prinzip mit einem Methacholin-Provokationstest nachgewiesen werden. Dabei wird der Patient steigenden Methacholinkonzentrationen inhalativ ausgesetzt und dann die Lungenfunktion (Spirometrie und Atemwegswiderstand) gemessen. Die bronchiale Entzündung beschreibt die Akkumulation inflammatorischer Immunzellen in den Atemwegen. T-Zellen, degranulierte Mastzellen, sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten und die Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine und Lipidmediatoren tragen zur Entzündungsbildung in der Lunge bei. Es kommt zur Schädigung des Atemwegsepithels und Hyperplasie bzw. Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur. In asthmatischen Patienten kann außerdem eine Becherzellmetaplasie mit erhöhter Mukusproduktion auftreten (5). Die bronchiale Obstruktion bezeichnet die Verengung der Atemwege und ist eine Folge der durch die Krankheit hervorgerufenen Hypersekretion von zähem Mukus, Flüssigkeitseinlagerungen in der Schleimhaut (Ödeme) und der Kontraktion der Atemwegsmuskulatur (Bronchospasmen). Erscheinungsbild und Schweregrad der Erkrankung sind im Asthma bronchiale sehr variierend. Grundsätzlich kann man zwei Asthmatypen differenzieren, die sich vor allem in ihrer Ätiologie unterscheiden: Das allergische und das nicht-allergische Asthma. Das nicht-allergische Asthma kann durch diverse äußere Reize ausgelöst werden. Dabei können Virusinfektionen, Medikamentenunverträglichkeit oder der Kontakt mit toxischen, atemwegsreizenden

Substanzen zur Krankheitsbildung beitragen. Die Ausprägung dieses Asthmatyps steht in keinem Zusammenhang mit Atopie bzw. erhöhten IgE-Werten, sodass auch Nicht-Allergiker davon betroffen sind.

Das allergische Asthma gilt als die am weitesten verbreitete Asthmaerkrankung und wie andere Allergien haben sich Vorkommen und Ausprägung dieses Asthmatyps in den vergangenen 20 Jahren dramatisch gesteigert. Vor allem in industrialisierten Ländern hat sich seit 1980 die Rate der Neuerkrankungen fast verdoppelt, so dass etwa einer von 5 – 10 Individuen betroffen ist (6). Bei einer allergischen Atemwegserkrankung werden anfällige Individuen durch die Inhalation eines normalerweise unschädlichen, in der Umwelt vorkommenden Antigens sensibilisiert. Das Antigen wird dabei von atemwegsresidenten DCs aufgenommen, prozessiert und im trachealen Lymphknoten naiven T-Zellen präsentiert. Da die Lunge aufgrund des Gasaustausches ständig der Umwelt exponiert ist, finden sich dort auch Mastzellen als erste Verteidigungslinie gegen potenzielle Krankheitserreger, die unter anderem ihren Beitrag zum angeborenen Immunsystem leisten. Mastzellen besitzen auf ihrer Oberfläche eine große Zahl von Rezeptoren und enthalten intrazelluläre Granula mit einer Vielzahl vorgeformter immunoaktiver Substanzen, wie z. B. Histamin und Prostaglandine, die bei einer Mastzellaktivierung spontan ausgeschüttet werden können. Durch die Freisetzung dieser Mediatoren ist die Mastzelle jedoch nicht nur in der Lage, direkt gegen Pathogene vorzugehen, sondern auch die folgende adaptive Immunantwort zu beeinflussen. So können mastzellproduzierte Mediatoren das Mikromilieu in der Lunge verändern und dadurch einen Th1 oder Th2-induzierenden DC-Phänotyp fördern (7). Durch wiederholte Exposition mit dem Allergen wird die Krankheitsbildung des allergischen Asthmas gefördert. In nicht-allergischen Individuen hingegen bleibt ein solcher wiederholter Kontakt mit dem Umweltallergen ohne Folgen. Patienten mit allergischem Asthma zeigen mit AHR, chronischer Atemwegsentzündung, Atemwegsobstruktion und Mukusproduktion die klassischen Symptome eines Asthma bronchiale.

Als Grundlage für die Entwicklung des allergischen Asthmas wurde ein immunologisches Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-gesteuerten Immunantworten mit Neigung zu Th2-dominierten Reaktionen betrachtet (8,9). In diversen Studien wurde erkannt, dass vor allem Th2 Zellen als Vermittler dieser Atemwegserkrankung angesehen werden können, nicht zuletzt da in vielen Asthma-

Patienten erhöhte Th2-Zellproliferation und gesteigerte Mengen Th2-typischer Zytokine aufzufinden sind (8,10). Wird ein anfälliges Individuum gegen ein inhaliertes Allergen sensibilisiert, differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen zu allergenspezifischen Th2 Zellen, die dann als Folge einer erneuten Allergenexposition die Th2-typischen Effektorzytokine produzieren. Zu diesen Zytokinen des Th2-Phänotyps zählen IL-4 und IL-13, die gemeinsam die IgE Produktion der B-Zellen induzieren, während IL-4 zusammen mit IL-9 die Mastzellhomöostase begünstigt. IL-5 vermittelt die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und IL-9 hat in Kooperation mit IL-13 einen direkten, verstärkenden Effekt auf die Mukusproduktion und die AHR (11). Th1 Zellen inhibieren die Proliferation von Th2 Zellen und Th1-sezerniertes IFN- γ inhibiert die IgE-Synthese (12,13). Diese Tatsache führte in früheren Studien zu der Annahme, dass durch die Förderung einer Th1-gesteuerten Immunantwort in der Lunge die Entwicklung von allergischem Asthma verhindert werden kann (14,15). In den letzten Jahren stellte sich in Studien heraus, dass es sich beim allergischen Asthma um eine heterogene Krankheit mit variierenden Phänotypen handelt, die durch unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen induziert werden (16). Klinisch wurden bisher zwei unterschiedliche Phänotypen der Atemwegsentzündung charakterisiert: das eosinophile und das neutrophile Asthma.

In Humanstudien konnte gezeigt werden, dass nicht nur Th2, sondern auch Th1 Zellen zur Entwicklung einer Atemwegserkrankung beitragen können. Im Sputum von Patienten, die an akutem Asthma leiden, wurden neben einer Eosinophilie und erhöhten Mengen Th2-typischer Zytokine eine erhöhte Sputum-Neutrophilie und gesteigerte Mengen an IFN- γ nachgewiesen (17,18), was auf eine Th1-vermittelte Immunreaktion hinweist. Außerdem konnte in den bronchialen Epithelzellen dieser Patienten eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT-1 (*signal transducer of transcription 1*) nachgewiesen werden. IFN- γ vermittelt über diesen Transkriptionsfaktor seinen proinflammatorischen Einfluss (19). Auch in Tiermodellen wurde demonstriert, dass nicht nur Th2, sondern auch Th1 Zellen bei einer antigenspezifischen Atemwegsentzündung in die Lunge rekrutiert werden. Durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und den Immunglobulinwechsel zu IgG2a fördern Th1 Zellen das Krankheitsbild in der Lunge (20). Auch konnte gezeigt werden, dass allergenspezifische Th1 Zellen durchaus in der Lage sind, nach einer Allergenexposition schwere Entzündungen in den Atemwegen zu verursachen

(21). Neuere Studien demonstrierten, dass die Allergenprovokation der Atemwege sensibilisierter Mäuse zu einer vermehrten Expression sowohl von Th1- als auch von Th2-assoziierten Genen führte (22).

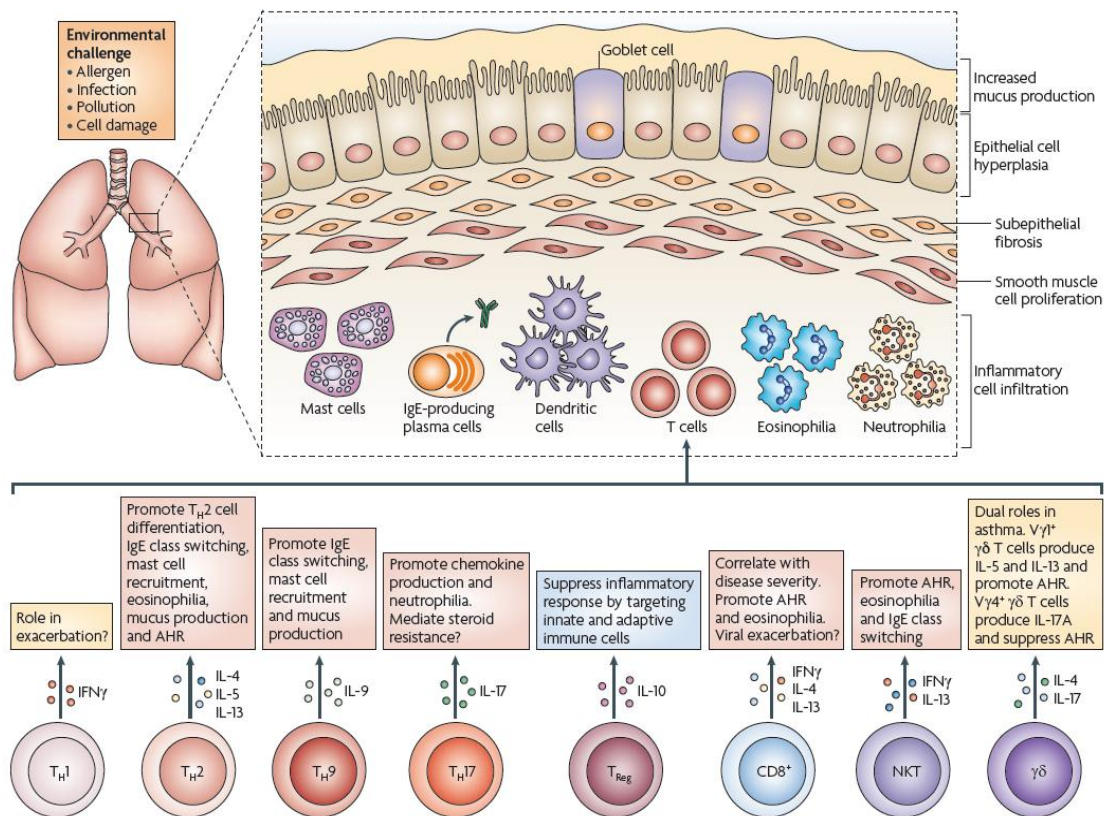


Abbildung 1: Beteiligung von T-Zellsubpopulationen an der Induktion diverser Phänotypen der allergischen Atemwegserkrankung

(Quelle: Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. CM Lloyd und EM Hessel. Nature Reviews Immunology 10, 838-848, 2010)

Die genetischen oder immunologischen Mechanismen, die solche Immunantworten regulieren, werden in zunehmendem Maße untersucht. Dennoch sind sie bislang nicht vollständig geklärt. Ethische Grundsätze erlauben nur eingeschränkte Untersuchungen mit Asthmapatienten, so dass Mausmodelle, in denen das charakteristische Krankheitsbild des allergischen Asthma bronchiale imitiert werden kann, näheren Aufschluss über die Erkrankung liefern sollen. Bei der Bewertung dieser Tierexperimente muss allerdings beachtet werden, dass Vorgänge im murinen

Organismus zwar Hinweise auf solche im humanen System geben, diese aber keineswegs als identisch angesehen werden sollten. Erst weiterführende Studien mit Asthmapatienten können die gefundenen Erkenntnisse bekräftigen.

Eine Asthmaerkrankung kommt bei Mäusen in ihrer natürlichen Lebensweise nicht vor. Es ist jedoch möglich in Mäusen mit einem intakten Immunsystem durch Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit einem definierten Antigen ein Asthma-ähnliches Krankheitsbild auszulösen. Die Sensibilisierung erfolgt dabei entweder lokal durch die Atemwege (intranasal) oder systemisch (intraperitoneal), während die Atemwegsprovokation meist lokal durch intranasale Behandlung oder Allergeninhalation durchgeführt wird. Durch wiederholten Kontakt mit dem Antigen entwickeln die sensibilisierten Tiere eine AHR, eine Atemwegsentszündung, d. h. Zellinfiltrationen in der Lunge und eine Becherzellmetaplasie. Nicht-sensibilisierte Tiere zeigen dagegen nach einer Atemwegsprovokation im Allgemeinen keine dieser Symptome.

Um Mäuse zu sensibilisieren, wurden als Antigene in bisher veröffentlichten Studien verschiedene Substanzen eingesetzt, wie z. B. Ovalbumin (OVA, Hühnereiweiß) oder Extrakte der Hausstaubmilbe. Die Immunisierung wurde wahlweise kombiniert mit der Gabe eines Adjuvans wie Alum (Aluminiumhydroxid) oder DMSO (Dimethylsulfoxid), um die Immunreaktion unspezifisch zu steigern (23). Adjuvanzen binden das gewählte Antigen und setzen es im Organismus verzögert frei, sodass die Antikörperbildung erhöht und die Immunantwort verstärkt wird. Bei der Wahl des Antigens sind vor allem die Beschaffungsbedingungen, die Erfahrungen im Umgang mit der Substanz und die im Tiermodell verwendeten Mausstämme ausschlaggebend. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde OVA als experimentelles Allergen gewählt und in entsprechenden Allergiemodellen Alum als Adjuvans eingesetzt.

1.2 T-Zellen

1.2.1 Th1 und Th2 Zellen

Aufgrund der zentralen Position der T-Lymphozyten in der Asthmaentwicklung, kann das Verständnis über die inflammatorischen und regulativen Mechanismen der T-Zellaktivitäten die Entwicklung neuer effektiver Therapieansätze unterstützen.

In Säugetieren entwickeln sich Lymphozyten in den zentralen, lymphatischen Organen. B- und T-Lymphozyten entstehen aus einer gemeinsamen, lymphatischen Vorläuferzelle aus dem Knochenmark. Dort findet die vollständige B-Zellentwicklung statt, während die Vorläufer der T-Zellen zur Reifung aus dem Knochenmark in den Thymus wandern, wo sie sich unter Wechselwirkungen mit Thymusstromazellen zu $CD3^+CD4^+$ oder $CD3^+CD8^+$ T-Zellen entwickeln. Vom Thymus migrieren die naiven T-Zellen zu den peripheren, lymphatischen Geweben, wie den Lymphknoten und der Milz, wo sie antigenpräsentierenden Zellen begegnen. In Folge einer Antigenpräsentation, beispielsweise durch DCs, können $CD4^+$ T-Zellen in unterschiedliche Effektorsubpopulationen differenzieren, wie z. B. in Th1 oder Th2 Zellen, aber auch in Th17 Zellen oder induzierte, regulatorische T-Zellen. Welcher dieser Subtypen gebildet wird, entscheidet sich durch das vorherrschende Zytokinmikromilieu und die Intensität der Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und präsentiertem Antigen (24). In dieser Arbeit waren Zellen des Th1 und Th2 Subtyps aufgrund ihres dominierenden Auftretens bei Asthmaerkrankungen von besonderem Interesse.

Für die Differenzierung in Th1 Zellen ist die Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ ausschlaggebend. Das proinflammatorische Zytokin IL-12 wird von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, produziert und IFN- γ stammt von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen. Ist die naive T-Zelle während einer Antigenpräsentation diesen Zytokinen ausgesetzt, kommt es durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-4, STAT-1 und T-bet (*T box transcription factor*) zur Th1-Polarisierung. Charakteristischerweise produzieren Th1 Zellen ihrerseits IFN- γ und tragen zur zellulären Immunabwehr gegen intrazelluläre Mikroorganismen bei (2).

Anders als IL-12 und IFN- γ induziert IL-4 die Entwicklung von Th2 Zellen, die z. B. aktiv gegen eine Infektion mit großen mukosalen extrazellulären Parasiten wie Helminthen vorgehen können (3). Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und tragen zur humoralen Immunantwort bei, indem sie die Immunglobulinbildung der B-Zellen beeinflussen. Für die Th2-Polarisierung ist die Aktivität des T-zellspezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 notwendig.

Differenzieren sich $CD4^+$ T-Zellen zu einem T-Helferzelltyp, wird gleichzeitig die Ausprägung eines anderen Th-Subtyps unterdrückt. Während der Th1-

Zelldifferenzierung kommt es durch eine von IFN- γ ausgelöste Signalkaskade zur Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und Runx3, die gemeinsam in der Zelle die Eigenproduktion von IFN- γ anregen. Parallel dazu blockieren sie die Genexpression von *il4* in Th1 Zellen und damit die Ausprägung des Th2-Phänotyps (25,26). Das Th2-Zytokin IL-4 beispielsweise hemmt den IL-12-abhängigen Signalweg anderer T-Zellen durch Inhibition der vollständigen IL-12-Rezeptorexpression und verhindert damit die Th1 Zelldifferenzierung (27).

1.2.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Da allergenspezifische Th2 und Th1 Zellen zentrale Rollen in der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Atemwegsentzündung spielen, stellen diese Zellen ein mögliches Ziel für neue therapeutische Ansätze gegen allergisches Asthma dar. In diesem Zusammenhang fokussierte die aktuelle Forschung die regulatorischen T-Lymphozyten, welche sowohl Aktivierung als auch Funktion von T-Effektorzellen, einschließlich Th1 und Th2 Zellen, supprimieren können. Als in den 60er und 70er Jahren die Thymusfunktionen und die Thymus-gereiften Lymphozyten (T-Zellen) untersucht wurden, war schnell klar, dass es neben Immunantwort-aktivierenden T-Zellpopulationen auch solche existieren, die regulative Funktionen einnehmen können (28). Diese Zellen tragen aktiv zu den immunologischen Toleranzmechanismen bei, indem sie körpereigene Immunreaktionen kontrolliert regulieren.

Anfänglich beschrieben als CD4⁺CD25⁺ Suppressorzellen wird diese Population heute als regulatorische T-Zellen (Tregs) oder genauer als natürliche Tregs (nTregs) bezeichnet, die vollständig im Thymus differenzieren. Die nTregs werden von den induzierten Tregs (iTregs, z. B. Tr1 oder Th3) unterschieden, die in der Peripherie aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen entstehen. Auch unterscheiden sie sich in ihren präferierten Suppressionsmechanismen und der Suppressionseffektivität. Während iTregs vornehmlich über die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 oder TGF- β wirken, vermitteln nTregs die Hemmung über einen zellkontaktabhängigen Mechanismus, der unten näher beschrieben wird. nTregs entwickeln sich im Thymus und nehmen 5 – 10% des peripheren Zellkompartiments der CD4⁺ T-Zellen ein. nTregs exprimieren konstitutiv CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-induced tumor*

antigen 4), GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) und das IL-2 Rezeptorprotein CD25. Da konventionelle CD4⁺ Effektorzellen nach ihrer Aktivierung ebenfalls verstärkt diese Oberflächenmoleküle exprimieren, ist es nicht möglich sie als exklusive Marker für die nTreg Population anzusehen. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box protein 3* (Foxp3) restringiert auf T-Zellen mit dem $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR) und suppressiver Aktivität (29,30). Demzufolge können durch die Expression von CD4, CD25 und Foxp3 nTregs von den T-Effektorzellsubpopulationen unterschieden werden. Im Gegensatz zu den nTregs verhält sich die Gruppe der in der Peripherie induzierten iTregs sehr heterogen in ihrer Fähigkeit CD25, GITR und Foxp3 zu exprimieren, sodass bislang keine spezifischen Oberflächenmarker identifiziert werden konnten (31). Es existieren sowohl Foxp3⁺CD4⁺, als auch Foxp3⁻CD4⁺ T-Zellen mit induzierter suppressiver Kapazität. Beispielsweise IL-10 sezernierende CD4⁺ Tr1-Zellen exprimieren konstitutiv kein Foxp3, können aber durch Aktivierung zur Expression des Transkriptionsfaktors angeregt werden (32,33).

Dass nTregs im Immunsystem eine wichtige Rolle spielen, wurde durch humane und murine Studien erkennbar. Frühe Depletionsexperimente führten zur Ausbildung starker Autoimmunerkrankungen in Mäusen, denen nTregs fehlten (34) und eine Mutation im Foxp3 Gen induziert in Mäusen einen deutlichen Phänotyp, der als *scurfy* (engl. für „schuppig“) bezeichnet wird. Diese Mäuse haben einen Defekt in der nTreg-Entwicklung und zeigen ein fatales lymphoproliferatives Ungleichgewicht resultierend in schweren Autoimmunerkrankungen (35). Analog dazu führt im Menschen die Genmutation in *foxp3* zur Entwicklung des IPEX-Syndroms (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome); einer seltenen monogenen Erkrankung, die meist begleitet wird von Diabetes mellitus und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Zusätzlich entwickeln IPEX-Patienten starke Allergien, was darauf hinweist, dass nTregs nicht nur in der Autoimmunität, sondern auch in der Regulation der Immunantworten auf exogene Allergene eine wichtige Rolle spielen. Bei männlichen Neugeborenen führt ähnlich wie bei *scurfy*-Mäusen das IPEX-Syndrom zum raschen Tod (36-38).

1.2.3 Suppression von CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs

Obwohl nTregs in der Forschung großes Interesse genießen, ist es bisher nicht gelungen, sich auf die genauen molekularen Mechanismen der Suppression zu einigen (39). In vitro- und In vivo-Studien lieferten unterschiedliche Resultate, weshalb der nTreg-basierte Suppressionsmechanismus auch heute noch ein kontroverses Thema darstellt. In vitro konnte anhand von Transwell-Experimenten, in denen nTregs und Effektorzellen räumlich getrennt waren, gezeigt werden, dass die suppressive Funktion von nTregs von einem Zell-Zell-Kontakt abhängt (40,41). Folglich konnte von einer direkten Interaktion zwischen nTregs und CD4⁺ T-Effektorzellen ausgegangen werden. In vivo-Experimente konnten ebenfalls eine direkte Interaktion zwischen nTregs und DCs verdeutlichen. Tang et al. waren in der Lage, mittels Zweiphotonenmikroskopie einen dauerhaften Zellkontakt zwischen nTregs und DCs in den peripheren Lymphknoten darzustellen (42). In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass der Transfer von zyklischem Adenosinmonophosphat (Adenosin-3',5'-Monophosphat, cAMP) im Mittelpunkt der Interaktion zwischen nTregs und CD4⁺ T-Effektorzellen steht (43).

Ein charakteristisches Merkmal der nTreg-vermittelten Suppression ist die Inhibition der *il-2* Genexpression in CD4⁺ T-Effektorzellen (44). IL-2 gilt in der antigenspezifischen Immunantwort als autokriner Wachstumsfaktor von CD4⁺ T-Zellen. Außerdem liefert das von den T-Effektorzellen sezernierte IL-2 einen parakrinen Effekt auf nTregs und steigert deren Proliferation und Suppressionskapazität (45). Dabei bilden nTregs mit T-Effektorzellen aus Proteinkomplexen bestehende Zell-Zell-Kanäle, so genannte *Gap junctions*, durch die ein interzellulärer Proteintransfer stattfindet. nTregs enthalten hohe Konzentrationen des sekundären Botenstoffs cAMP und diese Moleküle gelangen über die *Gap junctions* in die zu supprimierende T-Effektorzelle (43). cAMP übt als Signaltransduktionsprotein im Organismus je nach Zelltyp mannigfaltige Funktionen aus, u. a. trägt es zur Genexpression, zur Muskelkontraktion oder aber auch zur Neurotransmittersekretion bei. In T-Zellen bewirkt cAMP die Inhibition von Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation (46). Durch Einschleusen der cAMP-Moleküle von nTregs in die T-Effektorzelle wird der cAMP-abhängige Proteinkinase A-Signalweg in Gang gesetzt. Proteinkinase A (PKA) ist ein in der Zelle inaktiv vorliegendes Holoenzym, bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten, die mit

einem regulatorischen Dimer assoziiert sind. Lagern sich zwei cAMP-Moleküle paarweise an jede regulatorische Untereinheit, kommt es zu einer Konformationsänderung und die aktiven katalytischen PKA-Monomere spalten sich ab (47).

Die PKA kommt in T-Zellen in zwei Isoformen vor, Typ I PKA und Typ II PKA, die sich anhand der Isoformen und Splicevarianten sowohl der regulatorischen, als auch der katalytischen Untereinheiten unterscheiden. In humanen T-Zellen werden nur 10 – 20% der gesamten PKA-Aktivität von der Typ II PKA ausgeübt, während die Typ I PKA mit 80% die prädominante Isoform ausmacht (48). Studien mit genetisch modifizierten Mäusen haben sogar gezeigt, dass trotz einer Dysfunktion in der Typ II PKA normale Immunantworten generiert werden konnten, während die Funktionsfähigkeit der Typ I PKA als lebenswichtig erschien (49,50).

In ihrer aktiven Form ist die PKA in der Lage, ihre spezifischen Substrate zu phosphorylieren. Zu diesen Substraten gehört u. a. eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die das *cAMP responsible binding* Protein (CREB), den *cAMP response element modulator* (CREM) und den *activating transcription factor 1* umfasst (51). Die spezifische DNA-Zielsequenz der CREB-Proteine wird als *cAMP responsive element* (CRE) bezeichnet und besteht entweder aus einem 8-Basenpalindrom (5'-TGACGTCA-3') oder dem 5-Basenhalmotiv 5'-CGTCA-3'. Diese CRE-Sequenz konnte im Rattengenom in mehreren unterschiedlichen Genkategorien identifiziert werden. So fand man die CRE-Bindestelle in Genen codierend für Signalmoleküle, neuronassoziierte Moleküle, Transkriptionsfaktoren und Faktoren für Zellzyklus und Proliferation (52). Hieraus wurde ersichtlich, dass cAMP-aktivierte CREB-Proteine eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren. Auch in immunitätsrelevanten Genen wie *il-2*, *il-6*, *il-10* und *tnf- α* konnte anhand des CRE-Elements der Einfluss der CREB-Proteine identifiziert werden (53-55). Zur CREB-Familie und damit zu den PKA-Substraten zählt auch ein potenter Transkriptionsrepressor, genannt ICER (*inducible cAMP early repressor*). Ursprünglich wurden ICER ausschließlich physiologische Funktionen in der Hypothalamus-Hypophyse-Gonadal-Achse zugesprochen (56), bis dessen Vorkommen auch im Immunsystem entdeckt wurde (57). Obwohl die cAMP-aktivierte PKA vielfältige intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen kann und der genaue Suppressionsmechanismus von nTregs noch nicht vollständig geklärt ist, stellte sich

in neueren Studien heraus, dass ICER in der nTreg-vermittelten Suppression CD4⁺ T-Effektorzellen eine wichtige Rolle spielt. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen exprimieren relativ niedrige Mengen ICER, während nTregs aufgrund der Foxp3 Aktivität gesteigerte mRNA- und Proteinkonzentrationen von ICER aufweisen (58). Die Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehalts in CD4⁺ Effektorzellen durch Zell-Zell-Kontakt mit nTregs induziert eine verstärkte Expression und Translokalisierung von ICER in den Zellkern (59). In aktivierten CD4⁺ T-Effektorzellen kommt es zu einer verstärkten Expression der Transkriptionsfaktorfamilie NFAT (*nuclear factor of activated T cell*) und besonders der Isoform NFATc1, welches vom Zytosol in den Nukleus wandert und dort für die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine verantwortlich ist (60). ICER bindet spezifisch an multiple DNA-Bindestellen von NFAT (61). Durch die Bindung von ICER an die CRE-Sequenzen der Promotoren von *Nfatc1*, *il-2* und an weitere NFAT-gesteuerte Promotoren wird deren Expression und Transkriptionsaktivität attenuiert (62). Dies führt in den antigenspezifischen CD4⁺ T-Effektorzellen zur Beeinträchtigung der Zellproliferation und zu gehemmten proinflammatorischen Effektorfunktionen (46). In neueren Studien mit lymphozytenspezifischer Überexpression von ICER in transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die cAMP-vermittelte Suppression endogen exprimierter Th1- und Th2-Zytokine und Chemokine (MIP1 α , MIP1 β) mit der Induktion des Transkriptionsrepressors ICER korreliert (46).

cAMP als sekundärer Botenstoff bzw. die cAMP-aktivierte PKA kommt in zahlreichen Zelltypen vor und kann je nach Zelltyp unterschiedliche, intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. Als zentraler Bestandteil der nTreg-vermittelten Immunregulation könnte durch Modulation von cAMP-Synthese und cAMP-Metabolismus die nTreg-basierte Suppression manipuliert werden und damit als mögliche Behandlungsstrategie gegen Allergien oder Autoimmunerkrankungen dienen.

1.2.4 Phosphodiesterase (PDE) 4

3',5'-Cyclonucleotid-Phosphodiesterasen (PDE) sind Enzyme mit der Fähigkeit, zyklische Nukleotide zu hydrolysieren. Sie spalten je nach Substratspezifität z. B. cAMP zu 5'-AMP und können so die intrazelluläre cAMP-Homöostase aufrecht

erhalten. Die Proteinsuperfamilie der PDEs wird u. a. nach Aminosäuresequenz, Spezifität und Lokalisierung in 11 Enzymfamilien (PDE 1-11) unterteilt, die insgesamt mehr als 100 PDE-Enzymvarianten umfassen. Von diesen PDE-Familien wurden in T-Zellen mehrere Enzymvarianten der PDE1, 2, 3, 4, 5, 7 und 8 identifiziert (63,64). Die cAMP-spezifische PDE4-Familie beinhaltet 4 Subfamilien (PDE4 A – D) und gilt als prädominante Isoform in Immunzellen wie Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile und T-Zellen (65). In T-Zellen übernimmt PDE4 den Hauptteil des cAMP-Abbaus. Eine Stimulation von T-Zellen über ihren TCR gemeinsam mit einer starken Kostimulation über CD28 induziert die Rekrutierung der PDE4 zu den Lipid Rafts und führt zur verstärkten intrazellulären cAMP-Degradierung (66). cAMP gilt als Schlüsselmolekül in der nTreg-vermittelten Suppression von CD4⁺ T-Effektorzellen. Dies lässt vermuten, dass PDE4 durch die Substratumsetzung im Zytosol der nTreg-basierten Effektorzellhemmung entgegenwirkt. Aus diesem Grund erschien die Inhibition der PDE4 als eine Möglichkeit, die suppressive Kapazität von nTregs auf CD4⁺ T-Zellen zu stabilisieren und damit die Hemmung T-Zell-induzierter Immunreaktionen zu unterstützen (Abbildung 2). In der Forschung der vergangenen Jahre sind PDE-Inhibitoren immer mehr als möglicher Therapieansatz gegen Autoimmunerkrankungen und Allergien fokussiert worden. Dabei wirken PDE-inhibitorische Substanzen nicht zellspezifisch, sondern aufgrund der weiten Verbreitung der PDEs auf viele verschiedene Zelltypen. In den Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur ist nicht PDE4 sondern PDE3 das prädominante Isoenzym und PDE3-Inhibition führt im Gegensatz zur Hemmung der PDE4-Funktionen zur Relaxation der Atemwegsmuskulatur (67). In der Behandlung der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH, Lungenhochdruck) finden besonders PDE5-Inhibitoren (z. B. Sildenafil) Verwendung, da sie die glatte Gefäßmuskulatur entspannen und gefäßerweiternd wirken (68). PDE-Inhibitoren führen zu einer insgesamt erhöhten cAMP-Konzentration und fördern damit ein immunsuppressives Milieu. In einem Mausmodell einer Atemwegsinfektion von Hammad et al. konnte gezeigt werden, dass in der Lunge DCs eine suppressive Immunantwort durch iTregs vermitteln können, wenn der eigene intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht ist (69). Zusätzlich offenbarten Studien in Mausmodellen systemischer Allergensensibilisierung, dass die Behandlung mit PDE4-Inhibitoren effektiv die Entwicklung einer AHR und Atemwegsinfektion reduzieren kann (70). Die

genannten Experimente wurden mit Wildtyptieren durchgeführt, die ein vollständiges Immunsystem besaßen. Während einer Inflammation sind viele unterschiedliche Effektorzellen am Ort der Entzündung aufzufinden. Deshalb war es anhand dieser Daten nicht möglich, die beobachteten Effekte auf bestimmte Zelltypen einzugrenzen. Der direkte Einfluss der PDE4-Inhibition auf die nTreg-vermittelte Suppression war so nicht darstellbar.

Zu den klinisch entwickelten und vielfach in Studien eingesetzten, PDE4-spezifischen Inhibitoren zählen Rolipram, Roflumilast und Piclamilast. Rolipram, ein sehr spezifischer Inhibitor für PDE4, gilt als eine der ersten Entwicklungen, wird aber aufgrund zahlreicher Nebeneffekte wie Übelkeit und Brechreiz bislang hauptsächlich in der Forschung eingesetzt.

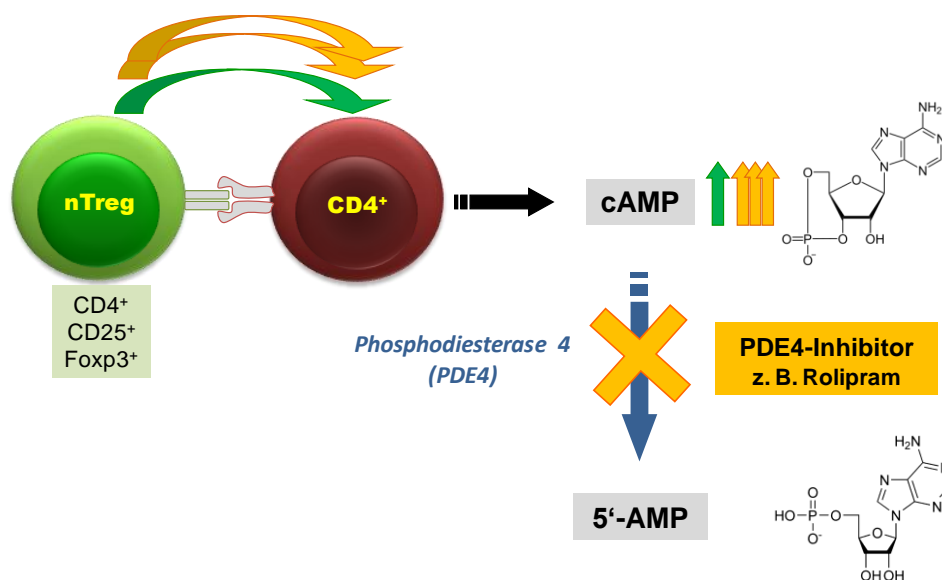


Abbildung 2: Die nTreg-vermittelte Suppression CD4⁺ T-Effektorzellen.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs supprimieren die Zellproliferation und Effektorfunktion von konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch einen zellkontaktabhängigen zytosolischen cAMP-Transfer (grüne Pfeile). Die cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4 (PDE4) wirkt durch Hydrolyse der cAMP-Moleküle zu 5'-AMP der Suppression entgegen. Durch Enzymblockade mittels PDE4-Inhibitor (z. B. Rolipram), akkumuliert cAMP in der Zelle, wodurch die nTreg-basierte Suppression unterstützt und verstärkt wird (orange Pfeile).

1.3 Tregs in Tiermodellen des allergischen Asthmas

Tiermodelle, insbesondere Mausmodelle allergischer Atemwegserkrankungen haben dazu beigetragen, dass einige grundlegende Mechanismen der allergischen Sensibilisierung und der Krankheitsbildung aufgedeckt werden konnten. Diverse unterschiedliche Studien haben auch die Rolle und Funktion von Tregs während der Sensibilisierungsphase und vor allem während der Ausbildung der Atemwegserkrankung und Toleranzentwicklung nach einer Allergenprovokation untersucht. Die Mechanismen, durch welche Tregs die Sensibilisierung gegen ein Antigen unterdrücken können, sind bis heute nicht geklärt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die In vivo-Depletion von CD25⁺ Zellen vor dem Kontakt mit einem Aeroallergen in allergieresistenten Mäusen eine signifikant gesteigerte Produktion Th2-typischer Zytokine, erhöhte IgE-Titer, Eosinophilie und AHR verursachte (71). Des Weiteren induzierte die Depletion CD25⁺ Zellen die Aktivierung pulmonaler DCs durch die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und MHCII (Haupthistokompatibilitätskomplex II). Außerdem produzierten diese residenten antigenpräsentierenden Zellen vermehrt das proinflammatorische Zytokin IL-12. In Folge fehlender Suppressoren kommt es also in atemwegserkrankten Tieren zu einer DC-Aktivierung. Dies lässt vermuten, dass in gesunden Individuen Tregs die DC-Aktivierung supprimieren und damit zumindest teilweise allergen-induzierte Immunantworten verhindern.

In anderen Studien wurden die Funktionen der nTregs in der Induktion und Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung in sensibilisierten Organismen untersucht. Anfänglich wurden Transfermodelle durchgeführt, in denen allergenspezifische T-Zellen in lymphozytendefiziente Tiere gebracht und folgend dem Allergen OVA ausgesetzt wurden. In einer frühen Studie wurden OVA-spezifische T-Zellen übertragen, aus denen im Vorfeld CD4⁺CD25⁺ T-Zellen depletiert wurden. Dieser Transfer führte zur Abschwächung einer Th2-vermittelten Atemwegsinfektion, verstärkte aber eine Th1-Immunantwort sowohl in vivo als auch in vitro (72). Da die CD25-Expression auch bei aktivierten T-Zellen vorkommt, ist anzunehmen, dass in diesen Experimenten bei der Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nicht nur Tregs sondern auch T-Effektorzellen entfernt wurden, was die beobachteten Effekten erklären könnte. Eine weitere Studie befasste sich mit dem adoptiven Transfer von ex vivo expandierten, allergenspezifischen Th2 Zellen, die

zuvor von CD25⁺ T-Zellen depletiert wurden. Nachdem die Empfänger der reinen Th2-Zellpopulation mit dem Allergen provoziert wurden, zeigte sich eine verstärkte Entzündung in den Atemwegen (73). In dieser Studie wurde dargestellt, dass nTregs die Th2-vermittelte Atemwegsentzündung modulieren, indem sie den Th2-Phänotyp supprimieren. Die genannten sowie weitere Studien demonstrierten zwar die Supprimierbarkeit einer Th2-induzierten Atemwegsinflammation durch nTregs, allerdings wurde auch beobachtet, dass dabei die Suppressoren keinen Einfluss auf die Entwicklung einer AHR nahmen (74). Neuere Arbeiten umfassten die Gabe allergenspezifischer nTregs in bereits sensibilisierte Wildtypmäuse kurz vor der Allergenprovokation. In diesem Modell führte der adoptive Transfer zu einer Reduktion der Atemwegsentzündung und der AHR (75). Auch wenn nicht-allergenspezifische nTregs transferiert wurden, konnte die Suppression einer allergenspezifischen Immunantwort beobachtet werden (76). Unter Verwendung verschiedener Modelle allergischer Atemwegserkrankungen zeigten diese Studien gemeinsam, dass der Transfer von nTregs in sensibilisierten Tieren die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung unterdrücken kann. Strittig ist allerdings noch, über welchen Mechanismus die nTregs in diesen Allergiemodellen in vivo agieren. Obwohl von nTregs angenommen wird, sie funktionierten über einen zellkontaktabhängigen Mechanismus (43), konnte auch gezeigt werden, dass die nTreg-vermittelte Suppression einer allergischen Atemwegserkrankung von der IL-10 Produktion abhängig ist (75). Aus IL-10 defizienten Mäusen isolierte nTregs waren in der Lage, eine allergische Entzündung zu supprimieren, indem sie andere CD4⁺ T-Zellen zur IL-10 Produktion anregten. Folglich ist die suppressive Eigenschaft von nTregs unabhängig von der eigenen IL-10 Produktion, induziert aber die Sekretion dieses immunregulatorischen Zytokins in anderen CD4⁺ T-Zellen. Die Hypothese, dass IL-10 in der nTreg-vermittelten Suppression einer allergischen Atemwegserkrankung eine wichtige Rolle spielt, wird auch von weiteren Studien unterstützt (69). Dennoch scheint die Bedeutung von IL-10 für die nTreg-Funktion zwischen den verschiedenen Modellen zu variieren. In einem Mausmodell einer chronischen Helminthen-Infektion konnten eine erhöhte Zellzahl der CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen und eine Reduktion der allergischen Atemwegsinflammation beobachtet werden. Blockierte man die Aktivität von IL-10 in vivo durch Gabe eines Antikörpers gegen den IL-10-Rezeptor, blieb die Suppression der Entzündung trotzdem bestehen

(77). In diesem Modell ist das immunregulatorische Zytokin IL-10 demnach nicht essenziell für die regulatorische Effizienz der nTregs.

Nicht nur nTregs sondern auch iTregs wurden in diversen Studien untersucht. Dabei wurde die Induktion von iTregs als möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung des allergischen Asthmas angesehen. Tatsächlich gelang es, allergenspezifische iTregs in unterschiedlichen experimentellen Modellen zu induzieren. In vitro ist es möglich, in Anwesenheit von TGF- β und IL-2 in naiven T-Zellen die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 zu induzieren. Transferiert man diese Zellen in Wildtypmäuse, inhibieren sie die Entwicklung einer Atemwegsinfektion in einem Modell der allergischen Atemwegsentzündung (78). Weitere Möglichkeiten in vivo antigenspezifische iTregs zu induzieren, sind die mehrfach wiederholte Exposition des respiratorischen Trakts mit dem Allergen (79), die Applikation des Allergens in Kombination mit einem immunantwortverstärkenden Adjuvans (80), die Behandlung mit mikrobiellen Komponenten (81) oder die Blockade des IL-6-Rezeptors (82). Alle diese Varianten induzierten die Entwicklung allergenspezifischer Foxp3⁺ Tregs mit der Fähigkeit, eine allergische Atemwegsentzündung und AHR zu supprimieren. So vielversprechend diese Strategien für therapeutische Maßnahmen auch erscheinen, haben sie einen großen Nachteil. Wie eine Studie in sensibilisierten Ratten zeigte, muss eine kontinuierliche Stimulation der erkrankten Individuen mit dem Allergen erfolgen, um in vivo die protektive Aktivität der iTregs aufrecht zu erhalten (83). Eine andere Studie stellte dar, dass während der Bienenzuchtsaison in der Haut nicht-allergischer Bienenzüchter nach mehrfachen Stichen mehr allergen- bzw. Bienengift-spezifische, IL-10 sezernierende iTregs nachweisbar waren als außerhalb der Saison (84). Sobald in beiden Studien die Allergenexposition unterbrochen wurde, kam es zur Abnahme der iTreg-Funktionen und erneuter Sensibilität gegenüber dem Allergen. Ähnlich den nTregs wurden auch für iTregs verschiedene mögliche Suppressionsmechanismen beschrieben, die die Oberflächenexpressionen von IL-10 oder TGF- β einbeziehen (78,79).

1.4 Tregs in Patienten mit allergischem Asthma

Im Gegensatz zu den vielfältigen, experimentellen Ansätzen, die Mechanismen zur Regulation des allergischen Asthmas zu untersuchen, ist die Menge der Humanstudien an erkrankten Patienten sehr begrenzt. Die meisten Studien, in denen sich mit der Funktion und dem Phänotyp von humanen Tregs befasst wurde, analysierten die Situationen in Patienten mit Atopie, also einer generellen Neigung zu allergischen Reaktionen, aber selten in Patienten mit allergischem Asthma. Des Weiteren gestalten sich Untersuchungen von allergie- oder asthmainhibierenden Mechanismen im humanen System komplizierter als in der Maus. Die in den vorigen Abschnitten aufgeführten spezifischen T-Zellmarker, wie beispielsweise für den OVA-transgenen TCR in Mäusen, können in Menschen nicht eingesetzt werden, was die Detektion von allergenspezifischen Immunzellen erschwert. Hinzu kommt, dass Foxp3 in Menschen nicht ausschließlich von Tregs exprimiert wird und bislang noch kein eindeutig Treg-spezifischer Marker im Menschen identifiziert werden konnte. Außerdem ist es in der aktuellen Forschung noch nicht gelungen, im Menschen eine Unterscheidung zwischen iTregs und nTregs in der Peripherie festzulegen. Aus diesem Grunde beschränkt man sich im humanen System generell auf die Bezeichnung *Tregs*.

Eine Untersuchung allergenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in humanem Blut aus der Peripherie identifizierte verschiedene Subpopulationen, die anhand ihres Zytokinprofils unterscheidbar waren. In gesunden Individuen dominiert im Allgemeinen eine Subpopulation IL-10 sezernierender T-Zellen, die spezifisch sind für allgemein vorkommende Umweltallergene. Im Gegensatz dazu nehmen in allergischen Patienten allergenspezifische, IL-4-produzierende Th2 Zellen den größten Teil der CD4⁺ T-Zellen ein (85). Gesunde und allergische Individuen weisen die gleichen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen auf, die aber in unterschiedlichen Proportionen vorliegen. Diese Daten weisen darauf hin, dass ein Ungleichgewicht zwischen Tregs und Th2 Zellen zur Anfälligkeit für allergische Erkrankungen wie Asthma beitragen könnte. Diese Befunde konnten durch weitere in vitro Analysen bekräftigt werden. Dabei wurden CD4⁺CD25⁺ Zellen aus Blutzellen der Peripherie (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) von Nicht-Allergikern depletiert, was in vitro eine verstärkte Th2-Antwort induzierte (86-88). Auch wurde erkannt, dass die Treg-Funktionalität in allergischen Patienten eingeschränkt ist. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

aus dem Blut atopischer Patienten zeigten verglichen mit nicht-atopischen Individuen eine signifikant reduzierte Suppressionseffizienz im Hinblick auf Zellproliferation und IL-5 Sekretion allergenstimulierter CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Diese Beobachtungen konnten vor allem in Heuschnupfenpatienten während der Pollenflugsaison gemacht werden (87,88). Ähnlich den bisher genannten Studien, haben sich die meisten Humanuntersuchungen mit den T-Zellen der Peripherie beschäftigt. Nur wenige Studien fokussieren sich auf die Treg-Population in der Lunge. Eine aktuelle Studie untersuchte die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der BAL von asthmatischen Kindern und verglich sie mit gesunden Kindern gleichen Alters (89). Kinder, die an Asthma leiden, weisen im Vergleich zu gesunden Kindern eine reduzierte Zahl an Tregs in der BAL auf. Außerdem waren die pulmonalen Tregs von Asthmatikern nur beschränkt fähig, die Proliferation und Zytokinproduktion von Th2 Zellen zu supprimieren. Somit zeigten diese Daten, dass asthmatische Kinder eine eingeschränkte regulative Immunantwort besitzen. Bislang sind allerdings noch keine entsprechenden Funde bei Erwachsenen gemacht worden. Dennoch bieten diese Studien einen Hinweis darauf, dass ein Mangel an allergenspezifischen Tregs zur Ausbildung des allergischen Asthmas beitragen könnte. Diesbezüglich sind mögliche Therapien von Interesse, in denen entweder allergenspezifische Tregs induziert oder die inhibitorischen Fähigkeiten der Suppressoren unterstützt werden.

1.5 Treg-basierte therapeutische Ansätze gegen allergisches Asthma

Tregs-involvierende Strategien zur Behandlung der allergischen Atemwegserkrankung könnten zwei Vorgehensweisen unterliegen: Einerseits kann versucht werden in vivo die Treg-Zellzahl und deren suppressive Funktionalität zu erhöhen, andererseits könnten ex vivo antigenspezifische Tregs generiert, vermehrt und durch einen adoptiven Transfer therapeutisch verabreicht werden. Aktuelle Therapien von Asthma-Patienten umfassen die Inhalation anti-inflammatorischer Substanzen (*Controllers*), wie z. B. Glucocorticosteroiden, und die Applikation von Bronchodilatoren (*Relievers*), wie z. B. Beta-2-Agonisten. Durch die Inhalation von Corticosteroiden ist es in der Tat möglich, die Symptome vieler Asthmapatienten zu regulieren. Corticosteroide induzieren die IL-10 Synthese in humanen T-Zellpopulationen und fördern damit einen inhibitorischen Effekt auf die T-

Zellaktivierung. Auf eine Behandlung mit dieser Substanz reagierten asthmatische Patienten mit einer gesteigerten Expression von mRNA für IL-10 und Foxp3 in Zellen des peripheren Bluts (90). Diese Funde unterstützend besaßen asthmatische Kinder nach einer Inhalation von Steroiden, verglichen mit unbehandelten, erkrankten Individuen, erhöhte Treg-Zahlen in der BAL. Interessant dabei war, dass die durch Steroidbehandlung vermehrte Treg-Menge mit jener von gesunden Kindern vergleichbar war (89). Diese Studien zeigten, dass eine Steroidbehandlung die Treg-Frequenz in Asthmatikern steigern kann – ein Effekt, der allerdings nur kurzfristig besteht. Bricht man die Behandlung ab, kehren mit Atemwegsinfektion und AHR die klinischen Symptome des allergischen Asthmas wieder. Trotz der eindeutigen Effekte der Steroidbehandlung existieren Asthmapatienten, die gegen Glucocorticosteroide resistent sind. Hawrylowicz et al. isolierten CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut dieser Patienten und setzten sie in vitro Steroiden aus. Daraufhin zeigten diese Zellen eine stark eingeschränkte Fähigkeit, eine IL-10 Sekretion zu induzieren (91). Fügt man der Kultur aber Vitamin D₃ hinzu, konnte die steroidinduzierte IL-10 Produktion vollständig hergestellt werden. Auch die orale Applikation des Vitamins induzierte in diesen Patienten eine verstärkte IL-10 Synthese isolierter CD4⁺ T-Zellen nach Steroid-Stimulation in vitro (92). Um diese Behandlungsstrategie zu etablieren, sind allerdings größere, klinische Patientenstudien notwendig.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz, der sich mit der Induktion von Tregs befasst, ist die spezifische Immuntherapie (SIT). Mehrere veröffentlichte Studien verdeutlichten die Induktion von Tregs durch SIT (93) und die Wirkung einer solchen Therapie wurde meist mit der Induktion von IL-10 (94) und IL-10 sezernierenden Tregs in Verbindung gebracht (95-97). Dennoch ist die Wirkung einer SIT auf das allergische Asthma sehr beschränkt, da beispielsweise die Lungenfunktion durch diese Behandlungsmethode nicht betroffen wird und noch weitere Studien notwendig sind, um die SIT als klinisch relevante Methode bezeichnen zu können (98).

Die Behandlungsstrategie, den Asthmapatienten ex vivo generierte bzw. modifizierte Tregs zu applizieren, ist mit vielen Hindernissen verbunden. Zunächst sei die Isolation dieser Zellpopulation aus den Patienten zu nennen, da der Treg-Anteil am peripheren menschlichen Blut mit etwa 0,7 – 5,5% äußerst gering ist und die Zellen keine signifikante Proliferation aufweisen (99). Dennoch ist es in neueren Studien gelungen, suppressionsfähige, humane Tregs zu isolieren und ex vivo zu

expandieren (100,101). Während einer Ex vivo-Expansion ist allerdings die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass sich gleichzeitig aufgrund einer unreinen Kultur autoreaktive T-Effektorzellen vermehren oder dass sich transformierende Viren in der Kultur befinden. Auch besteht das Risiko, dass kultivierte, polyklonale Tregs eine große Spezifitätensvielfalt gegenüber Antigenen aufweisen und ein Transfer solcher Zellen zu einer generellen *Bystander*-Immunsuppression im Patienten führen könnte. Dies würde chronische Infektionen und sogar Tumorentwicklungen begünstigen. Aufgrund der genannten Risiken ist ein adoptiver Transfer ex vivo expandierter Tregs in Asthmapatienten derzeit nicht vertretbar. Voraussetzung für die Anwendung einer solchen Methode wäre eine außerordentlich genaue Kontrollierbarkeit des Systems. Bis heute wurden keine Studien bezüglich der humanen Asthmaerkrankung veröffentlicht, in denen adoptive Treg-Transfers eingesetzt wurden (102).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Krankheitsbild des allergischen Asthmas ist heterogen und neuere Erkenntnisse demonstrierten, dass es diversen Phänotypen unterliegt. Diese Tatsache stellt eine große Hürde für die medizinische Forschung dar, gezielte und effektive therapeutische Maßnahmen zu entwickeln. In dieser Arbeit sollten im Speziellen die T-zellabhängigen Mechanismen des allergischen Asthmas in vitro und in vivo untersucht werden.

In den Lungen der meisten Asthmapatienten, vor allem in solchen mit allergischem Asthma, sind vermehrt allergenspezifische Th2 Zellen nachweisbar, weshalb dieser Subpopulation eine zentrale Rolle in der Krankheitsentwicklung zugesprochen wird (8). In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ermittelt werden, ob in vitro und in vivo in einem Mausmodell einer allergischen Atemwegserkrankung die Th2-basierte Immunreaktion durch den Einsatz von nTregs supprimiert werden kann. Für die in vivo Analyse wurde ein Tiermodell gewählt, welches die gezielte Induktion einer Th2-spezifischen Atemwegsentzündung und AHR ermöglichte. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die suppressiven Mechanismen in diesem Modell die für nTregs charakteristische cAMP-Abhängigkeit aufweisen. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese evaluiert, dass durch prophylaktische Behandlung mit PDE4-Inhibitoren die intrazellulären cAMP-Spiegel modifiziert und so die suppressive

Kapazität der nTregs verstärkt werden können. Um einen eventuellen kurativen Effekt der PDE4-Inhibitoren zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeit ein therapeutisches Mausmodell allergischer Atemwegserkrankungen verwendet.

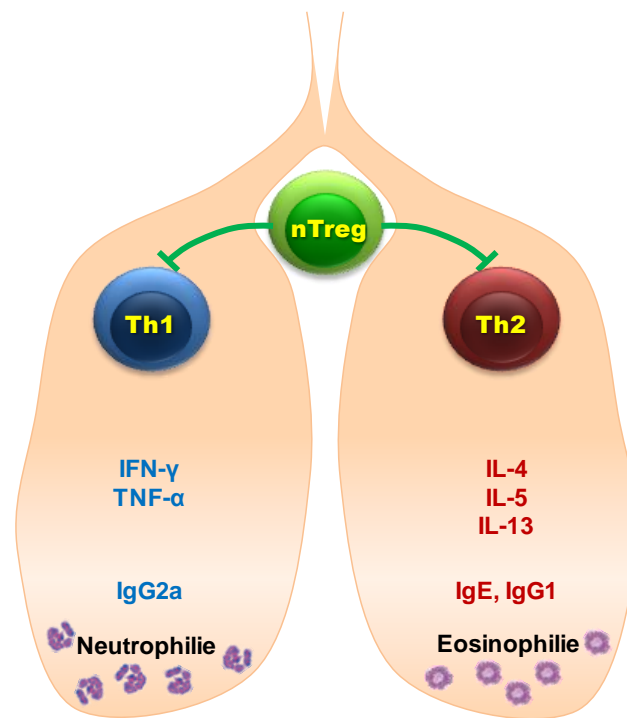


Abbildung 3: Nimmt die nTreg-vermittelte Suppression Einfluss auf unterschiedliche Phänotypen der allergischen Atemwegserkrankung?

Aufgrund der Heterogenität der Asthmaerkrankung, die mit unterschiedlichen Entzündungsphänotypen einhergehen kann, erschien es wichtig, die Effekte der nTreg-vermittelten Suppressionsmechanismen auf andere Phänotypen der Atemwegserkrankung zu analysieren. Diesbezüglich sollte durch Verwendung des T-zellabhängigen Mausmodells eine Th1-vermittelte Atemwegserkrankung induziert werden. In vivo und in vitro Ansätze sollten schließlich Aufschluss darüber geben, ob sich die unterschiedlichen Th-Population in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der nTreg-basierten Suppression unterscheiden (Abbildung 3).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Ausgießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek / USA
Digitalfeinwaage	Sartorius Analytic AC 210 S	Sartorius / Göttingen
Digitalwaage	Sartorius BP 310 S	Sartorius / Göttingen
Digitalwaage (Maus)	Sartorius Acculab Vicon	Sartorius, Göttingen
Durchflusszytometer	FACSCanto	Becton Dickinson / Heidelberg
Dynal-Magnetfeld, 15 ml	Dynal MPC™-15	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
Dynal-Magnetfeld, 50 ml	Dynal MPC™-50	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
Einbettstation	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek / USA
FACS Sorter	FACSVantage™ SE	Becton Dickinson / Heidelberg
Halbautomatisches Rotationsmikrotom	Cut 5056	SLEE / Mainz
Handstückzähler	EE53.1	Carl Roth / Karlsruhe
Infrarot-Wärmelampe	Philips R95E	Rossmann GmbH / Burgwedel
Inkubationsschrank	Hera Cell 150	Heraeus, Thermo Scientific / Dreieich
Kühlplatte	MPS/C	SLEE / Mainz
Lungenfunktionsmess-apparat	flexiVent™	SCIREQ / Montreal, Kanada
MACS™-Magnetfeld	quadroMACS™ MultiStand	Miltenyi Biotec / Bergisch-Gladbach
Magnetrührer	Tecnoflow	Integra Biosciences / Ruhberg
Maus-Fixierungskammer		FMI / Seenheim/Oberbeerbach

Mehrkanalpipette	12-Kanalpipette	Biohit / Rosbach v. d. Höhe
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus / Hamburg
Mikroskop mit Kamera	Olympus BX 40, Colorview	Olympus / Hamburg
Neubauer-Zählkammer	0,0025 mm ² / 0,1 mm Tiefe	VWR / Darmstadt
pH-Meter	pH 100	VWR / Darmstadt
Pipetten	1-10 µl / 10-100 µl / 50-200 µl / 200-1000 µl	Eppendorf / Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettus Akku	ICN Flow / Meckenheim
Präparierbesteck	Feinschere, Splitterpinzette, geknöpfte Gefäßschere, anatomische Pinzette	Aesculap / Tuttlingen
Rüttler	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein / Zürich, Schweiz
Spektralphotometer	Anthos Lucy 2	Anthos Mikrosysteme / Krefeld
Sterilbank	Tecnoflow	Integra Biosciences / Ruhberg
Tischzentrifuge	Minifuge GL	Heraeus Christ / Osterode
Tubus		Eigenherstellung
Vernebler	Ultrasonic Nebulizer Modell NE-U17	Omron / Mannheim
Verneblungskammer		Eigenherstellung
Wärmeplatte	MST	SLEE / Mainz
Wasserbad	ED 5A	Julabo Labortechnik / Seelbach
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf / Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf / Hamburg
Zytofuge	Shandon Cytospin 4	Thermo Electron Corporation / Pittsburgh, PA/USA
Zytofugen-Einsatzklammern	Shandon Cytoclip™ Slide Clip	Thermo Electron Corporation / Pittsburgh, PA/USA
Zytofugen-Probenkammern	Shandon TPX Sample Chamber	Thermo Electron Corporation / Pittsburgh, PA/USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Artikelname	Hersteller
Abdichtungsfolie	Parafilm N	Nationalcan™ / Chicago, USA
Deckglas	24 x 24 mm	Menzel / Saarbrücken
Deckglas	24 x 32 mm	Menzel / Saarbrücken
Einmalspritze, 1 ml	Omnican 1 ml	Braun / Melsungen
Einmalspritze, 1 ml	Injekt®, Tuberkulin	Braun / Melsungen
Einmalspritze, 10 ml	Discardit™ II	Becton Dickinson / Erembodegen, Belgien
FACS Röhrchen	PS-Röhrchen, 0,6 ml	Greiner / Frickenhausen
Kanüle, 0,4 x 12 mm	Sterican	Braun, Melsungen
Kanüle, 0,9 x 40 mm	Microlance™ III	Becton Dickinson / Erembodegen, Belgien
MACS Magnetsäule LS	Separation Columns LS	Miltenyi Biotec / Bergisch-Gladbach
Mikrotiterplatte, 96-Loch,	96 Vertiefungen, Flachboden	Nunc / Wiesbaden
Mikrotiterplatte, 96-Loch,	96 Vertiefungen, Rundboden	Nunc / Wiesbaden
Objektträger	Mattrand	Diagonal / Münster
Objektträger	Superfrost® Plus	Menzel / Saarbrücken
Petrischale, Ø 60 mm	Ø 60 mm Cellstar	Greiner / Frickenhausen
Petrischale, Ø 90 mm	Ø 90 mm Cellstar	Greiner / Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sicherheitsreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf / Hamburg
Reaktionsgefäß, 2 ml	Sicherheitsreaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf / Hamburg
Reaktionsgefäß, 15 ml		Greiner / Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 50 ml		Greiner / Frickenhausen
Stabpipetten (1 / 2 / 5 / 10 / 25 ml)	Cellstar®, steril	Greiner / Frickenhausen

Untersuchungshandschuhe	Sempercare®, powder-free	Semperit / Österreich
Zellkulturplatte, 24-Loch	Cellstar®, 24 Vertiefungen	Greiner / Frickenhausen
Zellkulturplatte, 96-Loch,	Cellstar®, 96 Vertiefungen mit Deckel, Flachboden	Greiner / Frickenhausen
Zellsieb, 40 µm	40 µm BD Falcon™ Cell Strainer	BD Biosciences / Erembodegem, Belgien
Zellsieb, 70 µm	70 µm BD Falcon™ Cell Strainer	BD Biosciences / Erembodegem, Belgien
Zytofugen-Filter	Shandon Filter Cards, Thick, 0,5 ml	Thermo Electron Corporation / Pittsburgh, PA, USA

2.1.3 Chemikalien und Medienzusätze

Tabelle 3 Chemikalien und Medienzusätze

Substanz	Hersteller
Alkohol absolut	Roth / Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck / Darmstadt
Aqua dest.	Braun / Melsungen
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Roth / Karlsruhe
Brefeldin.A	Sigma-Aldrich / Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin), Fraktion V	Sigma-Aldrich / Steinheim
CFDA-SE	Invitrogen / Eugene, USA
Diatriumhydrogenphosphat (Na ₂ H ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck / Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O / C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ x Na ₂ x 2 H ₂ O	Roth / Karlsruhe
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Appllichem / Darmstadt
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA / Cölbe
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O ₃)	Roth / Karlsruhe
Imject® Alum	Thermo Scientific / Rockford, IL, USA
Ionomycin (Calcium Salz)	Sigma-Aldrich / Steinheim

Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)	Fluka, Sigma-Aldrich / Seelze
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck / Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco / Grand Island, USA
L-Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)	Sigma / Deisenhofen
Methacholin (Acetyl- β -Methylcholin)	Sigma / Deisenhofen
Natriumazid (NaN_3)	Fluka, Sigma-Aldrich / Seelze
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Merck / Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Roth / Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck / Darmstadt
Natriumpyruvat ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$)	Gibco / Grand Island, USA
Ovalbumin (Albumin, Chicken Egg), Grade VI	Sigma / Deisenhofen
Paraffin, weiss, DAB	Pionier®, Hansen-Rosenthal / Hamburg
Paraformaldehyd	Sigma / Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma / Deisenhofen
PFA (Paraformaldehyd, 4%)	Roth / Karlsruhe
Piclamilast	Nycomed / Konstanz
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma-Aldrich / Steinheim
Rolipram	Sigma-Aldrich / Steinheim
Schwefelsäure (H_2SO_4) 1M	Roth / Karlsruhe
SO_2 -Wasser (Kaliudisulfit + 1 N Salzsäure)	Merck / Darmstadt
Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Roth / Karlsruhe
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma / Steinheim
Tween 20	Applichem / Darmstadt
Xylol	Roth / Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Medien

Tabelle 4 Puffer und Medien

Name	Anwendungsbereich	Zusammensetzung
ELISA-Natrium-Beschichtungspuffer	Zytokin-ELISA (IL-4, -5, -6, IFN- γ) Immunglobulin-ELISA (IgE)	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5 In 1 l Aqua dest: 8,4 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃
ELISA-Phosphat-Beschichtungspuffer	Zytokin-ELISA (IL-10, -12, TNF- α)	0,2 M Natriumphosphat pH 6,5 In 1 l Aqua dest: 11,8 g Na ₂ HPO ₄ 16,1 g NaH ₂ PO ₄
FACS-Fixierungspuffer	Zellfixierung für Durchflusszytometrie	PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd
FACS-Waschpuffer	Zellfärbung für Durchflusszytometrie	PBS 1% (v/v) FCS 1% (v/v) Natriumazid
Gey'scher Lysepuffer	Erythrozytenlyse	10 mM Kaliumhydrogencarbonat 155 mM Ammoniumchlorid 100 μ M Ethylendiamintetraessigsäure
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Lymphknotenzellpräparation	Gibco / Grand Island, USA
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Zellkultur	PAA Laboratories / Pasching, Österreich
MACS-Puffer	T-Zellanreinigung	PBS 1x 0,5% BSA 0,001% Natriumazid 5 mM EDTA
MEM (Minimal Essential Medium)	Organpräparation	Lovza / Verviers, Belgien

PBS 1x	Zellwaschung, Lungenlavage, Aufbewahrung der Organe, u.v.m.	Gibco, Invitrogen / Karlsruhe
Sort-Puffer	FACS	PBS 1x 4% FCS
Testmedium + 5% FCS	Zellkultur	IMDM 5% FCS 1% L-Glutamin 1% Natriumpyruvat
Testmedium + 10% FCS	Zellkultur	IMDM 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Natriumpyruvat
Th1-Medium	Zellkultur	TM 5% FCS 100 U/ml Proleukin (h IL-2)
Th2-Medium	Zellkultur	TM 5% FCS 200 U/ml mr IL-4 100 U/ml Proleukin (h IL-2) 100 U/ml mr IL-6
Treg-Medium	Zellkultur	TM 5% FCS 100 ng/ml mr IL-2

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5 Enzyme

Enzym	Einsatzbereich	Hersteller
Kollagenase Typ IA (von Clostridium hystolyticum) 513 U/mg	Lungenzellpräparation	Sigma / Steinheim
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	ELISA	BD Biosciences, Pharmingen / Heidelberg

2.1.6 Zytokine

Tabelle 6 Zytokine

Zytokin	Gewinnung	Hersteller
Humans (h) IL-2, Proleukin		Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz
Murines rekombinantes (mr) IL-2	Aus dem Kulturüberstand von mit IL-2 cDNA transfizierten X63Ag.653 Myelomzellen, Aufreinigung über Affinitätschromatographie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz
Murines rekombinantes (mr) IL-4	Aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen, Aufreinigung über Affinitätschromatographie, 1 Unit entspricht der halbmaximalen Proliferationssteigerung der Zelllinie F4/4K.6	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz
Murines rekombinantes (mr) IL-6		R&D Systems / Wiesbaden
Murines rekombinantes (mr) IL-12		Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Antikörper für Zellseparation und –kultur

Tabelle 7 Antikörper für Zellseparation und -expansion

Spezifität	Klon	Konjugat	Hersteller
CD3/CD28 (T cell Expander)		Bead-gekoppelt (Dynabeads®)	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
CD4	PC61	Biotin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz

CD25	H129.19 7D4	Biotin Biotin	BD Pharmingen / Heidelberg
PE		Bead-gekoppelt	Miltenyi Biotec / Bergisch-Gladbach
B220 (pan B)		Bead-gekoppelt (Dynabeads®)	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
CD8 (Lyt2)		Bead-gekoppelt (Dynabeads®)	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
Mac1		Bead-gekoppelt (Dynabeads®)	Invitrogen Dynal / Oslo, Norwegen
CD90.2		Bead-gekoppelt (Dynabeads®)	Miltenyi Biotec / Bergisch-Gladbach

Gegen biotinylierte Antikörper wurden in der Zellseparation Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin (SA-PE) der Firma Jackson ImmunoResearch, Dianova / Hamburg oder Streptavidin-gekoppelte Microbeads der Firma Miltenyi Biotec / Bergisch-Gladbach eingesetzt.

Tabelle 8 Antikörper für Zellkultur

Spezifität	Klon	Hersteller
IL-4	11B11	BD Pharmingen / Heidelberg
IFN- γ	XMG1.2	BD Pharmingen / Heidelberg
CD3	145-2C11	BD Pharmingen / Heidelberg
CD28	37.51	BD Pharmingen / Heidelberg
CD4	PC61	BD Pharmingen / Heidelberg
CD25	H129.19 7D4	BD Pharmingen / Heidelberg

2.1.7.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

Tabelle 9 Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Fluoro- chrom	Isotyp	Konzentration	Einsatz	Hersteller
CD3	145-2C11	PerCP- Cy5.5	Hamster IgG1, κ	0,1 mg/ml	1:200	BD Pharmingen / Heidelberg
CD4	L3T4	PE-Cy7	Rat IgG2a, κ	0,1 mg/ml	1:800	BD Pharmingen / Heidelberg
CD16/32	2.4G2	purified	Rat IgG2b, κ	0,5 mg/ml	1:100	BD Pharmingen / Heidelberg
CD25	PC61	PE	Rat IgG1, λ	0,2 mg/ml	1:200	BD Pharmingen / Heidelberg
CD90.1	OX-7	PerCP	Rat IgG1, κ	0,5 mg/ml	1:200	BD Pharmingen / Heidelberg
CD90.2	30-H12	FITC	Mouse IgG2b, κ	0,5 mg/ml	1:200	BD Pharmingen / Heidelberg
Foxp3	FJK-16S	APC	Rat IgG2a, κ	0,2 mg/ml	1:200	eBioscience / Frankfurt
IFN- γ	XMG 1.2	PE APC	Rat IgG1	0,1 mg/ml	1:100 1:100	BD Pharmingen / Heidelberg
IL-4	11B11	PE APC	Rat IgG1	0,2 mg/ml	1:100 1:100	BD Pharmingen / Heidelberg
KJ1-26 (DO11.10 TCR)	KJ1-26	FITC	Mouse IgG2a, κ	0,1 mg/ml	1:200	eBioscience / Frankfurt

Die Färbung intrazellulärer Zytokine erfolgte unter Verwendung des BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit von BD Biosciences / Heidelberg.

Für die Markierung des Transkriptionsfaktors Foxp3 wurde das Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set APC von eBioscience / Frankfurt eingesetzt.

2.1.7.3 ELISA-Antikörper

Tabelle 10 ELISA-Antikörper

Spezifität	Antikörper-Kombination (Coating und Detektion)	Hersteller
IL-4	BVD4-1D11 und BVD6-24G2	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz
IFN- γ	R4-6A2 und AN18.17.24	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz
IL-2	JES6-1A12 und JES6-5H4	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Mainz

2.1.8 Histologische Reagenzien

Tabelle 11 Histologische Reagenzien

Substanz	Hersteller
Entellan® Schnelleindeckmittel	Merck / Darmstadt
Eosin	Merck / Darmstadt
Gewebefixierungslösung, Roti-Histofix® 4,5%	Roth / Karlsruhe
Hämalaun	Merck / Darmstadt
Hemacolor® Schnellfärbung	Merck / Darmstadt
Liquid-Barrierenmarker	Roth / Karlsruhe
Roti-Histokit®	Roth / Karlsruhe
Schiff-Reagenz (PAS)	Merck / Darmstadt

2.1.9 Mausstämme

Tabelle 12 Mausstämme

Stamm	Abkürzung	Eigenschaft	Bezug
BALB/c		Wildtyp	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE), Johannes Gutenberg-Universität Mainz
BALB Rag2 ^{-/-}	Rag2 ^{-/-}	Rag2-Defizienz bzw. Lymphozytendefizienz	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE), Johannes Gutenberg-Universität Mainz
C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo/J	BALB DO11.10	OVA-tg TCR auf CD4 ⁺ Lymphozyten und CD90.2 Expression	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE), Johannes Gutenberg-Universität Mainz
BALB DO11.10 Thy1.1		OVA-tg TCR auf CD4 ⁺ Lymphozyten und CD90.1 Expression	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

In den Mausmodellen wurden weibliche Tiere im Alter von 8 – 12 Wochen eingesetzt. Die Tierexperimente wurden gemäß den aktuellen, institutionellen Richtlinien und entsprechend der *Helsinki convention for the use and care of animals* durchgeführt.

2.2 Methoden

In einem Mausmodell einer akuten allergischen Atemwegserkrankung wurde zunächst mit Mäusen des Stammes BALB Rag2^{-/-} ein genetisch modifizierter Mausstamm gewählt, der einen Defekt in der Lymphozytenentwicklung aufweist und somit generell weder B- noch T-Zellen bilden kann. Durch adoptiven Transfer antigenspezifischer, in vitro expandierter Th1 bzw. Th2 Zellen und durch inhalative Allergenprovokation wurden gezielt die unterschiedlichen Asthma-Phänotypen induziert. In parallelen Ansätzen sollte durch Applikation von in vitro expandierten, allergenspezifischen nTregs deren Suppressionskapazität in vivo untersucht werden. Zur Analyse wurde zunächst die Lungenfunktion der Tiere zum Nachweis einer eventuellen AHR bestimmt. Die Atemwegsinflammation konnte anhand der Zelldifferenzierung der bronchoalveolären Lavage (BAL) und histologisch anhand von Lungensektionen evaluiert werden. Durchflusszytometrische Analysen lieferten nähere Informationen über die zellulären Kompositionen in BAL, Lungen und trachealen Lymphknoten der untersuchten Mäuse. Ob der in Abb. 1 beschriebene Mechanismus der nTreg-vermittelten Suppression auch der Suppression der Th2-induzierten allergischen Atemwegserkrankung zu Grunde liegt, sollte durch prophylaktischen und therapeutischen Einsatz von PDE4-Inhibitoren (Rolipram und Piclamilast) ermittelt werden. Zur Analyse der therapeutischen Effekte von PDE4-Inhibitoren wurde ein Mausmodell der sekundären Allergenprovokation verwendet. Dabei wurden BALB/c Wildtypmäuse mit einem intakten Immunsystem zunächst gegen das Modellallergen OVA systemisch sensibilisiert. Die primäre Atemwegsprovokation erfolgte durch OVA-Inhalation. Nach Abklingen der primären Immunreaktion folgte eine sekundäre Allergenexposition. Allergenspezifische nTregs und PDE4-Inhibitoren wurden kurz vor der sekundären Atemwegsprovokation verabreicht. Dieses Modell ermöglichte die Darstellung therapeutischer Effekte von nTregs und PDE4-Inhibitoren, da sie den Tieren appliziert wurden, als schon eine allergische Erkrankung der Atemwege bestand. Unterstützt wurden die in vivo gewonnenen Erkenntnisse durch zellbiologische Analysen in vitro.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl in Einzelzellsuspensionen aus Zellkulturen oder aufbereiteten Organen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (OptikLabor) durchgeführt. Die Zählfläche wird von einem Deckglas (20 x 26 x 0,4 mm) abgedeckt und besitzt eine charakteristische eingearbeitete Netzstruktur von definierter Größe und Tiefe (0,0025 mm², 0,1 mm Tiefe). Die Struktur besteht aus vier Großquadraten, von denen sich jedes aus 4 x 4 Kleinquadraten zusammensetzt. Die Großquadrate sind durch Mehrfachlinien deutlich voneinander abgegrenzt und ein Großquadrat umfasst ein definiertes Volumen von 0,1 µl. Für eine übersichtliche Zellzählung wurden zunächst Verdünnungen hergestellt. Je nach makroskopisch bewerteter Zelldichte wurden Verdünnungen von entweder 1:2 oder 1:10 gewählt. Um die lebenden von den toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit Trypanblaulösung verdünnt; einem anionischen Diazofarbstoff, der von intakten Zellen nicht aufgenommen wird, aber an zytosolische Proteine toter Zellen bindet. Folglich färben sich abgestorbene Zellen blau und lebende bleiben ungefärbt. Etwa 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden für eine Zellzählung verwendet. Dabei wurden zwei bis vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro Großquadrat (Z) bestimmt. Unter Einbeziehung des eingesetzten Verdünnungsfaktors (VF) und des Kammerfaktors (KF), der sich mit 10⁴ aus dem Volumen eines Großquadrates (0,1 µl) ergibt, wurde mit folgender Formel die Lebendzellzahl in 1 ml Zellsuspension bestimmt:

$$\text{lebende Zellen/ml} = Z \times VF \times KF$$

Durch zusätzliche Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension (V) erhält man die Gesamtlebendzellzahl:

$$\text{Gesamtlebendzellzahl} = Z \times VF \times KF \times V$$

2.2.1.2 Anreinigung und Kultivierung von T-Zellen

2.2.1.2.1 Milzpräparation und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Nach Entnahme der Milzen wurden diese auf einem Zellsieb (70 µm) in einer Petrischale (90 mm) mit 5 ml MEM + 2% FCS gegeben. Die Milzen wurden nun vorsichtig mit dem Stempel einer 10 ml-Einmalspitze zerrieben. Um eine homogene Zellsuspension zu bekommen, wurde mit einer gestopften Pasteurpipette gut resuspendiert und das Sieb gespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe der Pasteurpipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Petrischale mit 3 ml MEM + 2% FCS gespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß transferiert. Die Suspension wurde dann für 5 – 10 min im Kühlschrank bei 4°C positioniert, damit sich größere Gewebstücke absetzen konnten. Der Überstand wurde dann in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1400 rpm, entspricht 400 x g). Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Erythrozyten-Lyse mittels Gey'schem Lysepuffer. Hierfür wurden pro Milz 1 ml des Lysepuffers auf das Pellet gegeben, gut resuspendiert und 1 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe von 10 ml MEM + 2% FCS. Die Zellsuspension wurde nun über ein Zellsieb (40 µm) gegeben, das Reaktionsgefäß mit 2 ml MEM + 2% FCS gespült und ebenfalls über das Zellsieb gegeben. Das Sieb wurde noch mit 1 ml MEM + 2% FCS gewaschen. Die Zellen wurden pelletiert (10 min, 4°C, 1400 rpm), das Pellet in 10 ml GM-Puffer aufgenommen und die Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden schließlich auf 10⁸ Zellen/ml eingestellt.

2.2.1.2.2 Zellseparation mittels MACS

In der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden gewünschte Zellpopulationen vorwiegend unter Verwendung der MACS® Technologie (*Magnetic Activated Cell Sorting*) aufgereinigt. Diese Methode basiert auf der Markierung von Zellen mit spezifischen Antikörpern, die an magnetische Partikel (MicroBeads) mit einer Größe von 50 nm gekoppelt sind. Die mit den MicroBeads markierten Zellen durchlaufen eine in einem starken Magnetfeld positionierte Separationssäule (Größe LS). Dabei werden die magnetmarkierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während

unmarkierte Zellen durchfließen und aufgefangen werden. Die zurückgehaltenen Zellen können nun durch Entfernen des Magnetfelds und Durchspülen der Säule mit MACS-Puffer eluiert werden und stehen ebenso wie die Durchflusszellen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die MACS MicroBeads sind aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Eisenoxid und Polysacchariden biologisch abbaubar und schon nach einigen Tagen in der Zellkultur nicht mehr an den Zellen gebunden. Innerhalb der MACS-Methode unterscheidet man zwei Vorgehensweisen: die positive und die negative Selektion. Bei der positiven Selektion werden die Zellen, die für weitere Analysen von Interesse sind, mit MACS MicroBeads markiert und selektiert. Werden aber durch die MACS MicroBeads-Markierung unerwünschte Zellen aus der Suspension depletiert und handelt es sich bei den unmarkierten Zellen um die Zielzellen, spricht man von einer negativen Selektion. Des Öfteren wurden in der vorliegenden Arbeit auch indirekte Zellmarkierungen durchgeführt, die sich dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Affinitätsbindung bedienen. Dabei wurden die Zellen zunächst mit Biotin-gekoppelten spezifischen Antikörpern markiert. An das Biotin konnten dann Streptavidin-markierte MicroBeads binden oder das Biotin wurde zunächst durch Streptavidin-gekoppeltes Phycoerythrin (SA-PE) detektiert und schließlich durch anti-PE-gekoppelte MicroBeads magnetisch markiert. Die indirekte Markierung hat den Vorteil, das MACS Separationssystem mit variabel einsetzbaren, spezifischen, biotinylierten Antikörpern durchführen zu können, ohne spezifische MicroBeads erwerben zu müssen.

2.2.1.2.3 Anreinigung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (nTregs)

Für die Anreinigung der nTregs wurden die Zellen zunächst mit 5 µg/ml biotinyliertem anti-CD25-Antikörper (7D4.bio, verdünnt in GM-Puffer) markiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml GM-Puffer versetzt und zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt, der Überstand verworfen und die Zellen danach erneut mit GM-Puffer auf 10⁸ Zellen/ml eingestellt. Nun wurden die Zellen mit Streptavidin-gekoppeltem PE (SA-PE) in einer Konzentration von 1:400 versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit GM-Puffer erfolgte die Inkubation mit 50 µl anti-PE-Mikrobeads auf 5 x 10⁸ Zellen/ml zunächst für 10 min bei

4°C und dann für weitere 10 min auf dem Rüttler bei 200 rpm und RT. Das Volumen wurde dann so mit GM-Puffer aufgefüllt, dass eine LS-MACS-Separationssäule mit maximal 5×10^8 Zellen in 5 ml Endvolumen beladen wurde. Bevor die markierten Zellen in 1 ml-Schritten über die im Magnetfeld eingespannten Säulen gebracht wurden, wurden sie zunächst über ein 40 µm Zellsieb gegeben, um Gewebklumpen abzutrennen. Wurden auf jede Säule insgesamt 5 ml Zellsuspension gegeben, spülte man sie durch zweimalige Zugabe von 3 ml GM-Puffer. Für die Gewinnung der in der Säule befindlichen CD25⁺ Zellen wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und mit 5 ml GM-Puffer eluiert. Bei Verwendung mehrerer Separationssäulen wurden die Eluate an diesem Punkt vereinigt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in 5 ml GM-Puffer aufgenommen und erneut über frische Separationssäulen im Magnetfeld gegeben, um eine höhere Populationsreinheit zu erlangen. Nach der Elution wurde die Lebendzellzahl bestimmt. In der gewonnenen Zellsuspension konnte nun mit einer durchschnittlichen Verunreinigung von 30%, davon 50% B-Zellen und im Übrigen Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen, gerechnet werden. Mit Hilfe von Dynabeads®, mit magnetischen Beads gekoppelte Antikörper, konnten diese Verunreinigungen entfernt werden. Hierfür wurden den Zellen 4-fache Mengen an anti-B220 (pan B) Beads und 3-fache Mengen an anti-Mac1 Beads und anti-CD8 Beads in 1 ml PBS + 0,5% BSA zugesetzt und für 20 min auf dem Rüttler bei 200 rpm und RT inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe von 5 ml PBS + 10% FCS. Die Bead-markierten Zellen konnten anschließend nach 2 min im Magnetfeld von der übrigen Zellsuspension getrennt werden. Der Bead-freie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Außerhalb des Magnetfeldes wurden die Beads mit 5 ml PBS + 10% FCS gewaschen und erneut für 2 min im Magnetfeld positioniert, während der Überstand ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß transferiert wurde. Nach einer erneuten Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zentrifugiert und mit vorgewärmtem Treg-Medium auf 10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.1.2.4 Aktivierung und Expansion von CD4⁺CD25⁺ nTregs

Für die Aktivierung und Expansion der nTregs wurden anti-CD3/CD28 T cell Expander Dynabeads® in einer Konzentration von 1:100 zugefügt. Die Zellen wurden

schließlich in einer sterilen 24-Lochplatte ausplattiert (1 ml/Loch) und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß geerntet. Durch 2-minütige Position im Magnetfeld konnten dann die Zellen von den Beads abgetrennt werden. Nachdem der Bead-freie Überstand in eine neue 24-Lochplatte überführt wurde (500 µl/Loch), wurden die Beads außerhalb des Magnetfeldes mit dem gleichen Volumen vorgewärmten Treg-Mediums gewaschen und wieder im Magnet positioniert. Der Überstand wurde in 500 µl-Schritten den Zellen in den Vertiefungen zugefügt, so dass sich letztendlich 1 ml in jedem Loch befanden. An Tag 4 der Zellkultur wurden den Zellen nochmals 500 µl vorgewärmtes Treg-Medium zugefügt und die nTregs am Tag darauf für experimentelle Zwecke geerntet.

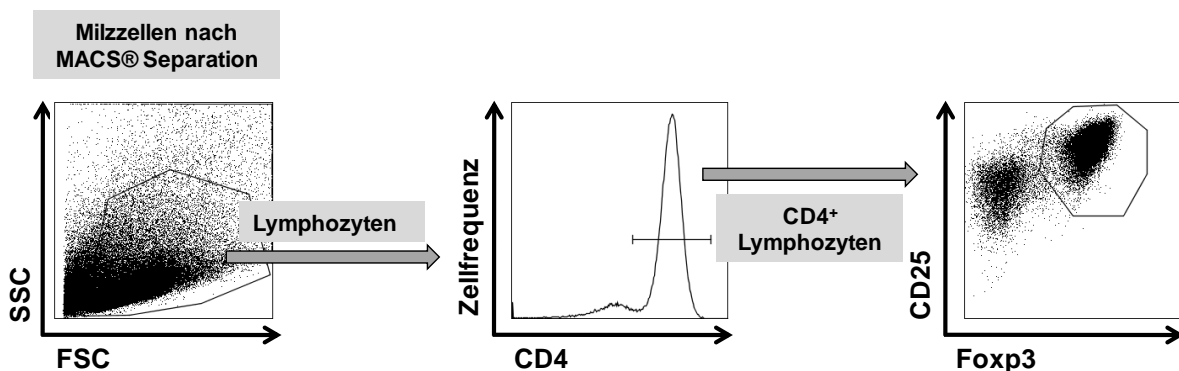


Abbildung 4: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ voraktivierte nTregs (preTregs) nach Anreinigung.

Anhand der Expression von CD4, CD25 und Foxp3 wurden die in vitro expandierten Zellen als nTregs an Tag 5 der Zellkultur durchflusszytometrisch charakterisiert. Im Allgemeinen wurde eine nTreg-Reinheit von >95% erreicht. Dargestellt ist eine beispielhafte Analyse repräsentativ für die Charakterisierung der in den Experimenten eingesetzten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ voraktivierten nTregs (preTregs).

2.2.1.2.5 Anreinigung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Für die Aufreinigung von CD4⁺ Effektorzellen aus der Milz mussten zunächst die CD25⁺ T Zellen depletiert werden, um eine Verunreinigung der Kultur durch aktivierte

T-Zellen und nTregs auszuschließen. Dafür wurden die aus der Milz aufbereiteten Zellen mit GM-Puffer auf 10^8 Zellen/ml eingestellt und mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ biotinyliertem anti-CD25-Antikörper 20 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die markierten Zellen mit SA-gekoppelten MikroBeads in einer Konzentration von 1:20 für 20 min bei 4°C inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte, indem so viel GM-Puffer zugegeben wurde, so dass eine LS-MACS-Separationssäule mit maximal 5×10^8 Zellen in 5 ml Volumen beladen werden konnte. Nachdem die Zellsuspension über ein Zellsieb ($40 \mu\text{m}$) gegeben wurde, erfolgte der Auftrag auf die im Magnetfeld eingespannten Separationssäulen in 1 ml-Schritten. Anschließend wurden zwei Mal 3 ml GM-Puffer hinzu gegeben, um die Säulen zu spülen. Als nächstes wurde die Zellzahl im Durchlauf bestimmt und die Zellsuspension wurde auf 10^8 Zellen/ml eingestellt. Um nun die CD4^+ Zellen zu selektieren, inkubierte man die Suspension mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ biotinyliertem anti-CD4-Antikörper (H129.19) für 15 min bei 4°C . Nach zweimaligem Waschen in GM-Puffer wurden die Zellen mit Streptavidin-gekoppelten MikroBeads in einer Konzentration von 1:40 versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C füllte man die Suspension mit GM-Puffer auf, so dass sich maximal 5×10^8 Zellen in 5 ml Puffervolumen befanden. Schließlich gab man die Zellsuspension über Separationssäulen wie oben bereits beschrieben. Die in der Säule befindlichen CD4^+ Zellen wurden dann mit 5 ml GM-Puffer herausgelöst und das Eluat für eine höhere Reinheit auf eine frische Säule gegeben und erneut eluiert. Die in diesem Eluat befindlichen Zellen wurden schließlich pelletiert und gezählt.

2.2.1.2.6 Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen

Zur Differenzierung von CD4^+ Zellen in Th1 bzw. Th2 Zellen wurden zunächst 24-Lochplatten mit $3 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3-Antikörper (145-2C11) durch eine 30-minütige Inkubation bei 37°C beschichtet. Nachdem die Löcher dreimal mit PBS 1x gewaschen wurden, erfolgte eine Beschichtung mit $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28-Antikörper (37.51) unter gleichen Bedingungen. Um die isolierten $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen zu Th1 Zellen zu differenzieren wurden sie in der beschichteten Platte für 6 Tage bei 37°C in Gegenwart von 1 ng/ml murinem rekombinantem (mr) IL-12, $1 \mu\text{g/ml}$ anti-IL-4-Antikörper (11B11) und 10 U/ml humanem IL-2 (Proleukin) in Testmedium + 5% FCS stimuliert. An Tag 3 der Kultur wurden die Zellen vom anti-CD3/anti-CD28-Stimulus

entfernt, in eine unbeschichtete Platte überführt und mit Th1-Medium versetzt. Für eine Th2-Differenzierung der isolierten, naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen stimulierte man sie für 6 Tage bei 37°C in Gegenwart von 1000 U/ml IL-4 , 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-IFN- γ (XMG1.2) und 100 ng/ml IL-6 . Auch sie wurden an Tag 3 vom Stimulus entfernt und mit Th2-Medium versetzt.

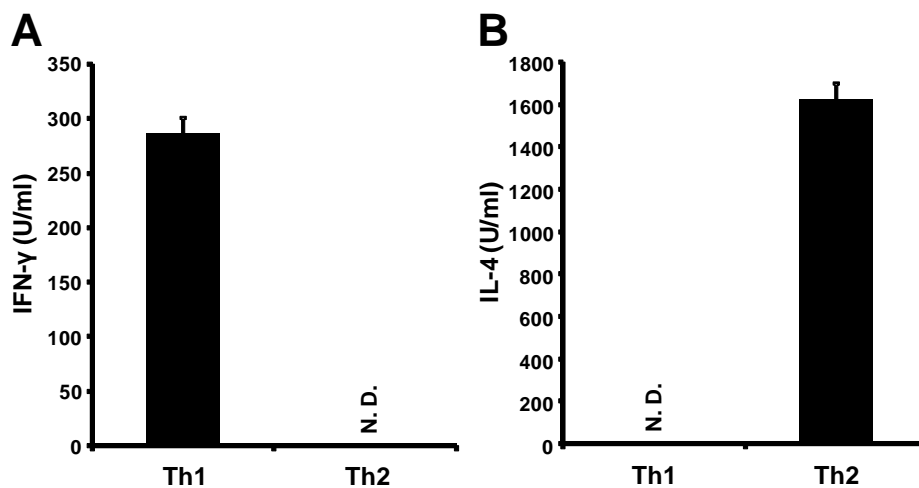


Abbildung 5: Zytokinproduktion isolierter und polarisierter $CD4^+$ Th1 und Th2 Zellen.

Nach Anreinigung und Zelldifferenzierung wurden an Tag 5 der Kultur die IFN- γ (A) und IL-4 Produktion (B) der Th1 und Th2 Zellen ermittelt. Dafür wurden die Zellen für 24 h mit 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 stimuliert und anschließend die Proteinanteile in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Im Gegensatz zu Th2 Zellen sezernieren Th1 Zellen charakteristischerweise IFN- γ . IL-4 ist ein Th2-typisches Zytokin und in Th1 Zellen nicht nachweisbar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten einer beispielhaften Analyse repräsentativ für die Charakterisierung der in den Experimenten eingesetzten Th Zellpopulationen. N. D. = nicht detektierbar.

2.2.1.3 Kokultivierung von T-Zellen

10^6 in vitro differenzierte Th1 bzw. Th2 Zellen /ml wurden mit oder ohne 10^6 nTregs bzw. voraktivierten preTregs /ml in einer 48-Lochplatte in TM + 5% FCS stimuliert. Als Kostimulatoren dienten 3 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 Antikörper und 10^5 proliferationsinhibierte A20 B-Tumorzellen /ml. Vor dem Einsatz in der Kultur wurden

10^7 Zellen der A20-Tumorzelllinie mit 60 µg/ml des Antibiotikums Mitomycin C für 30 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Th/Treg-Kokultur konnten Zellproliferation und Zytokinproduktion ermittelt werden.

2.2.1.3.1 Bestimmung der Zellproliferation

Proliferationstests wurden durchgeführt, um nach einer Th/nTreg-Kokultur die Auswirkungen der nTreg-vermittelten Suppression auf die Zellteilung der Effektorzellen zu ermitteln. Th1 bzw. Th2 Zellen wurden alleine (2×10^5) oder in Gegenwart von nTregs (je Zelltyp 1×10^5) mit 3 µg/ml anti-CD3 Antikörper und 10 µg/ml anti-CD28 Antikörper in einer 96-Lochplatte für 3 – 4 Tage in einem Volumen von 200 µl TM kultiviert. Die Proliferation wurde über den Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin ([³H]TdR) in die DNA der sich teilenden Zellen nachgewiesen. Nach 96 h wurde jedem Well 0,2 µCi [³H]TdR zugefügt und die Kultur für weitere 18 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um einen weiteren Thymidineinbau zu verhindern, wurde die Kulturplatte anschließend bei -20°C eingefroren. Zur Messung der Proliferationsrate wurden die Zellen wieder aufgetaut und die Zellsuspension aus jedem Loch auf einen Glasfilter gegeben. Dabei wurde die DNA der Zellen auf dem Filter zurückgehalten und dieser 2 min in einer Mikrowelle bei 850 W getrocknet. Der Filter wurde dann gemeinsam mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einen Plastikbeutel gegeben und luftdicht verschlossen. Die Messung der Radioaktivität wurde mit Hilfe eines β-Szintillationszählers (LKB, Freiburg) durchgeführt. Die von der Probe ausgehende β-Strahlung wird über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einen primären Szintillator übertragen, der diese Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung freigibt. Der β-Szintillationszähler kann diese elektromagnetische Strahlung als Lichtimpuls wahrnehmen und als Impuls pro Minute (*counts per minute*, cpm) angeben. Die prozentuale Inhibition der Effektorzellproliferation wurde wie im folgenden Beispiel berechnet:

% Inhibition der Th2 Proliferation

$$= 100 - (\text{cpm der Th2 Zellen in der Kokultur}) / \left(\frac{\text{cpm der Th2 alleine}}{100} \right)$$

2.2.1.4 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie dient zur Identifizierung von Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Eigenschaften. Dazu zählen die Zellgröße, Granularität, Expression von intrazellulären Proteinen und Oberflächenmolekülen. Bei diesem Messverfahren fließt die Zellsuspension durch eine Kanüle in einem laminaren Strom an einem Laserstrahl vorbei, sodass einzelne Zellen von der Lichtquelle erfasst werden können. Das auf die Zelle auftreffende Licht wird dann abhängig von ihrer Größe und Granularität gestreut. Die Beugung des Lichts im flachen Winkel wird durch einen Detektor in unmittelbarer Verlängerung des Laserstrahls ermittelt und durch die Zellgröße bzw. das Zellvolumen bestimmt. Dieser Parameter wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) wiedergegeben. Zellpopulationen sind auch anhand ihrer Granularität, d.h. Zellkernstruktur und -größe und intrazelluläre Vesikel, unterscheidbar. Je granulärer eine Zelle ist, desto stärker wird das auftreffende Licht im rechten Winkel gebrochen und durch einen Sensor im 90°-Winkel detektiert, was als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) angegeben wird. Mittels der beiden Parameter FSC und SSC lassen sich so diverse Zellpopulationen in einer Suspension voneinander unterscheiden. Beispielsweise kann man an dieser Stelle die großen und stark granulären Makrophagen von den kleineren und weniger granulären Lymphozyten differenzieren. Zur genaueren Analyse eines Zellgemischs, beispielsweise zur Unterscheidung von Subpopulationen, können die Zellen zusätzlich mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen spezifisch exprimierte Proteine markiert und vom Durchflusszytometer erkannt werden. Der an den Zellantigenen gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laserstrahl mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Dabei emittiert der Farbstoff ein Fluoreszenzspektrum mit einem Emissionsmaximum, das von einem Lichtdetektor in dem dafür vorgesehenen Kanal erfasst wird. Der für die vorliegende Arbeit verwendete Durchflusszytometer (BD FACSCanto™, BD Biosciences) ist aufgrund seiner Ausstattung mit mehreren verschiedenfarbigen Lasern, nachgeschalteten Filtern und Spiegeln in der Lage, die Wellenlängen des Lichts aufzutrennen. So konnten zur Analyse einer Probe mehrere Antikörper eingesetzt werden, die an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind und sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden. Alle eingesetzten fluorochromgekoppelten Antikörper sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Der gelbgrüne Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das

rote Protein Phycoerythrin (PE) und das grünbläuliche Allophycocyanin (APC) zählen beispielsweise zu den in dieser Arbeit eingesetzten Fluorochromen. Möchte man in einer Probe parallel unterschiedliche Farbstoffe verwenden, sollten besonders die jeweiligen Emissionsbereiche beachtet werden, da es hierbei zu Überlagerungen kommen kann, die die Messergebnisse verfälschen können. Dabei kann ein angeregtes Fluorochrom, das ein Emissionsspektrum emittiert, nicht nur ein Signal in dem dafür vorgesehenen Kanal, sondern auch in den Kanälen anderer Fluorochrome auslösen. In dem Fall sollte an dem Gerät vor Messbeginn eine Kompensationseinstellung durchgeführt werden, wobei Messfehler berechnet und korrigiert werden können. Unter Einsatz von Antikörpern gegen verschiedene Zellantigene ermöglicht die Durchflusszytometrie eine schnelle und differenzierte Analyse verschiedener Zellpopulationen und ihre Anteile in einer Probe. Die Messdaten wurden mit der BD FACSDiva™ Software erfasst und anschließend mit der Auswertungssoftware FlowJo™ (TreeStar) analysiert.

2.2.1.4.1 Zelloberflächenmarkierung für Durchflusszytometrie

Aus unterschiedlichen Geweben wie BAL, Lunge und Lymphknoten wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Färbung mussten zunächst $1 - 2 \times 10^6$ Zellen aus der jeweiligen Suspension in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt, zweimal in jeweils 100 µl Waschpuffer resuspendiert und bei 1800 rpm für 2 min sedimentiert werden. Nach jeder Zentrifugation wurde die Platte einmal über dem Waschbecken ausgeschlagen und der Waschüberstand verworfen. Zur Lockerung der Zellpellets wurde die Platte kurz über einen Rüttler gehalten. Anschließend wurde die Probe mit 50 µl anti-Maus CD16/CD32 Antikörper (Fc-Block, BD Pharmingen, 1:50 verdünnt in Waschpuffer) versetzt und resuspendiert. Dieser Antikörper blockiert die Fcγ-Rezeptoren II und III, verhindert damit eine unspezifische Bindung der fluoreszenzgekoppelten Antikörper an diese Rezeptoren und unterdrückt folglich ein verfälschendes positives Signal. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 4°C erfolgte die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper. Für diesen Schritt wurde ein Antikörpermix hergestellt, in dem die jeweiligen zu verwendenden Antikörper in Waschpuffer vorverdünnt wurden. Die optimalen Konzentrationen, in denen die Antikörper

eingesetzt werden sollten, wurden in Vorversuchen durch Titration ermittelt. 50 µl des Antikörpergemischs wurden dann zu den Zellen in der Lochplatte gegeben, die bereits in einem 50 µl Volumen vorlagen. Da dieser Schritt eine weitere 1:2 Verdünnung der Antikörper bedeutete, musste dies bei der Vorverdünnung berücksichtigt und die Antikörper doppelt konzentriert angesetzt werden. Nach sorgfältiger Resuspension inkubierten die gefärbten Ansätze lichtgeschützt für 20 min bei 4°C. Durch zweimaliges Waschen wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die gefärbten Zellen wurden schließlich in 100 µl PBS + 4% PFA aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.2.1.4.2 Foxp3-Färbung für Durchflusszytometrie

Die Foxp3-Expression gilt als Charakteristikum für nTregs in der Maus. Die Färbung dieses Transkriptionsfaktors in Kombination mit einer CD4/CD25-Oberflächenfärbung ermöglichte die eindeutige Identifikation von nTregs in den Zellgemischen. Nach der wie in 2.2.1.4.1 beschriebenen Zelloberflächenfärbung wurde für die Foxp3-Färbung das Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set APC von eBioscience verwendet und den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

2.2.1.4.3 Färbung intrazellulärer Zytokine

Da in den meisten Fällen intrazelluläre Zytokine in sehr geringen und daher schwer messbaren Mengen vorlagen, musste im Vorfeld durch Restimulation die Zytokinproduktion angeregt werden, um sie für die Durchflusszytometrie darstellbar zu machen. Dafür wurden $5 - 8 \times 10^6$ Zellen in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt und durch Zentrifugation (1800 rpm, 2 min) sedimentiert. Zur Restimulation der Zytokinproduktion wurden die Zellen in TM + 10% FCS mit 50 ng/ml Phorbolmyristataacetat (PMA), 750 ng/ml Ionomycin, 1 µg/ml Brefeldin A (alle von Sigma-Aldrich) für 4 – 6 h bei 37°C inkubiert. PMA und Ionomycin verursachen dabei eine antigenunspezifische Aktivierung der Zellen, während Brefeldin A über Einwirkung auf den Golgi-Apparat verhindert, dass intrazellulär produzierte Zytokine nach außen transportiert werden. Nach zweimaligem Waschen konnten dann die

Oberflächenantigene der Zellen angefärbt werden (siehe 2.2.1.4.1). Während der weiteren Durchführung musste auf eine lichtgeschützte Behandlung der bereits gefärbten Zellen geachtet werden. Zur Markierung intrazellulärer Zytokine wurde das BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit von BD eingesetzt. Die darin enthaltenen Puffer und Lösungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers gelagert und vorbereitet. Zunächst wurden die Zellen mit 100 µl Fixation/Permeabilization Solution versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Einerseits diente die Lösung dazu, die Zellen zu fixieren, um die exprimierten Antigene zu stabilisieren. Gleichzeitig wurden die Zellwände perforiert und waren somit durchlässig für die fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine. Zweimaliges Waschen mit Perm/Wash™ Buffer befreite die Zellen von der Lösung und nun wurden 100 µl fluoreszenzmarkierter Antikörper zugegeben. Ähnlich der Oberflächenfärbung wurden die Antikörper in einem Gemisch in vorher getesteten, optimalen Konzentrationen eingesetzt und mit Perm/Wash™ Buffer verdünnt. Nach einer 40-minütigen Inkubationszeit bei 4°C wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit Perm/Wash™ Buffer entfernt, die Zellen in 100 µl PBS + 4% PFA aufgenommen und für durchflusszytometrische Bestimmungen in FACS-Röhrchen überführt.

2.2.1.4.4 Durchflusszytometrische Zellseparation mit FACS

Das Prinzip der Durchflusszytometrie kann nicht nur für die optische, sondern auch für die räumliche Auftrennung der Zellen anhand ihrer Fluoreszenzmarkierungen genutzt werden. Damit können weitere Analysen mit den separierten Zellen durchgeführt werden. Für solche FACS (*fluorescence activated cell sorting*) – Messungen stand der FACS Sorter FACSVantage™ SE mit der Bedienungssoftware Cell Quest Pro (BD Biosciences) zur Verfügung. Dieses Gerät erkennt fluoreszenzmarkierte Zellen anhand durchflusszytometrischer Mechanismen und sortiert die Zellen der Wahl in ein separates Gefäß. In einem solchen Zellsorter wird die Kanüle, aus der der fokussierte Zellflüssigkeitsstrom austritt und am Lichtstrahl vorbeigeleitet wird, zur Vibration gebracht. Das hat zur Folge, dass der lineare Flüssigkeitsstrom in einzelne Tropfen zerbricht. Enthält ein Tropfen eine Zelle mit ausgewählter Streuung und Fluoreszenz, kommt es auf ihre Zelleigenschaften an, ob

der Tropfen elektrisch positiv oder negativ geladen wird. Passiert der Tropfen nun ein elektrostatisches Feld, wird er ladungsabhängig abgelenkt und in einem separaten FACS-Röhrchen aufgefangen.

Für eine höhere Reinheit wurden vor der FACS-Zellseparation die gewünschten CD90.2⁺ Zellen durch MACS-basierte Zellseparation (vgl. 2.2.1.2.2) unter Verwendung von Bead-gekoppelten anti-CD90.2 Antikörpern aufgereinigt. Anschließend wurden die Oberflächen der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten anti-CD90.2 und anti-CD90.1 Antikörpern markiert (siehe 2.2.1.4.1). Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen zweimal in PBS + 4% FCS gewaschen und nach einer Zellzahlbestimmung mit PBS + 4% FCS auf 5 – 7 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Anhand der folgenden FACS Separation wurden die CD90.2⁺ Zellen herausgefiltert und standen nun für weitere Analysen wie z. B. cAMP-ELISA zur Verfügung.

2.2.1.5 Proteinbestimmung mittels ELISA

In Proben aus Serum, BAL, Kulturüberständen und Gewebehomogenaten sind Proteine enthalten, die mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) nachgewiesen werden können und zusätzliche Informationen über die im Organismus vorherrschende Immunreaktion liefern. Diese Methode basierend auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Interaktion ermöglicht die quantitative Erfassung von Zytokinen in den genannten Proben.

2.2.1.5.1 Nachweis von Zytokinen mit Sandwich-ELISA

Die Variante des Sandwich-ELISA beinhaltet die Kopplung des gesuchten Zytokins zwischen zwei Antikörpern. Für den ELISA werden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Die Oberflächen jeder dieser Vertiefungen werden zunächst mit einem primären Antikörper, der spezifisch ein Epitop des gesuchten Antigens erkennt, benetzt. Während der Inkubation adsorbieren die Antikörpermoleküle an die Polymerschicht der Mikrotiterplatte und durch mehrmaliges Waschen mit detergentem Waschpuffer können ungebundene Antikörpermoleküle entfernt werden. Im nächsten Schritt wird die Probe in die geleerten, antikörperbenetzten

Vertiefungen gegeben. Nun bindet das gesuchte Zytokin mit dem passenden Epitop hochspezifisch an die Primärantikörper auf der Platte. Alle weiteren in der Probe befindlichen Proteine werden gewaschen. Als nächstes addiert man einen biotinylierten Sekundärantikörper (Detektionsantikörper), der eine Spezifität für ein weiteres Epitop des an den Primärantikörper gebundenen Zytokins aufweist. Die Biotinylierung ermöglicht daraufhin die hochaffine Bindung eines Streptavidin-gekoppelten Enzyms (Meerrettich-Peroxidase). Durch Zugabe einer Substratlösung kommt es zu einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion, die photometrisch erfasst werden kann. Je höher die Konzentration des gesuchten Zytokins in der Probe ist, desto mehr Epitope bieten sich den biotinylierten Sekundärantikörpern. Dementsprechend mehr Enzyme koppeln und können mehr Substrat umsetzen, was sich in einer stärkeren Färbung und einem höheren OD-Wert widerspiegelt.

Für die quantitative Bestimmung der Zytokine wurden entsprechende ELISA-Kits der Firma BD Biosciences verwendet und die Durchführungen erfolgten gemäß der Bestimmungen des Herstellers. Der Primärantikörper wurde zunächst in entsprechendem Coatingpuffer 1:250 verdünnt und davon 50 µl in jede Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Die Adsorption an die Platte erfolgte während einer Inkubationsphase von 10 – 18 h bei 4°C. Durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer und anschließendem Ausklopfen der Platte konnten überschüssige Antikörper entfernt werden. Eine unspezifische Bindung der enzymmarkierten Sekundärantikörper an den Primärantikörper kann das Messergebnis verfälschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden deshalb 100 µl ELISA-Blockpuffer (PBS + 10% FCS) in jedes Loch gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen der Platte konnten die Proben aufgetragen werden. Dafür wurden die Proben zunächst mit ELISA-Assaypuffer vorverdünnt. Die entsprechenden Verdünnungen wurden in Vorversuchen ermittelt. In Duplikaten auf die Platte gegeben erfolgte mit Hilfe einer Multikanalpipette eine serielle 1:2 Verdünnung mit ELISA-Assaypuffer in mindestens 4 Verdünnungsschritten. Zur quantitativen Ermittlung des Zytokingehalts war es notwendig, neben den Proben auch einen Zytokin-Standard mit definiertem Proteingehalt als Duplikat in separate Löcher zu geben und mit ELISA-Assaypuffer um mindestens 6 Stufen seriell zu titrieren. Nach einer Inkubationszeit von entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C konnten die Proben und Standards durch 5 – 7-

maliges Waschen entfernt werden. Der Sekundärantikörper und die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase wurden nun in ELISA-Assaypuffer jeweils 1:250 verdünnt und davon 50 µl in jede Vertiefung pipettiert. Während der 1-stündigen Inkubationszeit bei RT wurde die Substratlösung gemäß der Herstellerangaben vorbereitet. Nach 5 – 7-maligem Waschen wurden in jede Vertiefung 50 µl der Substratlösung gegeben. Lichtgeschützt musste nun die Farbreaktion in der Platte verfolgt werden, bis sich eine seriell abnehmende Blaufärbung des Standards zeigte. Nach etwa 15 – 30 min wurde die optische Dichte (OD) mit dem ELISA-Photometer bei 450 nm Wellenlänge bestimmt. Die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgte anhand der gemessenen Standardwerte und linearer Regression mit der Software *Microsoft Excel 2007™*. Die prozentuale Inhibition der Zytokinproduktion wurde wie im folgenden Beispiel mit IL-4 berechnet:

% Inhibition der IL-4 Produktion

$$= 100 - (\text{IL-4 U/ml der Th2 Zellen in der Kokultur}) / \left(\frac{\text{IL-4 U/ml Th2 alleine}}{100} \right)$$

2.2.1.5.2 cAMP-ELISA

Für die Bestimmung der cAMP-Konzentrationen im Zytosol von Kulturzellen oder isolierten Lungenzellen wurden diese zunächst drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 0,1 N HCl lysiert (100 µl/10⁶ Zellen) und 10 min bei RT auf dem Rüttler inkubiert. Eine weitere Zentrifugation trennte die Zelltrümmer von den zytosolischen Bestandteilen im Überstand. In den gewonnenen Überständen wurden nun die cAMP-Konzentrationen mittels cAMP-spezifischem ELISA (Correlate EIA Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay kit; Assay Designs / Enzo Life Sciences; Lörrach) ermittelt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.2.2 Experimentelle Tiermodelle

Anhand von Tiermodellen einer allergischen Atemwegserkrankung konnten bislang einige potenziell grundlegende Mechanismen der allergischen Sensibilisierung und

auch der Entwicklung einer Atemwegserkrankung verdeutlicht werden. Besonders Mausmodelle halfen dabei, die Bedeutung von T-Zellen in der Entwicklung der allergeninduzierten Atemwegsinfektion und AHR darzustellen. Im Allgemeinen werden dafür die Mäuse gegen ein Allergen sensibilisiert, entweder durch systemische oder inhalative Exposition, und anschließend in den Atemwegen inhalativ oder intranasal provoziert, um eine allergische Entzündung und AHR in den Atemwegen zu induzieren.

2.2.2.1 Vorbereitung der Zellen für Zelltransfer

Für Zelltransferexperimente wurden die Zellen nach Kultivierung mit einer Eppendorf-Pipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen vollständig vom Medium zu befreien, wurden sie in einem Waschvorgang mit PBS 1x versehen und bei 1200 rpm sedimentiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt. Das Zellpellet wurde dann in einem definierten Volumen aufgenommen, eine Zellzählung durchgeführt und die Zellsuspension mit PBS 1x auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.2.2.2 Färbung der Th-Zellen mit CFSE

Um die Proliferation der Th Zellen in vivo untersuchen zu können, wurden sie vor dem Transfer mit dem Vitalfarbstoff CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinidylester) angefärbt. Dabei handelt es sich um nicht-fluoreszente Moleküle, die die Zellmembran leicht passieren und ins Zytoplasma eindringen können. Intrazelluläre Esterasen setzen die CFDA-SE-Moleküle durch Abspaltung der Acetatgruppen in den fluoreszenten Ester CFSE (Carboxyfluorescein-Succinidylester) um. Das weniger zellpermeable CFSE bindet über seine Succinimidylgruppen stabil kovalent an die Aminogruppen intrazellulärer Moleküle. Bei einer Zellteilung werden die CFSE-gekoppelten Moleküle gleichmäßig unter den Tochterzellen aufgeteilt, wodurch sich die Fluoreszenzintensität der Zellen halbiert. Diese Fluoreszenzabnahme findet progressiv bei jeder folgenden Zellteilung statt und ist durchflusszytometrisch nachweisbar.

Nachdem die Zellzahl der in vitro expandierten Th Zellen bestimmt wurde, wurden sie mit PBS 1x auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Maximal 4×10^7 Zellen in 2 ml

wurden mit 5 μM CFDA-SE (verdünnt in PBS 1x) versetzt, sodass der Farbstoff schließlich in einer Konzentration von 2,5 μM vorlag. Die Zellsuspension wurde für 4 min bei 37°C/5% CO₂ inkubiert und der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe des doppelten Volumens TM + 10% FCS und Zentrifugation (1200 rpm, 10 min). Das Zellpellet wurde erneut in TM + 10% FCS gelöst und zentrifugiert. Nach einem letzten Waschschrift mit TM + 5% FCS wurde die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.3 Modell einer akuten Atemwegserkrankung

In diesen Experimenten sollten Funktion und Suppressionsmechanismen von nTregs auf die adaptive Immunantwort dargestellt werden. Dabei war es wichtig, ein In vivo-Modell zu etablieren, in dem eine eindeutige T-Zellabhängigkeit gewährleistet wird. Hierfür wurden Tiere des BALB Rag2-defizienten (Rag2^{-/-}) Mausstammes eingesetzt, die eine genetisch bedingte Dysfunktion in der Lymphozytenentwicklung aufweisen. Mäuse dieses Stammes besitzen keine T- und B-Lymphozyten.

Ein Organismus sieht sich in seiner Umwelt mit einer Vielzahl an Antigenen konfrontiert. Lymphozyten besitzen so genannte Antigenrezeptoren, um diese Antigene und ihre potenzielle Gefahr für den Organismus erkennen zu können. Ein Antigenrezeptor besteht aus einer konstanten Region mit Signal- oder Effektorfunktionen, die verknüpft ist mit einer variablen Region, die sich im Gegensatz zur konstanten Region von Zelle zu Zelle unterscheidet. Da Antigene in vielfältiger Weise auftreten können, muss auch das Rezeptorrepertoire eine entsprechende Diversität aufweisen. Aufgrund der großen Vielfalt kann nicht jede Rezeptorvariante vollständig im Genom codiert sein, da dies die gesamte Genomgröße bei Weitem übersteigen würde. Vielmehr kommt es in der Entstehung von Lymphozyten-Antigenrezeptoren zu einer somatischen DNA-Umlagerung, in der Gensegmente für die variable Region zufällig umgeordnet werden. Für diesen Prozess verantwortlich ist ein Enzym-Komplex, der auch als Rekombinase bezeichnet wird. Ausschließlich in sich entwickelnden Lymphozyten exprimiert, sind die RAG1 und RAG2 (rekombinationsaktivierende Gene)-Proteine für die Genumlagerung unverzichtbar und wesentlich am Rekombinationsprozess beteiligt. In BALB Rag2^{-/-} Mäusen wurde eines der RAG-Gene ausgeschaltet, was eine Störung in der Lymphozytenentwicklung zur Folge hat.

Das Modell der akuten Atemwegserkrankung beinhaltet die Rekonstitution von lymphozytendefizienten BALB Rag2^{-/-} Mäusen mit antigenspezifischen T-Zellen. Als Modellallergen diente in diesen Experimenten OVA, welches aufgrund seiner optimalen Etablierung, leichten Handhabung und kommerziellen Erwerbbarkeit ausgewählt wurde. Die transferierten, antigenspezifischen Effektorzellen stammen aus den Milzen von BALB DO11.10 Mäusen (offizielle Stammbezeichnung: C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo/J). Die CD4⁺ T-Zellen dieser Mauszüchtung besitzen einen heterodimeren, transgenen TCR mit Spezifität für das OVA-Epitop³²³⁻³³⁹. OVA wird also spezifisch von den CD4⁺ T-Zellen erkannt und es kommt zur antigenspezifischen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen. Des Weiteren wurden Milzzellen des Mausstammes BALB DO11.10 Thy1.1 isoliert. In diesem Stamm exprimieren die CD4⁺ T-Zellen ebenfalls den OVA-spezifischen, transgenen TCR. Auf den Zelloberflächen u. a. von Thymozyten und peripheren T-Zellen, wird konstitutiv das Oberflächenmolekül CD90 (auch bezeichnet als Thy1, *thymocyte differentiation antigen 1*) exprimiert. CD90 kommt in Mäusen in zwei Allelen vor: CD90.1 (Thy1.1) und CD90.2 (Thy1.2). Die Proteine unterscheiden sich in nur einer Aminosäure. Die T-Zellpopulationen der meisten Mausstämme, darunter BALB/c und BALB DO11.10 Mäuse, exprimieren CD90.2 (Thy1.2). Aus den Milzzellen der BALB DO11.10 Thy1.1 Mauszüchtung wurden CD90.1⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs angereinigt und expandiert. Im weiteren Verlauf des Experiments konnten somit anhand der CD90.1 bzw. CD90.2 Expression die T-Effektorzellen von den nTregs unterschieden werden. Lymphozytendefizienten BALB Rag2^{-/-} Mäusen wurden zunächst 2 x 10⁶ nTregs in 100 µl PBS 1x unter Verwendung einer 1 ml Einmalspritze mit einer 0,4 x 12 mm Kanüle in die Schwanzvene injiziert. Dabei wurden die Tiere in einer Injektionskammer fixiert und mit einer Infrarot-Wärmelampe angewärmt, um die Schwanzvenen besser zugänglich zu machen. Als Kontrolle wurden anderen BALB Rag2^{-/-} Mäusen statt Zellen lediglich PBS 1x intravenös (i. v.) appliziert. 7 Tage später wurden den Tieren 2 x 10⁶ Th1 oder Th2 Zellen intravenös appliziert. In den 6 darauffolgenden Tagen wurden die Atemwege der Tiere durch OVA Aerosol provoziert. Hierfür wurden 250 mg OVA in 25 ml PBS gelöst und damit eine 1-prozentige Allergenlösung hergestellt. Die OVA-Lösung wurde in die Applikationsschale eines Verneblungsgerätes gegeben und das Gerät nach Angabe des Herstellers in Betrieb genommen. Für den Verneblungsvorgang wurden sowohl

Luftstrom- als auch Nebulisierungsvolumen auf Stufe 4 und die Geräteuhr auf 20 min eingestellt. Die rekonstituierten Mäuse wurden für die Atemwegsprovokation in einer Verneblungskammer positioniert, die mit dem Vernebler verbunden ist. Diese Behandlung wurde an den Tagen 7 – 13 einmal täglich durchgeführt. 24 h nach der letzten Atemwegsprovokation, wurden die Tiere schließlich untersucht.

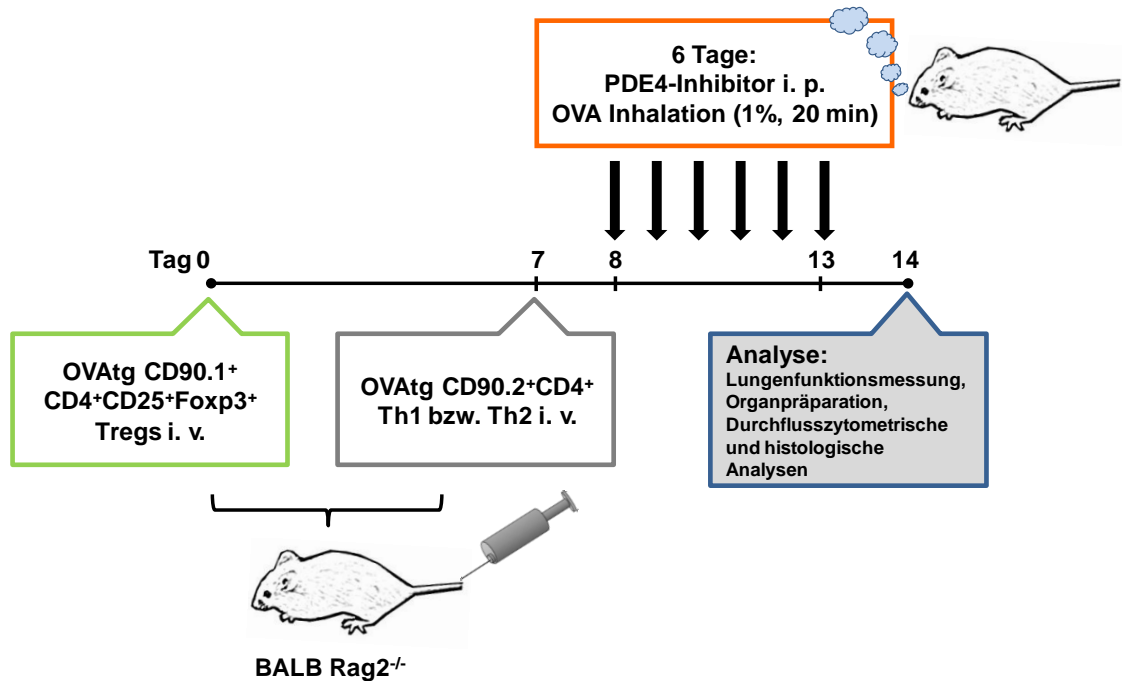


Abbildung 6: Zeitprotokoll des experimentellen Mausmodells einer akuten Atemwegserkrankung

2.2.2.4 Modell einer chronischen Atemwegserkrankung

Im chronischen Modell werden allergische Atemwegserkrankungen durch das Prinzip der Sensibilisierung und Provokation erzeugt. Mäuse mit einem intakten Immunsystem werden durch systemische Gabe eines Modellantigens sensibilisiert und nach Abklingen der primären Reaktion werden die Atemwege der Tiere mit dem Modellantigen provoziert. Im Vergleich zu dem akuten Versuchsprotokoll ist das chronische Modell weniger artifiziell und beschreibt näher die physiologischen Vorgänge einer allergischen Atemwegserkrankung, da hier zum Einen gesunde

Wildtypiere eingesetzt werden und zum Anderen die im Alltag vorkommende Exposition eines allergischen Individuums mit dem Allergen gegeben ist.

BALB/c Wildtypmäuse wurden durch zweimalige intraperitoneale (i. p.) Gabe des Modellantigens OVA kombiniert mit Imject® Alum sensibilisiert. Imject® Alum besteht aus Aluminiumhydroxid und dient als Adjuvans zur Verstärkung der Immunreaktion. Zunächst wurde unter sterilen Bedingungen mit PBS 1x eine OVA-Lösung mit einer Konzentration von 400 µg/ml hergestellt. Die OVA-Lösung wurde dann mit der gleichen Menge Imject® Alum versetzt, so dass das Protein in einer Endkonzentration von 200 µg/ml vorlag. Um das OVA-Protein mit dem Adjuvans zu verbinden, wurde das Gemisch unter regelmäßiger Rotation bei 37°C inkubiert.

Zur Immunisierung der Mäuse wurden zweimalig 1 µg OVA Alum /mg Körpergewicht (100 µl bei 20 g Körpergewicht) i. p. injiziert. Die beiden Injektionen erfolgten in einem Abstand von 14 Tagen. Nach weiteren zwei Wochen provozierte man an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tage 26, 27, 28) die Atemwege der Tiere durch OVA Aerosol gemäß 2.2.2.3 24 h nach der letzten Verneblung wurden die Mäuse untersucht. Es wurden Lungenfunktionsmessungen und die Analysen der Atemwegsinflammation durchgeführt.

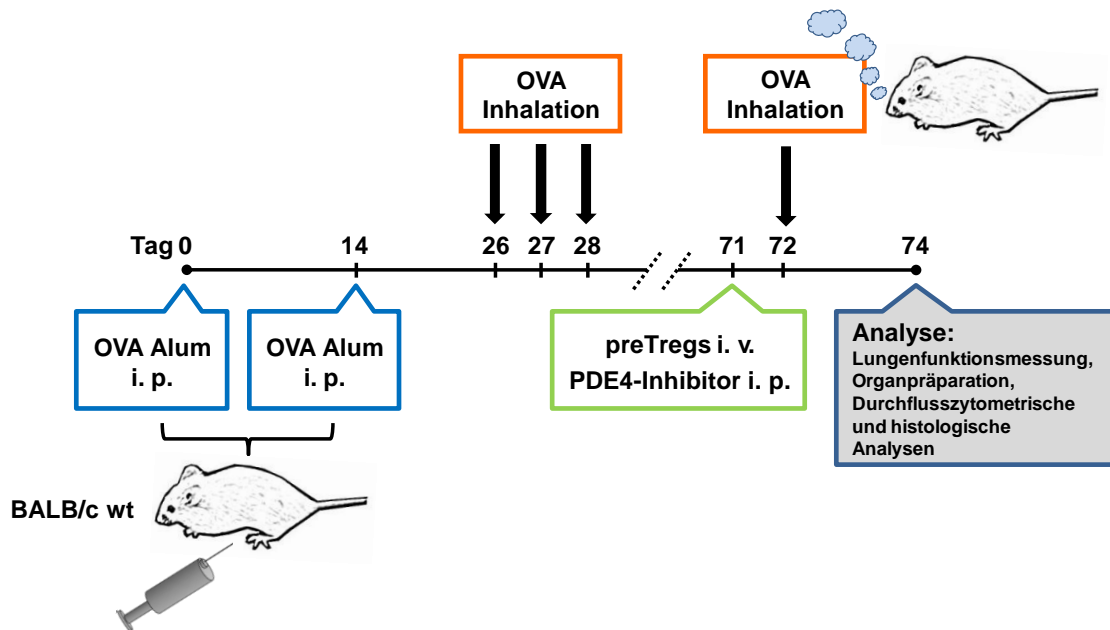


Abbildung 7: Zeitprotokoll des experimentellen Mausmodells einer chronischen Atemwegserkrankung

2.2.3 Lungenfunktionsmessung

Asthma bronchiale ist eine humane Erkrankung, deren Grundlagen in dieser Arbeit in Tiermodellen untersucht werden sollten. Obwohl dieser Transfer gewisse Einschränkungen mit sich bringt, musste eine bestmögliche Übertragung des Krankheitsbildes des allergischen Asthmas gewährleistet sein. Um entsprechende Symptome in den erkrankten Mäusen nachweisen und daraus Informationen beziehen zu können, wurden neben Atemwegsentszündung auch die Lungenfunktion der Tiere untersucht. Erkrankte Tiere weisen im Vergleich zu gesunden Individuen im Allgemeinen eine eingeschränkte Lungenfunktion und eine AHR auf, die durch diverse Messtechniken bestimmt werden kann.

Je nach Bedarf kann man sich hierfür sowohl nicht-invasiven, als auch invasiven Methoden bedienen. Nicht-invasive Techniken sind weit verbreitet und gerade die Ganzkörperplethysmographie findet in der aktuellen Forschung oft Verwendung. Für diese Methode wird die Maus in eine geschlossene Druckkammer gesetzt und die Druckveränderungen während ihrer Atemzyklen aufgenommen. Verglichen mit einer leeren Druckkammer werden so Ein- und Ausatmungsdauer, Atemfrequenz und maximaler Kammerdruck während des Atemzyklus bestimmt. Anhand der gemessenen Zeit während früher und später Ausatmung und des Kammerdrucks beim Ein- und Ausatmen wird dann der dimensionslose Parameter *Enhanced Pause* (PenH) berechnet. Während der Messung wird die Maus mit ansteigenden Dosen einer bronchokonstriktiven Substanz (z. B. Methacholin) konfrontiert und bei jeder Dosis die Änderung der PenH relativ zur PenH bei PBS bestimmt. Erkrankte Tiere zeigen als Reaktion auf den Bronchokonstriktor einen erhöhten Atemwegswiderstand, bedingt durch die Inflammation in der Lunge und dessen Effekt auf die glatte Atemwegsmuskulatur. Ein großer Vorteil der nicht-invasiven Messmethode ist, dass die Tiere nicht narkotisiert und intubiert werden und damit im Krankheitsverlauf wiederholte Messungen an einem Tier durchgeführt werden können. Je nach Apparatur kann man auch die Lungenfunktion mehrerer Tiere gleichzeitig messen. Leider zeigt sich die Ganzkörperplethysmographie als äußerst empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen. Variable, von der Lungenmechanik unabhängige Faktoren wie der Zeitpunkt der Beatmung, Hyperoxie oder erwärmtes oder befeuchtetes Inhalationsgas können die Messergebnisse maßgeblich beeinflussen. Auch kann eine nicht-invasive Technik keine direkten Analysen der

Lungenmechanik bieten. Man erlangt somit keine Informationen über Intensität und Lokalisierung der Bronchokonstriktion oder über den Beitrag der oberen Atemwege (z. B. Kehlkopföffnung, nasale Passagen) zum gesamten Atemwegswiderstand.

Vor allem Letzteres wird durch invasive Messmethoden ermöglicht. Bei dieser Variante wird die narkotisierte Maus intratracheal intubiert, so dass Änderungen der Lungenfunktion unmittelbar in der Lunge wahrgenommen werden können. Durch die Intubation werden Messverfälschungen durch Änderungen in den oberen Atemwegen vermieden. Für diese Messvariante muss in jedem Fall die Expertise zur Durchführung einer Tracheotomie gegeben sein, um den Tubus legen zu können, außerdem erfordern Anästhesie und mechanische Beatmung der Tiere die Erfahrung der Experimentatoren. Auch sollte man sich bei der Wahl einer invasiven Methode bewusst sein, dass im Gegensatz zur nicht-invasiven Variante keine wiederholten Messungen an einem Versuchstier durchgeführt werden können. Als physikalische Parameter können der pulmonale Widerstand (R_L) oder die dynamische Compliance (C_{dyn}) ermittelt und dargestellt werden. Der pulmonale Widerstand steht für die Verengung der Atemwege und die Viskosität des Lungengewebes und definiert sich aus der Summe des Atemwegswiderstandes (R_{aw}) und des Gewebewiderstandes (R_{ti}), die bei normaler Atemrate vergleichbar sind. Anhand der Messdaten kann der pulmonale Widerstand aus dem Verhältnis der transpulmonalen Druckdifferenz (ΔP_{TP}) zur Flussdifferenz (ΔF) berechnet werden:

$$R_L = R_{aw} + R_{ti} = \frac{\Delta P_{TP}}{\Delta F}$$

Die dynamische Compliance (C_{dyn}) beschreibt die elastische Dehnbarkeit der Lunge und errechnet sich als Quotient aus der Änderung des definierten Lungenvolumens (ΔV) zur transpulmonalen Druckdifferenz (ΔP_{TP}):

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

Transpulmonaler Druck (P_{TP}) und Fluss (F) sind folglich unverzichtbare Messgrößen für die Bestimmung des pulmonalen Widerstands (R_L) und der dynamischen

Compliance (C_{dyn}) und errechnen sich unter Einbeziehung des Tidalvolumens (V_T) und des Tidalatemflusses (F_T) wie folgt:

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

2.2.3.1 Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent™-System

In dieser Arbeit wurde für Lungenfunktionsmessungen als invasive Methode das flexiVent™-System der Firma SCIREQ® (Montreal, Kanada) gewählt. Hierbei handelt es sich um eine kombinierte Variante aus mechanischer Beatmung des narkotisierten Tieres und ständiger *online* Analyse der Lungenmechanik. Die Ermittlung von pulmonalem Widerstand (R_L) und dynamischer Compliance (C_{dyn}) erfolgte über die *Forced Oscillation*-Technik (FOT). Dabei generiert ein computergesteuerter Kolben ein oszillierendes Signal, welches in der Lunge ein charakteristisches messbares Schwingungsmuster erzeugt. Mittels Druckfühler können Druckänderungen wahrgenommen werden und der computergesteuerte Ventilator definiert das Lungenvolumen. Die absolute Änderung des Drucks wird mit der absoluten Volumenänderung ins Verhältnis gesetzt, woraus sich die Impedanz ergibt. Wird das Tier nun einem Bronchokonstriktor (hier Methacholin) ausgesetzt, führt dies zur Verengung der Atemwege, wodurch sich der Druck und damit auch die Impedanz erhöhen. Anhand einer Lungenfunktionsgleichung, dem so genannten Konstante-Phase-Modell, lassen sich aus der Impedanz und weiteren Faktoren kleinste krankheitsbedingte Veränderungen in der Lungenmechanik berechnen. Der Frequenzraum der Impedanz setzt sich aus zwei Größen zusammen; dem Widerstand und der Reaktanz (X), und beschreibt als Compliance die Dehnbarkeit der Lunge.

2.2.3.1.1 Inbetriebnahme des flexiVent™-Systems

Die Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent™-System wird über die Software flexiWare™ gesteuert. Hierüber können Ventilationsparameter festgelegt und Messdaten aufgenommen werden. Zunächst wurden Einstellungen für das jeweilige

Experiment vorgenommen. Für die Messungen wurde ein für Mäuse geeignetes Template ausgewählt. Diese Programmvorlage beinhaltet Informationen über die zu analysierende Tierart, Beatmungseinstellungen und Mess- und Aufnahmeoptionen. Vor Messbeginn und einmalig für den gesamten Messtag wurden Zylinder- und Atemwegsdruckmesser kalibriert. Hierfür wurden mit Hilfe eines mit dem Gerät verbundenen Barometers zwei Luftdruckpunkte definiert (0 cm H₂O und 20 cm H₂O) und danach der Tubus den Programmangaben folgend geeicht. Da während des gesamten Messtages mehrere Tubi verwendet wurden, musste die Tubuseichung vor der Messung jeder Maus durchgeführt werden. Hiermit wurde vermieden, dass Widerstandsunterschiede zwischen den Tubi die Ergebnisse verfälschen. Nachdem weitere Angaben über Experimentator, Versuchsbezeichnung und Details zum zu messenden Versuchstier (Versuchstiernummer, Geschlecht, Gewicht, Behandlung) gemacht wurden, war das Gerät bereit für die Messung.

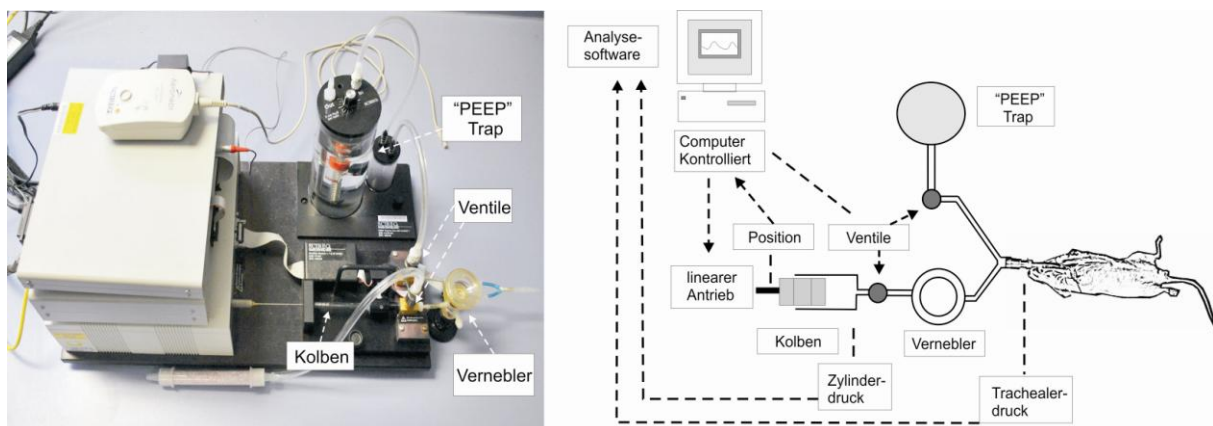


Abbildung 8: Die invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent™-System.

Apparatur (links) und schematische Darstellung (rechts). Ventilation und Datenerfassung verlaufen computergesteuert. Dabei werden Kolbendruck und Ventilationsfrequenz kontrolliert. Druckunterschiede zur Berechnung der Messparameter werden über Ventile erfasst. Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) wird über *PEEP-Trap* reguliert. (Quelle: *Die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung*, Dissertation von Dr. Sebastian Reuter, 2009, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

2.2.3.1.2 Durchführung der Messung und Auswertung

Mittels einer Tracheotomie sollte ein Atemwegszugang über einen Tubus gelegt werden. Dafür wurde die Maus erst gewogen, dann durch systemische Gabe eines Betäubungsmittels (Pentobarbital-Natrium) in die Bauchhöhle sediert, sodass Bewusstsein, Schmerzempfinden und Eigenatmung ausgeschaltet wurden. Das Barbiturat Narcoren® (0,16 g/ml, Merial, Halbermoos) wurde 1:5 in PBS verdünnt und i. p. mit einer Einmalspritze verabreicht. Mittels Luftröhrenschnitt wurde die betäubte Maus tracheal intubiert und mit dem Lungenfunktionsapparat verbunden. Die künstliche Beatmung erfolgte standardisiert mit einer Frequenz von 120 Atemzügen/min und 10 mg/kg Tidalvolumen und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) wurde auf 5 cm/H₂O festgelegt. Der erste Messdurchgang galt als Leerwertbestimmung. Mit einer „Snapshot-150“-Funktion wurden die ansteigenden Werte für Lungenwiderstand und Compliance in 15-sekündigen Abständen so lange aufgenommen, bis eine Plateauphase erreicht war. Bevor nun die Werte nach Provokation mit Methacholin bestimmt werden konnten, wurden die Atemwege des Versuchstiers zunächst mit PBS als Kontrolle vernebelt. 1 ml PBS wurden dabei in den Vernebler gegeben und als Aerosol in die Lunge gepumpt. Während des Verneblungsprozesses reduzierte man die Beatmungsfrequenz auf 60 Atemzüge/min und erhöhte das Tidalvolumen auf 10 ml/kg. Nach einer kurzen Blähung der Lunge wurde für 10 s vernebelt und danach wieder auf Standardbeatmung geschaltet. Bestimmung von Lungenwiderstand und Compliance erfolgten entsprechend der Leerwertbestimmung. Sobald die Plateauphase erreicht war, wurde jeweils 1 ml Methacholin in seriell steigenden Dosen (3,125 / 6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100 mg/ml, verdünnt in PBS) in den Vernebler gegeben und der Messvorgang wiederholt, bis mit diesem Versuchstier Werte für jede Dosis ermittelt wurden. Nach der Messung jeder Maus wurde der Vernebler mit Aqua dest. gereinigt und Feuchtigkeitsrückstände in den Verbindungsstücken durch Druckluft entfernt.

Die aus der Lungenfunktionsmessung erhaltenen Daten wurden mit *Microsoft® Office Excel 2007* ausgewertet. Dabei wurden je Versuchstier in jeder gemessenen Methacholindosis bzw. Kontrolle die maximalen Widerstands- und Compliancewerte ermittelt. Anhand dieser Daten konnten so der prozentuale Anstieg des Atemwegswiderstandes bzw. die prozentuale Reduktion der Compliance als

Reaktion auf Provokation mit Methacholin relativ zur PBS-Kontrolle dargestellt werden.

2.2.4 Entnahme der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Analyse der BAL sollte Aufschluss über zelluläre Komposition und Zytokinsekretion in den Atemwegen geben. Dafür wurden die betäubten Tiere zunächst mittels Luftröhrenschnitt tracheal intubiert und der Tubus durch OP-Garn fixiert. Der Tubus bot nun Zugang, um 1 ml PBS 1x langsam mittels Einwegspritze in die Atemwege zu pumpen und diese zu spülen. Durch vorsichtiges Aufziehen der Spritze konnte dann die BAL mit einem Durchschnittsvolumen von 800-900 µl gewonnen werden. In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, wurden die Zellen der BAL bei 1200 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS 1x aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5 Differenzierung von BAL Zellen mittels Zytospin

Mit der BAL wurden Zytospins durchgeführt, um die Zellkompositionen in den Atemwegen mikroskopisch untersuchen zu können. Hierfür wurden die Zellen mittels Zentrifugalkraft auf Objektträger gebracht, welche man anschließend mit Färbelösungen behandelte und mikroskopisch analysierte.

Für die Anfertigung von Zytospins stand eine Zytofuge zur Verfügung. Der Objektträger wurde zusammen mit einem Filterpapier und einem Trichter in einer Zytofugenklammer stabilisiert und schließlich in der Zytofuge positioniert. Von der aufbereiteten BAL wurden 100 µl in den Trichter pipettiert und dann bei 900 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Nach Herauslösen des mit Zellen beladenen Objektträgers wurde er über Nacht bei RT getrocknet. Um die Zellen differenzieren zu können wurden sie einer H&E-Färbung (vgl. 2.2.8.5.1) mit dem Microscopy Hemacolor® (IVD)-Kit (Merck, Darmstadt) unterzogen. Hierbei wurde der Objektträger fünfmal für 1 s in die farblose Fixierlösung (Lösung 1) getaucht und auf einem saugfähigen Papiertuch gut abgetropft. Als nächstes wurde der Objektträger

auf gleiche Weise in der roten Lösung (Lösung 2) gebadet, ebenfalls abgetropft und schließlich mit der blauen Lösung 3 behandelt. Als letzten Schritt wurde überschüssige Färbelösung mit „Puffer nach Weise“ abgespült. Die angefärbten Zellen konnten nun mit einem Lichtmikroskop analysiert und Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophile, sowie eosinophile Granulozyten aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften differenziert werden. Für die Differentialzählung wurden insgesamt mindestens 200 Zellen gezählt. Mit Hilfe von *Microsoft® Office Excel 2007* wurden relative, sowie absolute Anteile der verschiedenen Zelltypen in der BAL berechnet.

2.2.6 Präparation der Lungenzellen

Bevor die Lunge entfernt wurde, wurde sie über die rechte Herzkammer mittels einer 10 ml Einmalspritze und Kanüle (0,4 x 12 mm) mit etwa 3 ml PBS 1x perfundiert, um Erythrozyten aus dem Gewebe zu entfernen. Die Lunge wurde dann mit einer Schere in einer Petrischale zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Petrischale wurde mit 2,5 ml PBS 1x gespült und dies ebenfalls dem zerkleinerten Lungengewebe im 50 ml Reaktionsgefäß zugefügt. Als nächstes erfolgte der Verdau des Lungengewebes durch Inkubation mit 0,5 mg/ml Kollagenase I für 1 h in einem 37°C warmen, schwenkenden Wasserbad. Durch mehrmaliges Aufziehen der Gewebsmasse durch eine 10 ml Einmalspritze mit Kanüle (0,9 x 40 mm) wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die daraufhin mittels eines Zellsiebs (70 µm) von größeren Gewebeklumpen befreit wurde. Nach anschließender Sedimentation und Abziehen des Überstandes erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit Gey's Lösung für 1 min bei RT. Durch Zugabe von 10 ml PBS 1x und anschließender Zentrifugation wurde die Reaktion gestoppt. Erneutes Waschen des Pellets in 10 ml PBS 1x befreite die Zellen von letzten Rückständen des Lysepuffers und anschließend folgte für die Lebendzellzahlbestimmung.

2.2.7 Präparation des trachealen Lymphknotens (tLN)

Zur Zellisolierung aus den trachealen Lymphknoten (tLN) wurden diese zunächst in 2 ml HBSS zwischen den rauhen Seiten zweier steriler Objektträger in einer kleinen

Petrischale zerrieben. Die vorgelegte Flüssigkeit diente dabei zur Spülung der Objektträger und somit zur Minimierung des Zellverlusts. Aus der Petrischale wurde die Zellsuspension dann über ein 40 µm Zellsieb in ein 3 ml Reaktionsgefäß übertragen und die Schale nochmals mit 1 ml HBSS gespült. In einer 4°C gekühlten Zentrifuge wurden die Zellen bei 1200 rpm sedimentiert und für die Lebendzellzahlbestimmung in 1 ml HBSS aufgenommen.

2.2.8 Histologie

2.2.8.1 Fixierung der Lunge für histologische Analysen

Histologische Analysen wurden durchgeführt, um pathologische Veränderungen wie Inflammation und Mukusproduktion in den Atemwegen bestimmen und bewerten zu können. Vor Entnahme der Lunge wurden die Tiere zuerst wie oben beschrieben intubiert. Durch den positionierten und fixierten Tubus wurde die Lunge mittels Histofix anhand einer Einmalspritze aufgebläht, um eine entfaltete Gewebsstruktur zu gewährleisten. Die aufgeblähte Lunge wurde daraufhin an der Trachea fixiert, sodass ein Auslaufen der Fixierlösung verhindert wurde. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die geblähten Lungen in 15 ml Reaktionsgefäßen vollständig mit Histofix bedeckt bei RT aufbewahrt.

2.2.8.2 Paraffin-Einbettung der fixierten Lungen

Nach der Fixierung wurden die Lungen zunächst in Paraffin eingebettet, um stabile Schnitte mit möglichst geringer Schichtdicke anfertigen zu können. Hierfür wurden die fixierten Organe auf einer mit Löchern versehenen Eindeckkapsel positioniert und über Nacht in einer Einbettstation entwässert. Anschließend wurde die entwässerte Lunge in der Eindeckkapsel auf eine Wärmeplatte gelegt und der Boden eines Ausgießförmchens mit warmem Paraffin benetzt. Das entwässerte Lungengewebe in der Eindeckkapsel wurde dann in das flüssige Paraffin gesetzt, woraufhin es durch die Löcher in die Kapsel eindringen und das Lungengewebe ummanteln konnte. Zum Aushärten des Paraffins legte man die Eindeckkapsel auf eine -20°C Kühlplatte.

Nach etwa 30 min konnte das Lungengewebe im gehärteten Paraffinblock aus der Kapsel gelöst und überschüssiges Paraffin entfernt werden.

2.2.8.3 Paraffin-Schnitte

Nach Einbettung der Lunge wurden die gehärteten Paraffinblöcke in ein halbautomatisches Rotationsmikrotom eingespannt. Bei einem Vorschub von 20 µm wurde der Block so weit geschnitten, bis eine geeignete Schnittebene erreicht wurde. Dann wurde der Block erneut bei -15°C kurz abgekühlt und wieder in das Rotationsmikrotom gespannt. Nun wurde der Vorschub auf 4 µm reduziert und der Paraffinblock geschnitten. Um die angefertigten Gewebsschnitte zu strecken, wurden sie in ein Wasserbad (45°C) überführt. Von dort aus wurden zwei Schnitte auf einen Objektträger geschwemmt und diese anschließend auf einer Wärmeplatte bei 50°C getrocknet. Nach 30 min wurden die Schnitte in einen Trockenschrank überführt und dort bei 60°C für 20 min inkubiert. Nach einer letzten Abkühlphase waren die Schnitte für weitere Verwendungen bereit.

2.2.8.4 Entparaffinierung der Präparate

Um die geschnittenen Gewebspräparate für pathologische Analysen zu färben, mussten sie zunächst vom Paraffin befreit werden. Hierfür inkubierte man sie zweimal für 5 min in Xylol und führte eine anschließende Waschung in der alkoholischen Reihe durch. Dabei wurden die Präparate jeweils zweimal für 2 min in 100%, 96% und 70% Alkohollösung inkubiert und schließlich 2 min in Aqua dest. gewaschen.

2.2.8.5 Histologische Färbungen

2.2.8.5.1 H&E-Färbung (Hämatoxylin-Eosin)

Die Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe können besonders gut mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) sichtbar gemacht werden. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin wird für die Färbung zum basophilen Hämalaun aufbereitet und hebt durch Blaufärbung saure bzw. basophile Strukturen, wie

Zellkerne mit enthaltener DNA und Ribosomen, hervor. Der synthetische Farbstoff Eosin hat saure Eigenschaften und stellt basische bzw. acidophile Strukturen, z. B. Zellplasmaproteine, rot dar.

Die entparaffinierten Schnittpräparate wurden für den Färbeprozess in einem Färbegestell positioniert und im ersten Schritt in einem Behälter mit verdünnter Hämalaun Lösung (1:5 mit Aqua dest.) für 5 bis 7 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für 5 min mit Aqua dest. gewaschen und als nächstes in einem Behälter mit Eosin (Stammlösung + 6 Tropfen Eisessig) positioniert. Nach 40 s wurden die Präparate mit Leitungswasser gespült und mittels aufsteigender alkoholischer Reihe wieder eingedeckt. Dafür wurden die Präparate jeweils für etwa 10 s in 70%, 96% und schließlich 100% Alkohollösungen gehalten und zwischen den Schritten gut abgetropft. Ein zweimaliges Xylolbad und die Verwendung von Entellan® schlossen die Eindeckung ab.

Die Analyse der H&E-gefärbten Lungensektionen erfolgte anhand eines festgelegten, semiquantitativen Einstufungssystems (0 = keine Entzündung, 4 = starke Entzündung), wodurch der Grad der in den peribronchialen und perivaskulären Arealen der Lunge vorherrschenden Entzündung bewertet und darstellbar gemacht wurde. Es wurden in jeder Probe drei unterschiedliche Bereiche der Lungensektion evaluiert.

2.2.8.5.2 PAS –Färbung (Perjodsäure-Leukofuchsin)

In den Lungengewebssektionen können anhand einer PAS-Färbung (*Periodic Acid-Schiff Reaction*) mukusproduzierende Lungenepithelzellen und die Becherzellmetaplasie hervorgehoben werden. Mukus besteht zu 1 – 2% aus Muzinen (Mukopolysaccharide, Glykoproteine). Deren freie Hydroxylgruppen werden durch die im PAS-Reagenz enthaltene Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Im Schiff-Reagenz befindet sich schwefelsaures Fuchsin, welches mit den gebildeten Aldehydgruppen rot-violette Komplexe bildet und dann als solche Färbung im Lungengewebschnitt erkennbar ist.

Die entparaffinierten Lungensektionen (siehe 2.2.8.4) wurden in einem Färbegestell für 10 min in 2% Perjodsäure inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gespült und für 2 min in einem mit Aqua dest. gefüllten

Färbeglasbehälter positioniert. Die Gewebeschnitte wurden dann für 20 min in einem weiteren Färbeglasbehälter mit Schiff-Reagenz behandelt, danach zweimal für je 1 min in SO₂-Wasser gewaschen und schließlich 10 min unter fließendem Wasser gespült, bis sie für 2 min in einem mit Aqua dest. gefüllten Färbeglasbehälter gegeben wurden. Die Schnitte wurden dann für 45 s in einem Färbeglasbehälter Hämalaun ausgesetzt und 5 min unter fließendem Wasser gebläut. Die Entwässerung der Gewebsektionen erfolgte durch zweimalige Inkubation für je 2 min in absolutem Alkohol und Xylol. Als Letztes wurden die Schnitte in Entellan® eingedeckt.

Um die Becherzellmetaplasie anhand der PAS-gefärbten Lungensektionen zu evaluieren, wurde mit Hilfe der Software *analysis* (Olympus Soft Imaging Software™) die Anzahl der Becherzellen bestimmt, die sich innerhalb eines definierten Areals auf dem Lungenepithel befanden. Dabei wurden nur die Zellen gezählt, deren dunkelviolette PAS-Färbung >75% der gesamten Becherzelle umfasste. Je Lungensektion wurden drei unterschiedliche Areale untersucht und schließlich die Becherzellen pro mm Basalmembran angegeben.

2.2.9 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der experimentellen Daten wurde die Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt, um Differenzebenen zwischen den untersuchten Gruppen zu bestimmen. In der Auswertung der Lungenfunktionsdaten wurden Unterschiede in der Atemwegsreaktivität auf Methacholinprovokation durch konstante ANOVA Bestimmungen ermittelt. Der Vergleich von Gruppenpaarungen erfolgte anhand des *Tukey-Kramer* Signifikanztests. Die Granulozytenzellzahlen, der histologische Inflammationsgrad und die Zahl der PAS⁺ Zellen wurden durch einen nicht-parametrischen ANOVA Test (*Kruskal-Wallis* Test) analysiert. Bei signifikanten Unterschieden wurde der *Mann-Whitney U* Test verwendet, um spezifische, statistische Signifikanzen genauer zu ermitteln. Die *p*-Werte der Signifikanz wurden auf 0,05 festgelegt. Für alle Messungen sind die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Die nTreg-vermittelte Suppression von Th2 Zellen wird durch PDE4-Inhibition verstärkt.

Frisch isolierte $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nTregs sind in der Lage, naive $CD4^+$ T-Effektorzellen zu supprimieren. Die Effektivität von voraktivierten nTregs (preTregs) bei der Inhibition von Th2-Effektorfunktionen ist aber deutlich höher (103,104). Die Suppressionskapazitäten von naiven und voraktivierten nTregs auf die Th2-vermittelte Zytokinproduktion wurden in den durchgeführten Experimenten durch Kokultivierung verglichen. Isolierte und differenzierte Th2 Zellen wurden mit frisch isolierten nTregs bzw. voraktivierten preTregs in verschiedenen Verhältnissen kultiviert und anschließend die Th2-vermittelte IL-4 Produktion durch ELISA bestimmt. Während frische nTregs nur eingeschränkten inhibitorischen Einfluss nahmen, supprimierten preTregs die Th2-vermittelte IL-4 Sekretion effektiv und dosisabhängig (Abbildung 9). Wurden Th2 Zellen und nTregs in gleichen Teilen kokultiviert (1:1), verringerte sich die IL-4 Produktion um etwa 35%. Im Gegensatz dazu waren preTregs in der Lage, die Zytokinproduktion der Th2 Zellen um ca. 90% zu supprimieren. Reduzierte man die Zahl der nTregs bzw. preTregs in Kultur, reduzierte sich auch die Suppressionskapazität. Bei Verwendung von einem Verhältnis preTreg zu Th2 Zellen von 1:10, konnten preTregs die IL-4-Produktion noch um etwa 70% inhibieren, die gleiche Zahl nTregs beeinflusste die Zytokinsekretion nur noch um rund 10%. In bereits publizierten Daten wurde beschrieben, dass natürlich vorkommende Tregs im Allgemeinen ihre Suppression durch den zellkontaktabhängigen Transfer von Molekülen des sekundären Botenstoffs cAMP in die Effektorzelle vermitteln können (43). Demnach hat ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts die Hemmung der Effektorfunktionen der supprimierten Zelle zur Folge. Diese Hemmung ist reversibel und kann durch das Enzym PDE, in diesem Fall die Isoform PDE4 und deren katalytische Umsetzung der cAMP-Moleküle zu 5'-AMP wieder aufgehoben werden. In den nun durchgeführten Experimenten wurde untersucht, ob die Inhibition der PDE4-Funktion die cAMP-Moleküle in der supprimierten $CD4^+$ Zelle stabilisiert und dadurch die nTreg-vermittelte Suppression unterstützt wird. Dafür wurden 300 nM des PDE4-Inhibitors

Rolipram der Th2-nTreg-Kokultur für die gesamte Inkubationszeit zugefügt. In der Tat verstärkten sich die suppressiven Eigenschaften auf die IL-4 Produktion der Th2 Zellen sowohl bei frischen nTregs, als auch bei den preTregs.

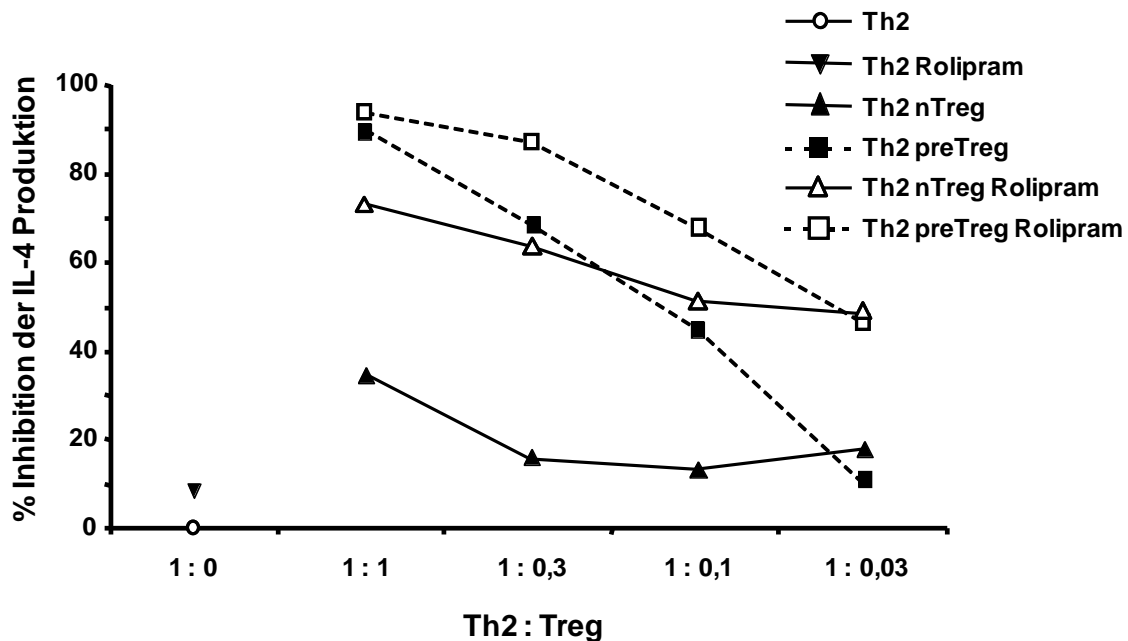


Abbildung 9: Die PDE4-Inhibition in Th2 Zellen erhöht deren Empfänglichkeit für die nTreg-vermittelte Suppression.

OVA-spezifische Th2 Zellen (2×10^5 Zellen/ml), isoliert aus BALB DO11.10 Mäusen, wurden alleine, zusammen mit frisch isolierten, OVA-spezifischen nTregs oder voraktivierten nTregs (preTregs) in unterschiedlichen Verhältnissen mit oder ohne 300 nM Rolipram inkubiert. Nach 48 h wurde die IL-4 Produktion aus dem Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt und die prozentuale Inhibition berechnet. In der Abbildung sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten dargestellt.

Die vergleichsweise niedrige Suppressionskapazität der frischen nTregs konnte durch den PDE4-Inhibitor Rolipram um etwa 30% erhöht werden. Auch die Inhibition durch preTregs war effektiver in Anwesenheit von Rolipram. So konnten selbst geringe preTreg-Mengen (Th2 : preTregs 1:0,3 – 1:0,03) die IL-4 Produktion immer noch um 50 – 60% reduzieren. Da solche Verhältnisse zwischen T-Effektorzelle und

nTregs in vivo in gesunden Organismen physiologisch tatsächlich nachweisbar sind, erscheint die PDE4-Inhibition durch Rolipram als eine Möglichkeit, Th2-induzierte Erkrankungen zu therapieren. Dabei werden lediglich die regulatorischen Effekte der nTregs unterstützt, da in der supprimierten Zelle intrazelluläres cAMP stabilisiert und nicht umgesetzt wird. Behandelte man Th2 Zellen alleine (1:0) mit Rolipram, beeinflusste dies die IL-4 Produktion nur minimal, wie in Abbildung 9 zu sehen ist. Da voraktivierte preTregs verglichen zu frisch isolierten nTregs die Th2-vermittelte IL-4 Sekretion effektiver supprimieren konnten, wurden in den weiterführenden Experimenten preTregs eingesetzt.

Dass die PDE4-Inhibition Auswirkungen auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen hat, zeigte sich in der folgenden Analyse. Dafür wurden CD90.2⁺ Th2 Zellen alleine, mit CD90.1⁺ preTregs (1:1), mit 300 nM Rolipram oder mit beiden Komponenten kombiniert kultiviert. Aus der Th2/preTreg-Kokultur wurden die CD90.1⁺ preTregs durch FACS-basierte Zellseparation depletiert, sodass schließlich die Population der CD90.2⁺ Th2 Zellen mit einer 98% übersteigenden Reinheit vorlag (Daten nicht gezeigt). Nun konnte der intrazelluläre cAMP-Gehalt der reinen CD90.2⁺ Th2 Zellpopulation durch ELISA ermittelt werden. In Abbildung 10 sind die cAMP-Konzentrationen der unterschiedlich behandelten Th2 Zellen dargestellt. Alleine kultivierte Th2 Zellen besaßen nur sehr geringe Mengen an intrazellulärem cAMP und dieser Zustand wurde durch Zugabe von Rolipram nur minimal beeinflusst. Kultivierte man aber die Th2 Zellen mit preTregs, spiegelte sich deren Suppression in einer signifikant erhöhten cAMP-Konzentration wieder. Kombinierte man nun die Th2/preTreg-Kokultur mit der Gabe von Rolipram, hatte dies einen synergistisch steigernden Effekt auf den intrazellulären cAMP-Gehalt der supprimierten Th2 Zellen. Eine Rolipram-Behandlung von preTregs alleine steigerte den cAMP-Spiegel mäßig um etwa 30% (Daten nicht gezeigt).

Diese In vitro-Daten zeigen, dass die Inhibition von PDE4 die suppressive Fähigkeit von preTregs auf Th2 Effektorzellen effektiv verstärkt. Der intrazelluläre, PDE4-katalysierte Umsatz der transferierten cAMP-Moleküle wird offenbar in der supprimierten Th2 Zelle blockiert und somit hohe cAMP-Konzentrationen aufrecht erhalten.

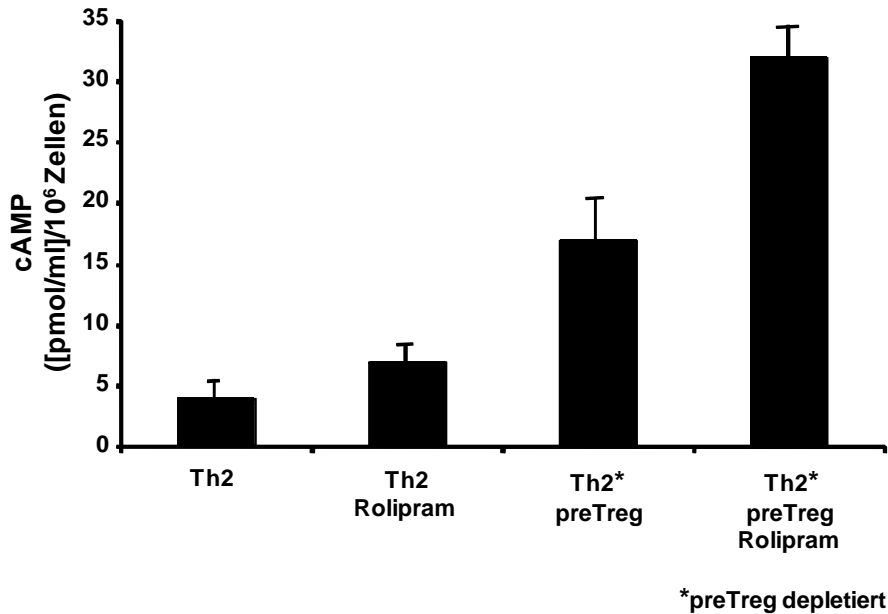


Abbildung 10: Durch PDE4-Inhibition wird die Suppressivität der preTregs durch Hemmung des cAMP Abbaus erhöht.

OVA-spezifische CD90.2⁺ Th2 Zellen (1×10^6 Zellen/ml), isoliert aus BALB DO11.10 Mäusen, wurden mit oder ohne 300 nM Rolipram und in An- oder Abwesenheit von OVA-spezifischen, aus BALB DO11.10 Thy1.1 Tieren extrahierte, CD90.1⁺ preTregs (1×10^6 Zellen/ml) kultiviert. Nach 4 h wurden die CD90.1⁺ preTregs durch FACS Separation aus der Kokultur depletiert. Der zytosolische cAMP-Gehalt in den CD90.2⁺ Th2 Zellen wurde mittels ELISA bestimmt. Diese Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments von drei durchgeführten Versuchen dar. $n \geq 8$.

3.2 Die Behandlung mit PDE4-Inhibitor verbessert die suppressive Fähigkeit der preTregs auf eine Th2-vermittelte AHR

Nachdem die Effekte der PDE4-Inhibition auf die Th2-Effektorfunktionen in vitro gezeigt wurden, sollte untersucht werden, ob entsprechende Wirkungen auch in vivo in einem Mausmodell einer Th2-induzierten, allergischen Atemwegserkrankung beobachtet werden können. Wie oben schon erwähnt, wurden für In vivo-Experimente in vitro voraktivierte und expandierte CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs, also preTregs, eingesetzt, da sie verglichen zu frisch isolierten nTregs CD4⁺ T-Effektorzellen weitaus effektiver inhibieren können. Abgesehen davon ist die Isolationsausbeute an nTregs aus der Milz so gering, dass die für In vivo-

Experimente notwendigen Zellmengen ohne In vitro-Zellexpansion kaum erreicht werden können. Um einen regulatorischen Einfluss auf eine Th2-induzierte, allergische Atemwegsentzündung und AHR in vivo zu untersuchen, wurden zunächst aus Mäusen des Stammes BALB DO11.10 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert. Diese Zellen exprimieren einen transgenen TCR für die Erkennung des OVA Proteins und CD90.2. Die extrahierten CD4⁺ T-Zellen wurden dann in vitro in Th2 Zellen polarisiert und expandiert. Als Donoren für CD4⁺CD25⁺ nTregs dienten Mäuse des Stammes BALB/c DO11.10 Thy1.1, deren OVA-transgene CD4⁺ T-Zellen statt CD90.2 das Alloantigen CD90.1 exprimieren. Die isolierten nTregs wurden expandiert und zu preTregs voraktiviert. CD90.1⁺ preTregs und CD90.2⁺ Th2 Zellen wurden in lymphozytendefiziente Rag2^{-/-}Mäuse mit einem 7-tägigen Abstand transferiert (jeweils 2 x 10⁶ Zellen/Maus, vgl. Abbildung 6). Zur Kontrolle wurden weiteren Rag2^{-/-} Mäusen statt Zellen PBS 1x i. v. appliziert (PBS). 24 h nach dem letzten Zelltransfer wurden die Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen gegenüber OVA Aerosol exponiert und 24 h nach der letzten inhalativen Provokation wurde die Lungenfunktion (pulmonaler Widerstand [R_L] und dynamische Compliance [C_{dyn}]) der Tiere bestimmt (Abbildung 11).

Auf eine Provokation mit OVA reagierten die nicht-rekonstituierten, PBS-injizierten Mäuse mit einem mäßigen Anstieg des Atemwegswiderstands nach Inhalation steigender Dosen des unspezifischen Bronchokonstriktors Methacholin. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Atemwegswiderstand drastisch, wenn den Tieren zuvor Th2 Zellen transferiert wurden (Th2). Eine i. p. Behandlung dieser Tiere 30 min vor jeder OVA Nebulisierung mit 1 mg/kg Körpergewicht des PDE4-Inhibitors Rolipram (Th2 Rolipram) verursachte keine signifikanten Veränderungen der AHR. Wurden den Th2-Empfängern im Vorfeld preTregs appliziert (Th2 preTreg), zeigte sich lediglich eine mäßige Entspannung des Lungenwiderstandes bei steigenden Methacholindosen. Interessanterweise zeigten Tiere, die sowohl preTregs, als auch Th2 Zellen erhielten und zusätzlich mit Rolipram behandelt wurden (Th2 preTreg Rolipram) keine AHR, sondern einen signifikant reduzierten Atemwegswiderstand, der den PBS-Kontrolltieren entsprach. Durch die alleinige Behandlung mit Rolipram bzw. alleinige Gabe von preTregs war eine Suppression der Th2-induzierten AHR nicht möglich. Kombinierte man aber die Behandlung dieser beiden Komponenten, normalisierte sich die AHR. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PDE4-Inhibition den

suppressiven Effekt von preTregs verstärkt, sodass ein stark erhöhter Atemwegswiderstand reguliert werden kann. Die nahezu vollständige Reduktion der AHR durch eine kombinierte Gabe von Rolipram und preTregs deutet an, dass die suppressive Fähigkeit der preTregs nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* durch die Stabilisation von cAMP intensiviert werden kann.

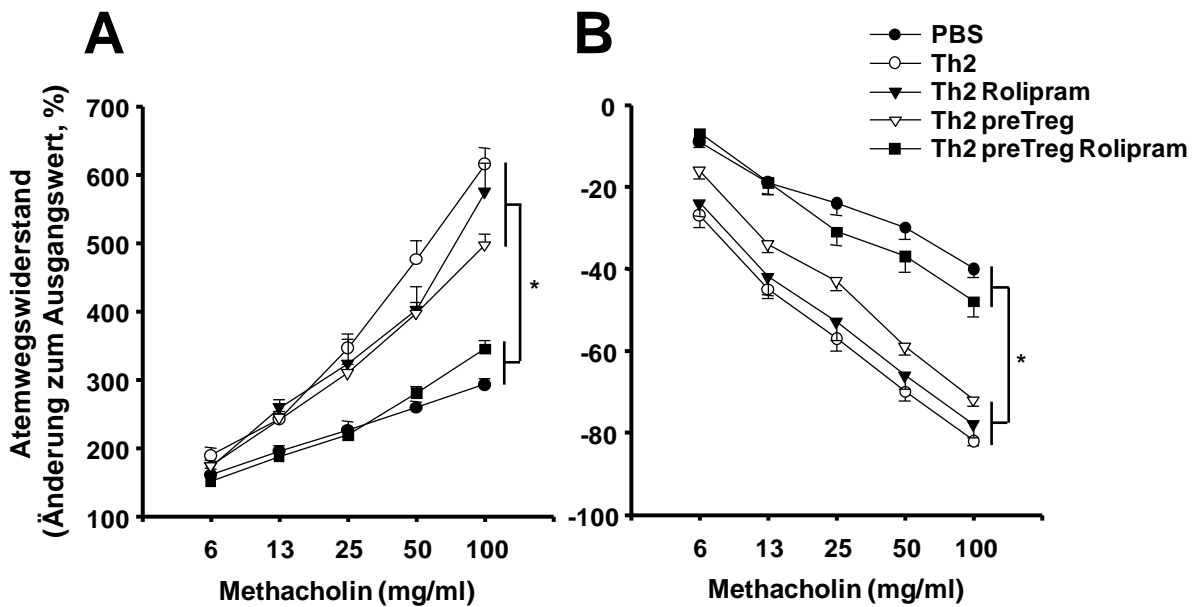


Abbildung 11: Die Inhibition von PDE4 verstärkt die Fähigkeit der preTregs, die AHR in einem prophylaktischen, akuten Modell zu supprimieren.

Lymphozytendefizienten Rag2^{-/-} Mäusen wurden PBS, OVA-spezifische Th2 Zellen (2 x 10⁶ Zellen/Maus), Th2 Zellen und Rolipram (1 mg/kg Körpergewicht), Th2 Zellen und OVA-spezifische preTregs (jeweils 2 x 10⁶ Zellen/Maus) oder Th2 Zellen, preTregs und Rolipram appliziert. An 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere OVA Aerosol exponiert. Die Atemwegsreaktivität (pulmonaler Widerstand [R_L] in A und dynamische Compliance [C_{dyn}] in B) der Mäuse wurde 24 h nach der letzten Allergenprovokation gemessen. Die dargestellten Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten. Mittelwert ± SEM sind gezeigt. * p<0,05. n ≥ 7.

3.3 Die kombinierte Gabe von preTregs und PDE4-Inhibitor reduziert die Th2-induzierte Eosinophilie in den Atemwegen.

Zusätzlich zur AHR gilt die Akkumulation von Entzündungszellen in der Lunge als charakteristisches Merkmal für eine allergische Atemwegserkrankung. Dabei erhält man nähere Informationen über das Krankheitsbild, sobald man die Zellkompositionen in der BAL untersucht und differenziert. Für diese Analyse wurden den rekonstituierten Rag2^{-/-} Mäusen unmittelbar nach der in 3.2 dargestellten Lungenfunktionsmessung die BAL entnommen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Auch wurden Zytospins angefertigt und anhand von H&E-Färbung konnte eine Differenzierung der BAL Zellen durchgeführt werden. So wurde die Frequenz der in die Lunge eingewanderten eosinophilen Granulozyten ermittelt. Unter Berücksichtigung der Gesamtzellzahlen und der prozentualen Anteile der Eosinophilen wurden die absoluten Zellzahlen errechnet.

Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen konnten in der BAL der Th2-rekonstituierten Rag2^{-/-} Mäuse erhöhte Gesamtzellzahlen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch genauere Zelldifferenzierung zeigte sich, dass diese Zellzahlerhöhung vor allem durch gesteigerte Mengen eosinophiler Granulozyten hervorgerufen wurde, deren Akkumulation in der Lunge auf eine starke Entzündung hinweist. Die i. p. Behandlung der Th2-Rezipienten mit Rolipram (1 mg/kg Körpergewicht) vor der Allergenprovokation verursachte keine signifikanten Veränderungen in der Gesamtzellzahl und führte nur zu einer minimalen Reduktion der Eosinophilenzahl in der BAL (Abbildung 12). Ebenso beeinflusste ein vorangeschalteter preTreg-Transfer die Th2-induzierten Zellzahlerhöhungen nur mäßig. Ähnlich den Ergebnissen der Lungenfunktion konnte jedoch beobachtet werden, dass die kombinierte Applikation von preTregs und Rolipram in Th2-rekonstituierten Tieren in einer signifikanten Reduktion sowohl der Gesamtzellzahlen, als auch der Eosinophilenzahlen in der BAL resultierte.

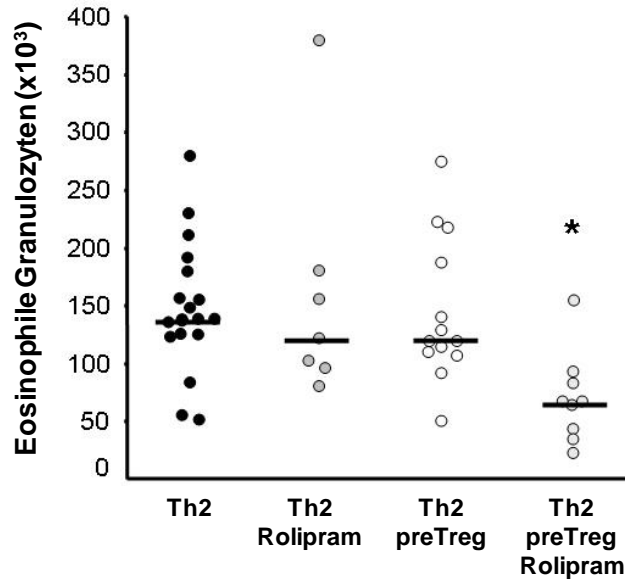


Abbildung 12: Die Inflammation in der BAL ist signifikant reduziert, sobald PDE4 in Anwesenheit von preTregs inhibiert wird.

Lymphozytendefiziente Rag2^{-/-} Mäuse erhielten OVA-spezifische Th2 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus), Th2 Zellen und Rolipram (1 mg/kg Körpergewicht), Th2 Zellen und OVA-spezifische preTregs (jeweils 2×10^6 Zellen/Maus) oder Th2 Zellen, preTregs und Rolipram. Durch OVA Inhalation an 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Atemwege der Tiere provoziert. Die Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten in der BAL wurden 24 h nach der letzten Allergenprovokation mittels Zytospins und Differenzialzählung bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und der Balken steht für den berechneten Mittelwert. * $p < 0,05$ verglichen mit allen anderen Gruppen. $n \geq 7$.

3.4 PDE4-Inhibition und preTreg-Transfer verringern die Th2-induzierte Becherzellmetaplasie und Inflammation des Lungengewebes.

Anhand von histologischen Analysen ist es möglich, den Grad einer Entzündung im Gewebe mikroskopisch zu bewerten. Für solche Analysen wurden die Lungen der Tiere fixiert und Lungenschnitte, wie in 2.2.8 beschrieben, angefertigt. Durch unterschiedliche, histologische Färbungen konnten sowohl die Akkumulation von Entzündungszellen in peribronchialen und perivaskulären Bereichen der Lunge (H&E-Färbung), als auch die Auswirkungen der Entzündung auf die Atemwegsepithelien (PAS-Färbung) dargestellt werden.

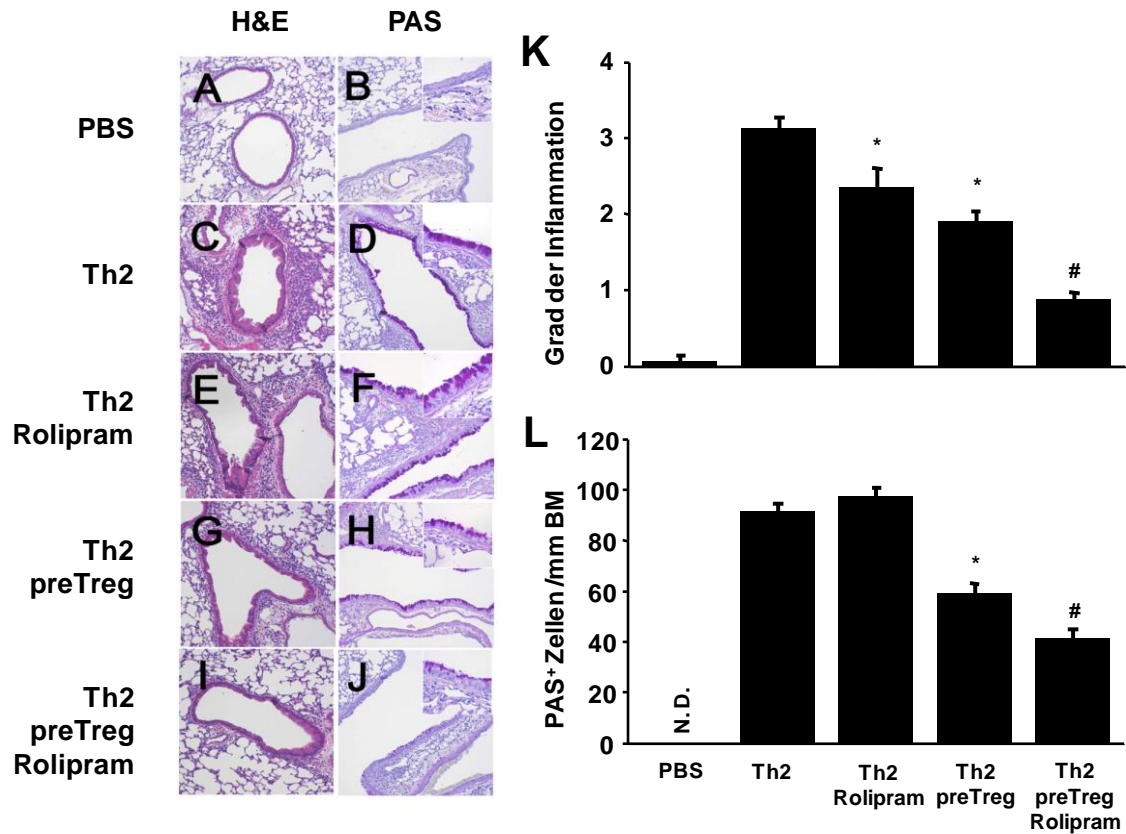


Abbildung 13: Die kombinierte Gabe von Rolipram und preTregs inhibiert die Entzündung des Lungengewebes und die Becherzellmetaplasie.

Rag2^{-/-} Mäuse wurden PBS, Th2 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus), Th2 Zellen und Rolipram (1 mg/kg Körpergewicht), Th2 Zellen und preTregs (jeweils 2×10^6 Zellen/Maus) oder Th2 Zellen, preTregs und Rolipram appliziert. An 6 aufeinanderfolgenden Tagen erfolgte die Provokation der Atemwege der Tiere durch OVA Inhalation. 24 h nach der letzten Allergenprovokation wurde die Gewebsentzündung anhand von H&E-gefärbten und die Becherzellen mittels PAS-gefärbten Lungensektionen evaluiert. Dabei wurden Lungenschnitte von Mäusen analysiert, die nur PBS (A und B, PBS, n = 12), Th2 Zellen (C und D, Th2, n = 18), Th2 Zellen und Rolipram (E und F, Th2 Rolipram, n = 7), Th2 Zellen und preTregs (G und H, Th2 preTreg, n = 16) und Th2 Zellen, Rolipram und preTregs (I und J, Th2 preTreg Rolipram, n = 10) erhielten. A-J: Es sind repräsentative Areale der Lungensektionen mit 100- bzw. 400-fachen Vergrößerungen dargestellt. K: Die Lungensektionen wurden nach dem vorherrschenden, peribronchialen Inflammationsgrad und unter Verwendung eines semiquantitativen Bewertungssystems von 0 bis 4 eingestuft. L: Die Zahl der Mukus-produzierenden PAS⁺ Zellen wurde pro mm Basalmembran quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. N. D. = nicht detektierbar. * p < 0,05 verglichen mit Th2, # p < 0,05 verglichen mit allen anderen Gruppen.

Anhand der H&E-gefärbten Lungensektionen wurde der Grad der in der Lunge vorherrschenden Entzündung bewertet und unter Verwendung eines semiquantitativen Einstufungssystems darstellbar gemacht (Abbildung 13, K).

Entsprechend den in der BAL beobachteten Effekten fanden sich in Th2-rezipienten Tieren im Vergleich zu gesunden Rag2^{-/-} Mäusen ohne Zelltransfer (PBS) nach der Allergenprovokation massive Ansammlungen von Inflammationszellen, die durch Dunkelviolett färbung in den Abbildungen erkennbar sind (Abbildung 13). Diese Zellakkumulationen befanden sich vorwiegend in peribronchialen und perivaskulären Arealen der Lunge. Die i. p. Behandlung der Th2-transferierten, atemwegsprovoozierten Tiere mit Rolipram reduzierte die Gewebsinflammation nur mäßig. Die Menge der Zellansammlungen reduzierte sich geringfügig, wenn den Th2-Empfängern im Vorfeld preTregs verabreicht wurden. Behandelte man aber Th2/preTreg-transferierte Rag2^{-/-} Mäuse zusätzlich mit Rolipram, konnte man in den Lungengewebe dieser Tiere trotz inhalativer Provokation mit OVA eine deutliche Entzündungsreduktion beobachten, was die Erkenntnisse aus der BAL-Analyse unterstützt. Demnach kann die Hemmung der Th2-induzierten Entzündung durch eine kombinierte Gabe von preTregs und Rolipram nicht nur in der BAL, sondern auch histologisch im Lungengewebe veranschaulicht werden.

Zusätzlich zur Entzündung konnten die Auswirkungen auf die Atemwegsepithelien ebenfalls histologisch untersucht werden. Durch die PAS-Färbung der Lungenschnitte war es möglich, erhöhte Mukusproduktion und Becherzellmetaplasie als weitere Erkrankungsindikatoren zu bestimmen. Nach einem Th2-Transfer und folgender Allergenprovokation der Atemwege fand sich nicht nur eine massive Zellinfiltration in der Lunge. Auch die Atemwegsepithelien waren betroffen, verdeutlicht durch gesteigerte Zahlen an mukusproduzierenden, PAS-positiven (PAS⁺) Becherzellen pro mm Basalmembran (Abbildung 13,L). Während die Verabreichung des PDE4-Inhibitors diesen Effekt nicht beeinflussen konnte, wurde die Anzahl der PAS⁺ Zellen durch vorherigen preTreg-Transfer leicht reduziert. Dieser Effekt verstärkte sich durch die zusätzliche Behandlung mit Rolipram vor jeder Allergenprovokation. Die Anzahl an mukusproduzierenden Becherzellen in den Atemwegen verringerte sich in diesen Tieren signifikant.

3.5 Die Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor verstärkt die preTreg-vermittelte Erhöhung der cAMP-Spiegel in den Th2 Zellen in vivo.

In 3.1 konnte in vitro der Mechanismus dargestellt werden, der einer nTreg-vermittelten Suppression zugrunde liegt. Es wurde gezeigt, dass diese T-Zellpopulation ihre regulatorischen Fähigkeiten über einen cAMP-Transfer auf T-Effektorzellen vermitteln, so dass der cAMP-Spiegel in der supprimierten Zelle erhöht wird. In Anwesenheit des PDE4-Inhibitors Rolipram wurde der cAMP-Abbau in den Th2 Zellen blockiert, was zu einer anhaltenden Inhibition der Effektorfunktionen, z. B. der Zytokinproduktion, führte. In bisherigen In vivo-Experimenten im Modell einer allergischen Atemwegserkrankung konnte nachgewiesen werden, dass eine zusätzliche Behandlung mit einem PDE4-Inhibitor die Effektivität von regulatorischen T-Zellen deutlich verstärkt. Ob der in vitro beschriebene, cAMP-abhängige Mechanismus der nTreg-vermittelten Suppression ebenfalls in vivo gilt, sollte untersucht werden. Für diese Analysen wurden lymphozytendefiziente Rag2^{-/-} Mäuse mit CD90.2⁺ Th2 Zellen (2 x 10⁶ Zellen/Maus) mit oder ohne CD90.1⁺ preTregs (2 x 10⁶ Zellen/Maus) entsprechend des in Abbildung 6 beschriebenen Verlaufs rekonstituiert. Vom beschriebenen Protokollverlauf abweichend wurden die Tiere hier nur in den folgenden 4 Tagen mit oder ohne vorangeschaltete Applikation von Rolipram (1 mg/kg Körpergewicht i. p.) inhalativ allergenprovoziert. Eine Stunde nach der letzten Atemwegsprovokation wurden die Lungen der Tiere aufbereitet. Die zuvor transferierten Th2 Zellen wurden anhand ihrer CD90.2 Expression mittels einer kombinierten Zellisolation durch MACS und FACS extrahiert und von CD90.1 exprimierenden preTregs depletiert. Anhand dieser Methodenkombination konnten die Th2 Zellen mit einer Reinheit von >98% gewonnen und ex vivo mittels ELISA deren zytosolischer cAMP-Gehalt bestimmt werden.

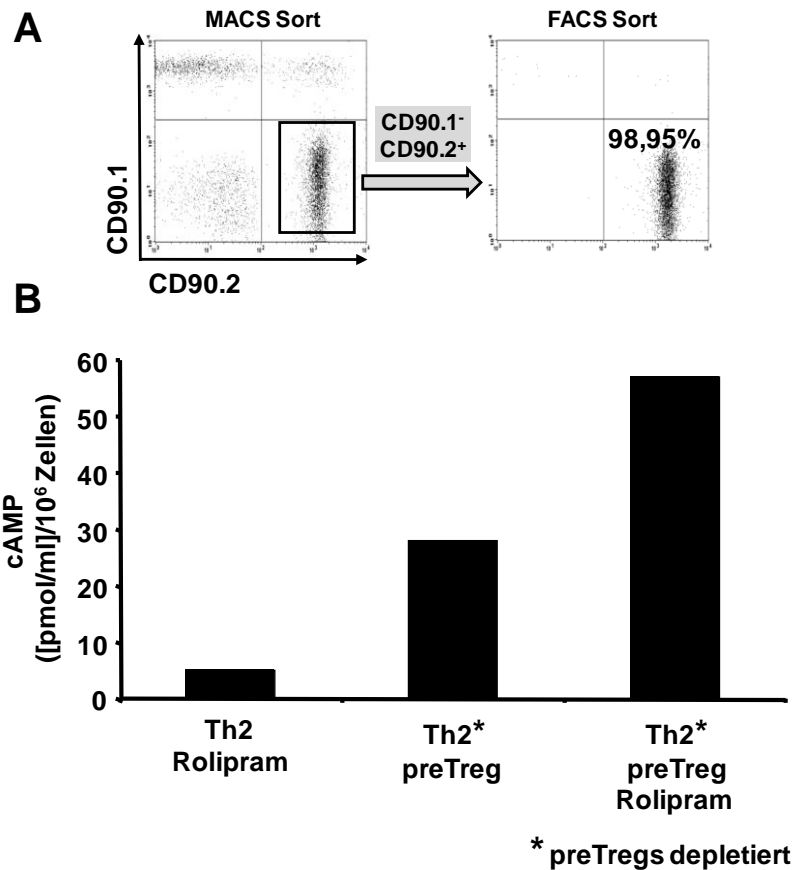


Abbildung 14: Die In vivo-Applikation von Rolipram verstärkt die nTreg-vermittelte Suppression durch Stabilisierung des cAMP-Gehalts in den Th2 Zellen. Rag2^{-/-} Mäuse wurden mit CD90.2⁺ Th2 Zellen (2 x 10⁶ Zellen/Maus) bzw. CD90.1⁺ preTregs (2 x 10⁶ Zellen/Maus) transferiert. In den folgenden 4 Tagen wurden die Atemwege durch OVA Inhalation mit oder ohne vorangeschalteter Roliprambehandlung (1 mg/kg Körpergewicht, i. p.) provoziert. 1 h nach der vierten Allergenprovokation wurden die Lungen der Mäuse präpariert. Anhand einer kombinierten Methode aus MACS® Aufreinigung und FACS Separation wurden aus den Lungen die CD90.2⁺ Th2 Zellen isoliert und die CD90.1⁺ preTregs depletiert. Anschließend wurde der zytosolische cAMP-Gehalt in den aufgereinigten Th2 Zellen mittels ELISA bestimmt. A: Um die Reinheit der Th2 Zellen nach der MACS® Aufreinigung (Bild links) und nach der FACS-basierten Separation (Bild rechts) zu ermitteln, wurden Kontaminierungen durch CD90.1⁺ preTregs durchflusszytometrisch bestimmt. Die Reinheit der isolierten CD90.2⁺ Th2 Zellen betrug im Allgemeinen >98%. B: Die zytosolischen cAMP-Konzentrationen der isolierten Th2 Zellen wurden ex vivo mittels cAMP-spezifischem ELISA bestimmt. In jedem Experiment wurden n = 6 Mäuse pro Gruppe analysiert. Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

In Abbildung 14 ist zu sehen, dass Th2 Zellen aus der Lunge von Tieren mit oder ohne Roliprambehandlung sehr niedrige Konzentrationen von intrazellulärem cAMP aufweisen. Injizierte man Th2-Rezipienten im Vorfeld preTregs, fanden sich um das Dreifache erhöhte cAMP-Mengen in den isolierten Th2 Zellen. Nach einer Behandlung dieser Tiere mit Rolipram während der Allergenprovokation verdoppelte sich nochmal der intrazelluläre Gehalt des sekundären Botenstoffs. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der cAMP-Spiegel in den Th2 Zellen der Lunge nur in Anwesenheit von preTregs erhöht wird. Demnach sind diese regulatorischen Lymphozyten auch in vivo in der Lage, die Anzahl der cAMP-Moleküle in der supprimierten Effektorzelle zu steigern. Eine Verstärkung des cAMP-abhängigen Suppressionsmechanismus konnte durch PDE4-Inhibition und damit durch Blockade des cAMP-Abbaus in der Th2 Zelle erreicht werden. Diese Analysen bestätigen somit, dass nicht nur in vitro sondern auch in vivo die nTreg-basierte Suppression der Th2 Effektorfunktionen von einem cAMP-Transfer abhängig ist und durch Stabilisierung dieser Moleküle der suppressive Effekt intensiviert wird.

3.6 In einem therapeutischen Modell reduzieren preTregs und PDE4-Inhibition die allergische Atemwegserkrankung.

In bisherigen In vivo-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Rolipram die preTreg-vermittelte Suppression einer allergischen Atemwegserkrankung unterstützt. Dabei wurde der PDE4-Inhibitor prophylaktisch eingesetzt, d. h. zu einem Zeitpunkt den Tieren verabreicht, bevor sich die Erkrankung vollständig ausgebildet hat. Um nun zu untersuchen, ob Rolipram in Kombination mit preTregs auch in einem kurativen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung wirksam sind, wurde für weitere Experimente ein therapeutisches Krankheitsmodell ausgewählt. In einem Vorversuch wurden BALB/c Wildtypmäuse mit einem intakten Immunsystem durch zweimalige Immunisierung mit OVA Alum i. p. in einem Abstand von 14 Tagen sensibilisiert. Nach zwei weiteren Wochen wurden als primäre Provokation die Atemwege der Tiere an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit OVA inhalativ provoziert (1% in PBS, 20 min). 6 Wochen danach, d. h. nachdem die primär induzierte Entzündung abgeklungen war, wurden die Tiere erneut einer sekundären Atemwegsprovokation durch Inhalation ausgesetzt (1% in PBS, 20 min). Nach

weiteren 48 h wurden die Tiere auf ihr Krankheitsbild untersucht. Dabei analysierte man die Lungenfunktion und die Akkumulation von Entzündungszellen in der Lunge. 24 h vor der sekundären OVA Exposition wurden den Tieren PBS, 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ oder 5×10^6 preTregs – isoliert aus BALB DO11.10 Thy1.1 Mäusen – injiziert. Als Kontrolle dienten in diesen Experimenten nicht-sensibilisierte, allergenprovozierte bzw. sensibilisierte und allergenprovozierte BALB/c Mäuse ohne preTreg-Transfer.

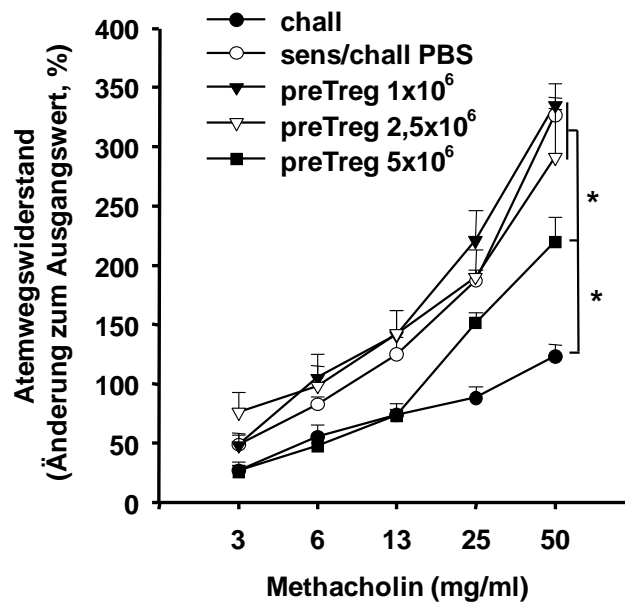


Abbildung 15: Die Applikation von preTregs hat im therapeutischen Modell nur marginale Effekte auf die AHR.

BALB/c Wildtypmäuse wurden durch zweimalige i. p. Behandlung mit OVA Alum an Tag 0 und 14 sensibilisiert. Nach zwei weiteren Wochen wurden zur primären Provokation die Atemwege der Tiere an den Tagen 26, 27, 28 mit OVA nebulisiert (1% in PBS, 20 min). 6 Wochen danach erfolgte die sekundäre Atemwegsprovokation mit OVA (1% in PBS, 20 min). 24 h vor der sekundären OVA Exposition wurden den Tieren i. v. PBS (sens/chall PBS, $n = 5$), 1×10^6 aus BALB DO11.10 Mäusen isolierte preTregs (preTreg 1×10^6 , $n = 5$), $2,5 \times 10^6$ preTregs (preTreg $2,5 \times 10^6$, $n = 5$) oder 5×10^6 preTregs (preTreg 5×10^6 , $n = 5$) transferiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-sensibilisierte, aber allergenexponierte Tiere (chall, $n = 5$). 48 h nach der sekundären Allergenprovokation erfolgte die Messung der Atemwegsreaktivität (R_L). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$.

Im Gegensatz zu nicht-sensibilisierten Mäusen führte die Exposition mit dem Allergen in sensibilisierten Tieren zu einer starken Erhöhung des Atemwegswiderstandes als Reaktion auf steigende Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin (Abbildung 15). Durch zusätzlichen Transfer unterschiedlicher preTreg-Zahlen in die sensibilisierten Tiere wurde die AHR dosisabhängig reduziert. Während die Empfänger von 1×10^6 bzw. $2,5 \times 10^6$ preTregs minimale Veränderungen in der AHR zeigten, reduzierte sich die AHR nach einer Gabe von 5×10^6 preTregs in signifikantem Maße. Jedoch wurde selbst bei einer solchen hohen Zahl an preTregs die allergeninduzierte AHR nicht vollständig supprimiert.

In den folgenden Experimenten sollte die therapeutische Wirkung des PDE4-Inhibitors Rolipram in Kombination mit einer preTreg-Gabe untersucht werden. Um die Rolipram-Wirkung deutlich darstellen zu können, musste ein möglichst geringer Suppressionseffekt durch die preTregs auf die Parameter der Atemwegserkrankung gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurde für weitere Analysen mit $2,5 \times 10^6$ preTregs/Maus die maximale Anzahl transferierter Regulatoren mit einem möglichst geringen Suppressionseffekt auf Inflammation und AHR gewählt.

Anschließend sollte in dem oben beschriebenen Allergiemodell untersucht werden, ob sich die PDE4-Inhibition als Therapie gegen eine allergische Atemwegserkrankung eignet. Dafür wurden die sensibilisierten und primär allergenprovozierten BALB/c Wildtypiere 24 h vor der sekundären OVA Provokation mit $2,5 \times 10^6$ preTregs pro Maus i. v. versehen. Ein Teil der preTreg-transferierten Tiere wurde 2 h vor der sekundären Allergenprovokation und 4 h und 6 h danach mit Rolipram (0,1 mg/kg Körpergewicht) i. p. behandelt. Um zu analysieren, ob Rolipram auch ohne allergenspezifische preTregs Effekte auf Lungenfunktion und Entzündung hervorruft, behandelte man sensibilisierte und allergenprovozierte Tiere mit Rolipram und verzichtete dabei auf einen Transfer OVA-transgener preTregs. Als weitere Kontrollen dienten in diesen Experimenten nur allergenprovozierte Tiere und sensibilisierte, allergenprovozierte Tiere ohne Zelltransfer oder Rolipram-Behandlung.

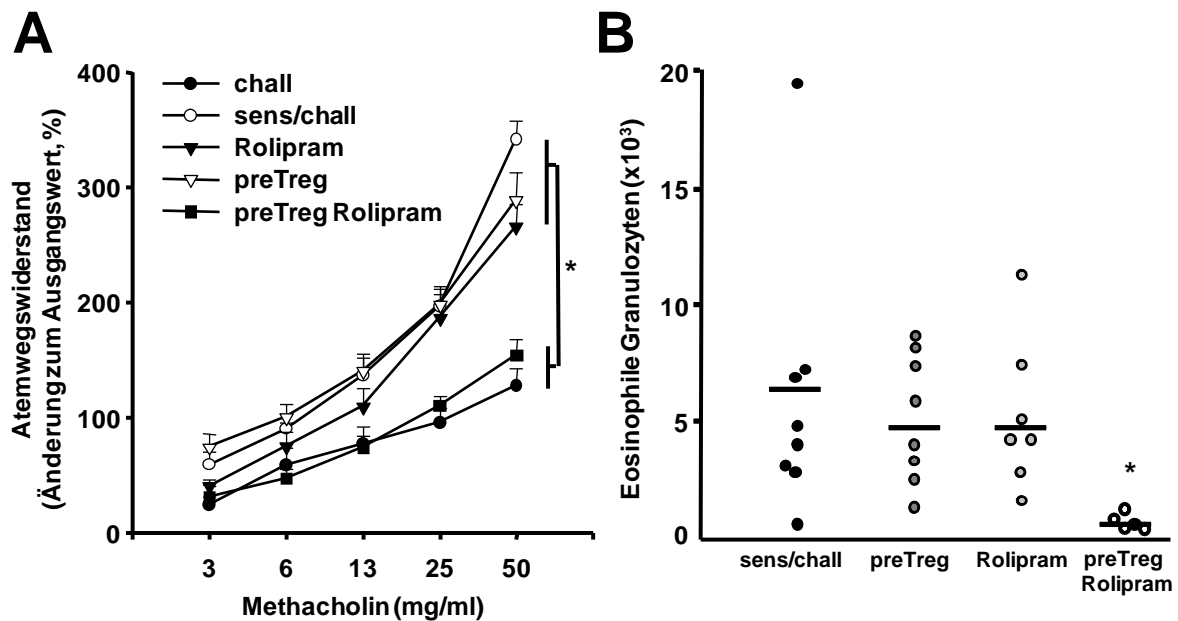


Abbildung 16: Die PDE4-Inhibition verstärkt die suppressive Fähigkeit der preTregs in einem therapeutischen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung.

Die Sensibilisierung der BALB/c Wildtypmäuse erfolgte durch OVA Alum-Injektion i. p. an den Tagen 0 und 14. Nach der letzten Sensibilisierung wurden an den Tagen 26, 27, 28 die Atemwege primär durch OVA Inhalation provoziert (1% in PBS, 20 min). Nach weiteren 6 Wochen erfolgte die sekundäre Atemwegsprovokation durch einmalige OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min). 24 h vor der sekundären OVA Exposition wurden den Tieren $2,5 \times 10^6$ aus BALB DO11.10 Thy1.1 Mäusen isolierte preTregs i. v. transferiert. Die Rolipram-Behandlung wurde 2 h vor der sekundären Allergenprovokation und 4 h und 6 h danach i. p. durchgeführt (0,1 mg/kg Körpergewicht). 48 h nach der sekundären Allergenprovokation wurden der Atemwegswiderstand (A) mittels Lungenfunktionsmessung und die Zellzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL (B) mittels Zytospins und Differentialzählung bestimmt. Analysiert wurden nicht-sensibilisierte, allergenprovozierte (chall, n = 9), sensibilisierte und atemwegsprovozierte (sens/chall, n = 9) und sensibilisierte und allergenprovozierte Mäuse, denen entweder preTregs (preTreg, n = 8) oder Rolipram (Rolipram, n = 5) oder beides (preTreg Rolipram, n = 5) verabreicht wurde. A: Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. B: Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und der Balken stellt den berechneten Mittelwert dar. *p < 0,01

Übereinstimmend mit der Lungenfunktionsmessung des Vorversuchs erhöhte sich in nicht-sensibilisierten, allergenprovozierten Mäusen der Atemwegwiderstand als Reaktion auf Methacholin-Inhalation kaum (Abbildung 16, A). Wurden die Tiere aber im Vorfeld gegen das Allergen sensibilisiert, führten primäre und sekundäre Allergeninhalation zu einer gesteigerten AHR. Die Gabe von $2,5 \times 10^6$ preTregs führte in sensibilisierten Tieren, gemäß des oben aufgeführten Experiments, zu einer geringen, aber nicht signifikanten Minderung der AHR. Ebenso verhielt es sich, wenn sensibilisierte Wildtypmäuse während der sekundären Allergenprovokation mit Rolipram behandelt wurden. Verabreichte man jedoch den Tieren eine Kombination aus antigenspezifischen preTregs und Rolipram, wurde die allergeninduzierte AHR signifikant reduziert.

Des Weiteren wurde in diesem Modell die Ausprägung der lokalen Entzündung mittels Analyse der Zellkomposition in der BAL bestimmt. Einhergehend mit den Beobachtungen in der Lungenfunktionsmessung führen Sensibilisierung und zweimalige Allergenprovokation der BALB/c Wildtypmäuse zu erhöhten Eosinophilenzahlen in der BAL (Abbildung 16, B). Diese Atemwegsentzündung kann weder durch preTreg-Transfer, noch durch Rolipram-Behandlung bedeutend unterdrückt werden. Die Injektion von preTregs kurz vor der sekundären Allergeninhalation und die parallele Applikation des PDE4-Inhibitors normalisierten nicht nur den Atemwegwiderstand. Auch die Eosinophilie in der Lunge war aufgehoben, wie die deutlich gesenkte Eosinophilenzahl in der BAL verdeutlicht. Diese Experimente zeigen, dass sich die PDE4-Inhibition durch Rolipram nicht nur als prophylaktische sondern auch als therapeutische Maßnahme zur Intensivierung der nTreg-vermittelten Suppression einer allergeninduzierten Atemwegserkrankung eignet.

3.7 Die therapeutische Wirkung der cAMP-Stabilisierung wird auch durch andere PDE4-Inhibitoren vermittelt.

Bislang beschrieben die durchgeführten In vivo-Experimente, dass Rolipram sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch die preTreg-vermittelte Suppression der allergischen Atemwegserkrankung verstärkt. Ob diese Wirkungsweise tatsächlich auf die PDE4-Inhibition zurückzuführen ist und nicht einen unspezifischen Nebeneffekt

darstellt, sollte im folgenden Experiment untersucht werden. Dafür wurde das in 2.2.2.4 beschriebene und in 3.6 angewendete, therapeutische Modell durchgeführt. An Stelle einer Rolipram-Behandlung verabreichte man den sensibilisierten BALB/c Wildtypmäusen Piclamilast (0,1 mg/kg Körpergewicht), einen weiteren PDE4-Inhibitor. Wie schon in den vorangegangenen Experimenten reagierten nicht-sensibilisierte Mäuse nach primärer und sekundärer Atemwegsprovokation durch OVA-Inhalation in der Lungenfunktionsmessung nur schwach auf den Bronchokonstriktor Methacholin (Abbildung 17, A). Wurden die Tiere jedoch vorher gegen das Allergen durch zweifache OVA Alum-Injektion i. p. sensibilisiert, erhöhte sich der Atemwegswiderstand drastisch. Auch ein adoptiver Transfer voraktivierter OVA-spezifischer preTregs oder die alleinige Behandlung mit Piclamilast änderten daran nichts. Kombinierte man allerdings den preTreg-Transfer mit der Piclamilast-Gabe, wurde die AHR nahezu vollständig unterdrückt. Diese Ergebnisse wurden durch Analyse der Zellinfiltration in der BAL unterstützt. Durch Sensibilisierung und Atemwegsprovokation hervorgerufene, erhöhte Eosinophilenzahlen wurden weder durch Piclamilast-Behandlung, noch durch preTreg-Übertragung beeinflusst (Abbildung 17, B). Nur eine Kombination dieser beiden Anwendungen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahlen. Diese Beobachtungen zeigen, dass entsprechend der Wirkung von Rolipram auch der PDE4-Inhibitor Piclamilast den supprimierenden Effekt von allergenspezifischen preTregs unterstützt.

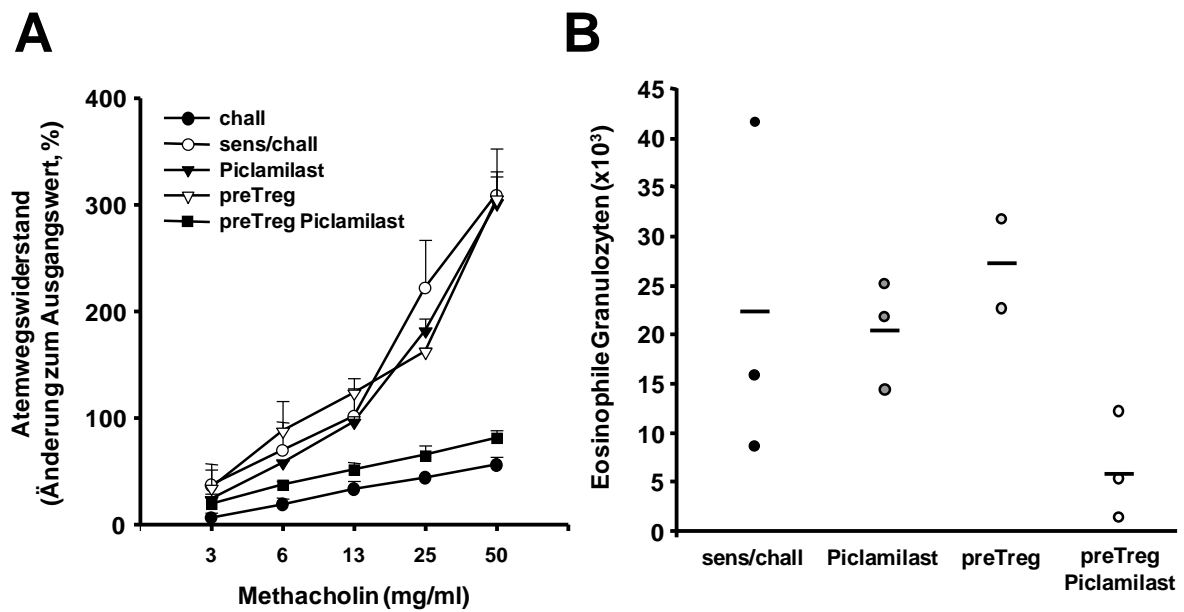


Abbildung 17: Der PDE4-Inhibitor Piclamilast verstärkt die suppressive Kapazität der preTregs in einem therapeutischen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung.

Durch OVA Alum Injektion i. p. an den Tagen 0 und 14 wurden BALB/c Wildtypmäuse sensibilisiert. An den Tagen 26, 27, 28 wurden die Atemwege der Tiere durch OVA Inhalation primär provoziert (1% in PBS, 20 min). Die sekundäre Atemwegsprovokation folgte 6 Wochen darauf durch einmalige Exposition mit OVA Aerosol (1% in PBS, 20 min). 24 h vor der sekundären OVA Inhalation wurden den Tieren $2,5 \times 10^6$ aus BALB DO11.10 Thy1.1 Mäusen isolierte preTregs transferiert. Die Piclamilast-Behandlung wurde 2 h vor der sekundären Allergenprovokation und 4 h und 6 h danach i. p. durchgeführt (0,1 mg/kg Körpergewicht/Injektion). 48 h nach der sekundären Allergenprovokation wurden der Atemwegswiderstand (A) mittels Lungenfunktionsmessung und die Zellzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL (B) mittels Zytospins und Differentialzählung bestimmt. Analysiert wurden nicht-sensibilisierte, allergenprovozierte (chall, n = 3), sensibilisierte und atemwegsprovozierte (sens/chall, n = 3) und sensibilisierte und allergenprovozierte Mäuse, denen entweder preTregs (preTreg, n = 2) oder Piclamilast (Piclamilast, n = 3) oder beides (preTreg Piclamilast, n = 3) verabreicht wurde. A: Mittelwerte \pm SEM sind dargestellt. B: Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und der Balken steht für den errechneten Mittelwert.

3.8 Auch die Th1-induzierte allergische Atemwegserkrankung wird durch preTregs beeinflusst.

Die allergische Atemwegserkrankung besitzt ein komplexes Krankheitsbild, das sich aus mannigfaltigen Ursachen entwickeln kann. Dabei spielen nicht nur Th2 Zellen als Effektoren eine Rolle. Es wurden bereits klinisch unterschiedliche, inflammatorische Phänotypen identifiziert, die eosinophiles und neutrophiles Asthma umfassen. Dabei stellte sich heraus, dass auch Th1 Zellen zur Entwicklung einer antigenspezifischen Atemwegserkrankung beitragen können. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten die Effekte des bisher beschriebenen, preTreg-basierten Suppressionsmechanismus auf eine Th1-induzierte allergische Atemwegserkrankung untersucht werden. Zunächst wurden OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen von BALB DO11.10 Mäusen isoliert und, wie in 2.2.1.2.6 beschrieben, in Th1 Zellen, Th2 Zellen oder preTregs differenziert. Die Zellen wurden entsprechend des in Abbildung 6 dargestellten Protokolls in lymphozytendefiziente Rag2^{-/-} Mäuse transferiert und die Tiere anschließend durch OVA-Inhalation (1% in PBS, 20 min) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen allergenprovoziert. 24 h nach der letzten Atemwegsprovokation erfolgte die Messung der Lungenfunktion.

Nicht nur Th2 Zellen, sondern auch die Gabe von allergenspezifischen Th1 Zellen und eine anschließende Allergeninhalation lösten in Rag2^{-/-} Mäusen eine signifikant gesteigerte AHR aus, verglichen mit PBS-Kontrolltieren, die keine Zellen erhielten (Abbildung 18). Wie schon in 3.2 beobachtet, reduzierte ein vorangeschalteter preTreg-Transfer den erhöhten Atemwegswiderstand erkennbar, eine vollständige Suppression blieb dabei aber aus. Applizierte man preTregs allerdings vor einer Th1-Rekonstitution, konnte eine vollständige Hemmung der AHR als Reaktion auf alle verwendeten Dosen des Bronchokonstriktors beobachtet werden. Der Atemwegswiderstand entsprach nun dem der PBS Kontrolltiere. Diese Daten verdeutlichen, dass preTregs eine deutlich erhöhte suppressive Kapazität auf eine Th1-induzierte AHR verglichen mit einer Th2-vermittelten AHR besitzen.

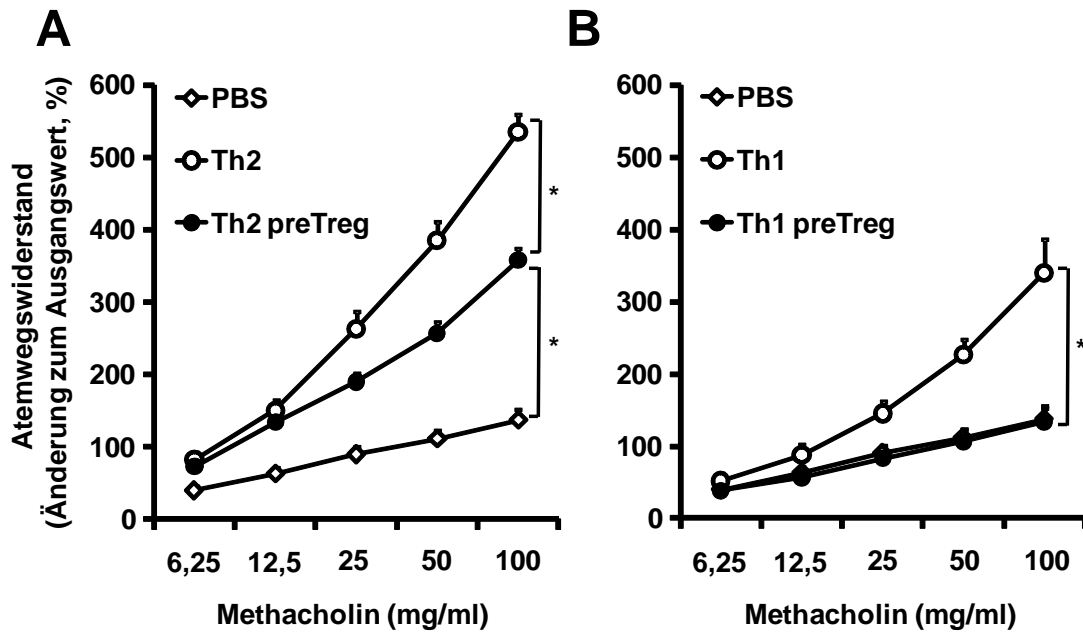


Abbildung 18: preTregs zeigen eine höhere suppressive Kapazität in Th1-induzierter AHR verglichen mit Th2-vermittelter AHR.

Lymphozytendefizienten Rag2^{-/-} Mäusen wurden PBS (PBS, n = 13), 2 x 10⁶ OVA-spezifische Th2 (Th2, n = 23) bzw. Th1 Zellen (Th1, n = 9) alleine oder in Kombination mit 2 x 10⁶ OVA-spezifischen preTregs (Th2 preTreg, n = 16 bzw. Th1 preTreg, n = 8) i. v. transferiert. An 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere OVA Aerosol (1% in PBS, 20 min) exponiert. 24 h nach der letzten Atemwegsprovokation wurde der Atemwegswiderstand (R_L) durch Analyse der Lungenfunktion bestimmt. Mittelwerte ± SEM sind dargestellt. *p < 0,05.

3.9 Im Gegensatz zur Th2-basierten Atemwegsentzündung wird die Th1-induzierte Inflammation in der Lunge durch preTregs effektiv supprimiert.

Durch Analyse der Zellkomposition in der BAL wurde ein weiterer Parameter zum Vergleich zwischen Th1 bzw. Th2-induzierter Atemwegserkrankung hinzugezogen. Für diese Untersuchung wurden den rekonstituierten und atemwegsprovokierten Rag2^{-/-} Mäusen die BAL unmittelbar nach der in 3.8 dargestellten Lungenfunktionsmessung entnommen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Anhand von H&E-gefärbten Zytospins konnte eine Differenzierung der BAL Zellen

durchgeführt werden. So wurde die Frequenz der in die Lunge eingewanderten eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten ermittelt.

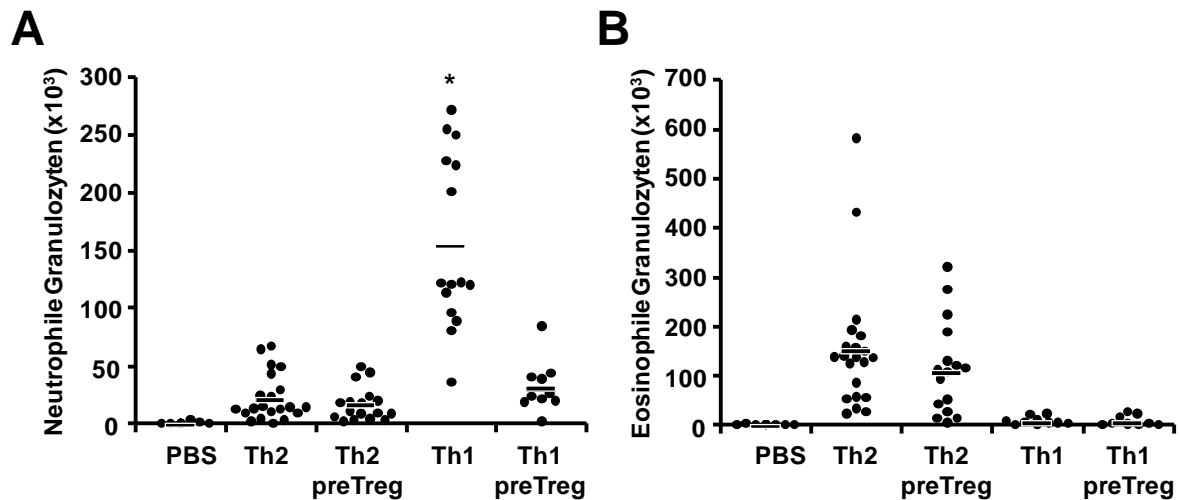


Abbildung 19: preTregs haben keinen Einfluss auf die Th2-induzierte Akkumulation eosinophiler Granulozyten in der BAL, supprimieren aber effektiv die Th1-vermittelte neutrophile Infiltration.

Lymphozytendefizienten Rag2^{-/-} Mäusen wurden PBS, OVA-spezifische Th2 bzw. Th1 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus) alleine oder in Kombination mit 2×10^6 OVA-spezifischen preTregs (Th2 preTreg bzw. Th1 preTreg) i. v. injiziert. An 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere durch OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min) allergenproviziert. Die Zellzahlen der neutrophilen (A) und eosinophilen Granulozyten (B) in der BAL wurden 24 h nach der letzten Atemwegsprovokation mittels Zytospins und Differentialzählung bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und der Balken stellt den errechneten Mittelwert dar. *p < 0,05 verglichen mit allen anderen Gruppen. n ≥ 10.

In Rag2^{-/-} Tieren, die keine Zellen erhielten (PBS), konnten nach einer inhalativen Allergenprovokation weder erhöhte Gesamtzellzahlen, noch gesteigerte Mengen an neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten detektiert werden (Abbildung 19). In 3.8 wurde gezeigt, dass der Transfer von Th1 bzw. Th2 Zellen mit anschließender Allergenexposition der Tiere zu einem erhöhten Atemwegswiderstand führte. Betrachtete man die Zellinfiltration in der BAL, fanden sich in diesen Tieren ebenfalls erhöhte Gesamtzellzahlen. Die Beobachtungen in 3.2 und 3.3 bestätigend, steigerte

der Transfer von Th2 Zellen und die folgende Allergeninhalation den Influx eosinophiler Granulozyten in die Lunge (Abbildung 19, B). Die Injektion von preTregs vor der Th2-Applikation hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erhöhten Eosinophilenzahlen. Im Gegensatz zu einer Th2-Reaktion, die mit einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL einhergeht, führt die Th1-gesteuerte Immunantwort im Allgemeinen aufgrund des vorherrschenden Zytokinprofils zu einer bevorzugten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Der Transfer der Th1 Effektorzellen und die inhalative Allergenprovokation lösten in den Rag2^{-/-} Mäusen eine verstärkte Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der BAL aus (Abbildung 19, A). Im Gegensatz zur Th2-induzierten Eosinophileninfiltration wurde in Th1-Rezipienten die Zahl der Neutrophilen durch vorherige preTreg-Gabe signifikant gehemmt. Diese Analyse zeigt, dass preTregs nicht nur in der Lage sind, die Th1-induzierte AHR, sondern auch die Entzündungsreaktion im Lungengewebe effektiv zu supprimieren.

Um weiterhin die Th1-induzierte Entzündung in der Lunge zu charakterisieren und mit dem Th2-vermittelten Krankheitsbild zu vergleichen, wurde zum Einen die peribronchiale Entzündung des Lungengewebes anhand von H&E-gefärbten Lungensektionen und zum Anderen die mukusproduzierenden Zellen in den Lungenepithelien durch PAS-Färbung untersucht.

Anhand der H&E-gefärbten Lungensektionen wurde der Grad der in der Lunge vorherrschenden Entzündung unter Verwendung eines semiquantitativen Bewertungssystems eingestuft. Sowohl der Transfer von Th1 Zellen, als auch jener von Th2 Zellen gefolgt von der inhalativen Atemwegsprovokation, induzierten eine verstärkte, peribronchiale Inflammation, erkennbar durch erhöhte Akkumulation dunkelviolett gefärbter Zellen und Verdickung der Atemwegswände in den untersuchten Lungensektionen. Die Applikation von preTregs reduzierte die Th1- bzw. Th2-induzierte Atemwegsentszündung erkennbar und in signifikantem Maße, wiedergespiegelt durch den erhöhten Inflamationsgrad (Abbildung 20, A und B). Ein Vergleich des hemmenden Effekts der preTregs auf die Th2- bzw. Th1-induzierte Zellakkumulation führte zu der Erkenntnis, dass die Th1-vermittelte Entzündung deutlich stärker supprimiert war.

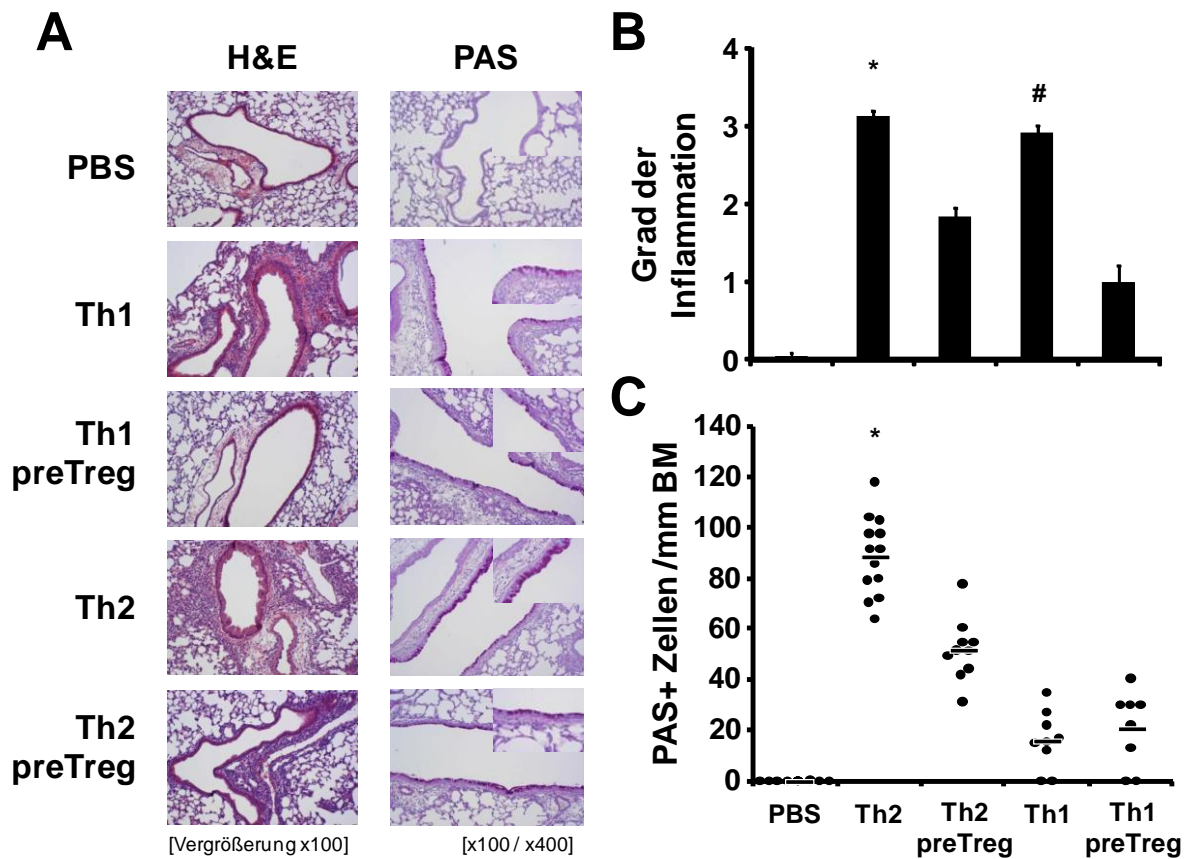


Abbildung 20: Der Transfer von preTregs reduziert effizient die Th1-vermittelte Entzündung des Lungengewebes und die Th2-induzierte Becherzellmetaplasie.

Lymphozytendefizienten $Rag2^{-/-}$ Mäusen wurden PBS, Th2 bzw. Th1 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus) alleine oder in Kombination mit 2×10^6 OVA-spezifischen preTregs (Th2 preTreg bzw. Th1 preTreg) i. v. verabreicht. Durch OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere allergenprovoziert. 24 h nach der letzten Atemwegsprovokation wurde die Entzündung in der Lunge anhand von Zellakkumulationen in peribronchialen und perivaskulären Arealen in H&E-gefärbten Lungensektionen analysiert. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die mukusproduzierenden Becherzellen mit Hilfe von PAS-gefärbten Lungenschnitten untersucht. A: Es sind repräsentative Areale der Lungensektionen mit 100- bzw. 400-fachen Vergrößerungen dargestellt. B: Anhand der H&E-gefärbten Lungensektionen wurde die vorherrschende peribronchiale und perivaskuläre Inflammation mittels eines semiquantitativen Bewertungssystems von 0 bis 4 eingestuft. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. C: Die Zahlen der mukusproduzierenden Zellen wurden pro mm Basalmembran quantifiziert. Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zahl PAS⁺ Zellen in der Lungensektion einer einzelnen Maus und die Balken stellen die errechneten Mittelwerte dar. * $p < 0,05$, verglichen mit preTreg Th2, # $p < 0,05$, verglichen mit preTreg Th1. $n \geq 7$.

Die PAS-Färbung der Lungenschnitte erfolgte zum Nachweis von mukusproduzierenden Becherzellen in den Atemwegsepithelien. Zur Analyse wurde die Anzahl mukusproduzierender PAS⁺ Becherzellen pro mm Basalmembran bestimmt (s. 2.2.8.5.2). Die Zahl PAS⁺ Zellen war in Th2-Rezipienten signifikant erhöht, verglichen mit PBS oder Th1-behandelten Tieren, bei denen keine oder nur sehr wenige Mukusproduzenten detektierbar waren (Abbildung 20, A und C). Der zusätzliche Transfer von preTregs verursachte in den Th2-transferierten Tieren eine prägnante Reduktion der PAS⁺ Zellen in den Atemwegen, hatte aber keinen erkennbaren Effekt auf die Situation in den Th1-Empfängern.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass im Gegensatz zur Th2-vermittelten Inflammation die Th1-abhängige Entzündungsreaktion durch preTregs offenbar effektiver beeinträchtigt wird.

Um die suppressive Kapazität von preTregs auf die Th1-vermittelte Entzündung zu untersuchen, wurde die Menge der in Rag2^{-/-} Mäusen transferierten, OVA-spezifischen preTregs titriert (2×10^6 , 1×10^6 bzw. $0,5 \times 10^6$). Anschließend wurden den Tieren aus BALB DO11.10 Mäusen isolierte, in vitro differenzierte Th1-Zellen appliziert. Des Weiteren erfolgte eine Atemwegsprovokation durch OVA-Inhalation an 6 aufeinanderfolgenden Tagen. Die Analysen der Atemwegsreaktivität, der Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der BAL und der peribronchialen Inflammation des Lungengewebes verdeutlichten gemeinsam, dass die preTreg-vermittelte Suppression einer Th1-induzierten Atemwegserkrankung ein dosisabhängiger Effekt ist (Abbildung 21). Wurden preTregs und Th1 Zellen zu gleichen Teilen gegeben (1:1), war die Hemmung von AHR, Neutrophilie und peribronchialer Inflammation am effektivsten. Dieser Effekt nahm ab, je weniger preTregs im Verhältnis zu Th1 Zellen transferiert wurden. Bei einem preTreg:Th1 Verhältnis von 1:4 wurde die Erkrankung von der vierfachen Menge Th1 Zellen induziert. Dennoch waren diese wenigen preTregs in der Lage, das Th1-gesteuerte Krankheitsbild zu regulieren.

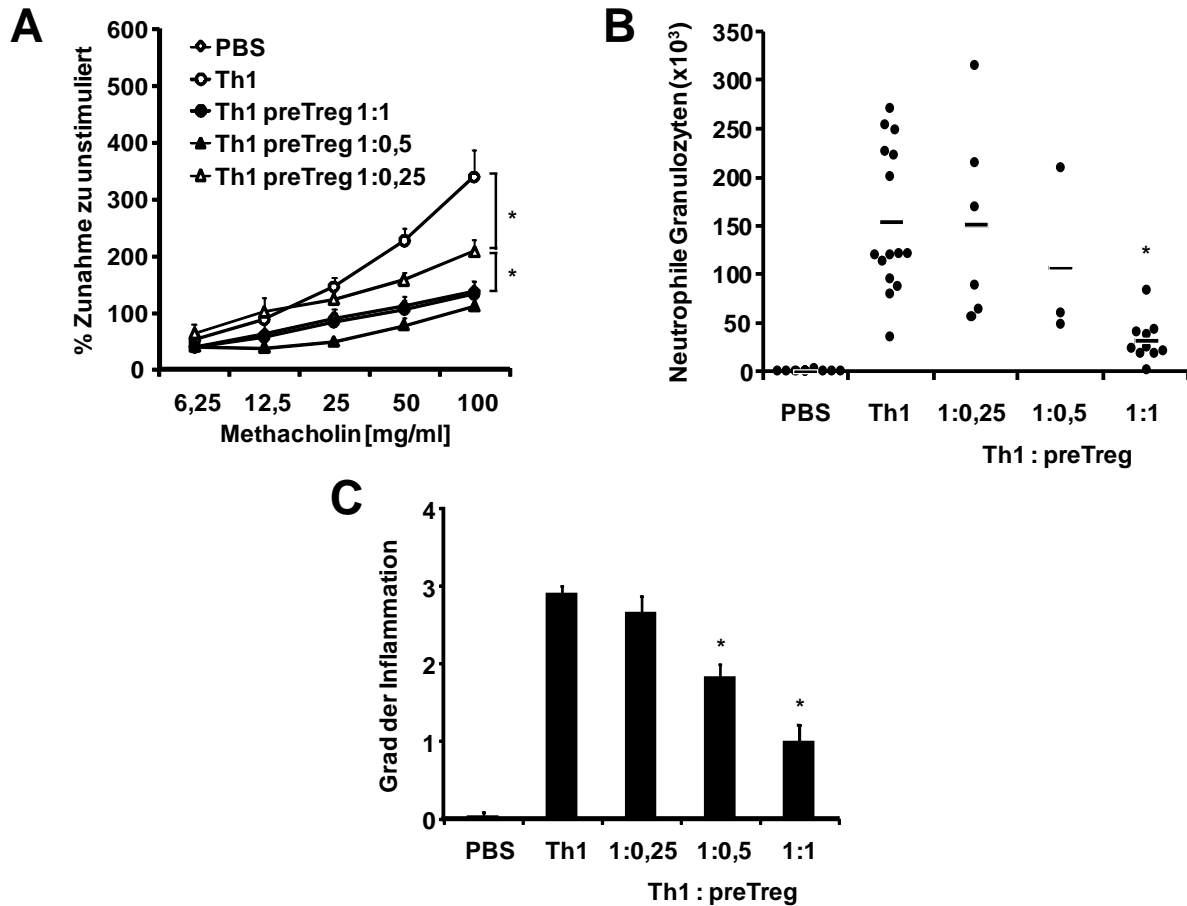


Abbildung 21: Die effektive, nTreg-basierte Suppression der Th1-induzierten AHR und Atemwegsinfiammation ist ein dosisabhängiger Effekt.

Lymphozytendefizienten Rag2^{-/-} Mäusen wurden PBS oder OVA-spezifische Th1 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus) mit oder ohne preTregs transferiert. Vor Applikation der Th1 Zellen wurde die Zellzahl der transferierten preTregs titriert (2×10^6 , 1×10^6 bzw. $0,5 \times 10^6$ Zellen/Maus). Durch OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere allergenprovoziert. 24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden Atemwegsreaktivität (A) anhand von Lungenfunktionsmessungen und die neutrophile Infiltration in der BAL (B) mittels Zytospins und Differentialzellzählung ermittelt. C: Die vorherrschende peribronchiale und perivaskuläre Inflammation in der Lunge wurde anhand von H&E-gefärbten Gewebsektionen mittels eines semiquantitativen Bewertungssystems von 0 bis 4 eingestuft. A, C: Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. B: Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und die Balken stellen die errechneten Mittelwerte dar. A: *p < 0,05, B und C: *p < 0,05 verglichen mit Th1. n \geq 4 aus zwei repräsentativen Experimenten.

3.10 preTregs supprimieren die Akkumulation und Proliferation von Th1 und Th2 Zellen in der Lunge in vivo.

Im Hinblick auf die Effekte auf AHR und Atemwegsentzündung sollte in folgenden Experimenten der Einfluss der preTregs auf die Rekrutierung OVA-spezifischer CD4⁺ T-Effektorzellen in die Lunge und deren Zellproliferation in vivo analysiert werden. Für dieses Vorhaben wurden Rag2^{-/-} Tiere entsprechend des Protokolls in 2.2.2.3 rekonstituiert und behandelt. Um bewerten zu können, ob preTregs die Einwanderung OVA-spezifischer Th1 bzw. Th2 Zellen ins Lungengewebe hemmen, wurden die Effektorzellen in der Lunge zunächst durchflusszytometrisch mittels ihrer CD90.2 Expression von den CD90.1⁺ preTregs unterschieden. Durch Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Antikörpers gegen den T-Zellrezeptor, der von murinen DO11.10 T-Zellen exprimiert wird (KJ1-26), war die Erkennung von OVA-spezifischen Lymphozyten möglich. Außerdem wurden fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet, um die intrazellulären Zytokine IL-4 und IFN- γ zu detektieren. Anhand der Expressionen von CD90.2, CD4, KJ1-26 und IL-4 oder IFN- γ konnten schließlich in der Lunge die OVA-spezifischen Th2 bzw. Th1 Zellen durchflusszytometrisch identifiziert werden.

Tatsächlich wurden in den Lungen der Th1/preTreg-transferierten und allergenprovozierten Rag2^{-/-} Mäuse deutlich weniger CD4⁺IFN γ ⁺ bzw. KJ1-26⁺IFN γ ⁺ CD90.2⁺ Zellen detektiert als in Mäusen, denen nur Th1 Zellen übertragen wurden (Abbildung 22). In ähnlicher Weise befanden sich in Th2/preTreg-transferierten und atemwegsprovozierten Mäusen verglichen mit den Th2-Rezipienten deutlich reduzierte Mengen an CD4⁺IL-4⁺ bzw. KJ1-26⁺IL-4⁺ Lymphozyten im Lungengewebe. Im Vergleich der preTreg-vermittelten Suppression der Th-Rekrutierung in die Lunge konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung von Th1 und Th2 Zellen in gleichem Ausmaß durch eine preTreg-Gabe reduziert wurden. In 3.8 und 3.9 wurde gezeigt, dass Th1-vermittelte AHR und Atemwegsentzündung deutlich effektiver durch preTregs supprimiert werden im Vergleich zu Th2-induzierter allergischer Atemwegserkrankung. Da die Infiltration der allergenspezifischen Th1 und Th2-Effektorzellen in die Lunge durch preTregs in vergleichbarem Maße gehemmt wird, muss die unterschiedliche Suppressionsempfindlichkeit der Th Zellen andere Ursachen haben.

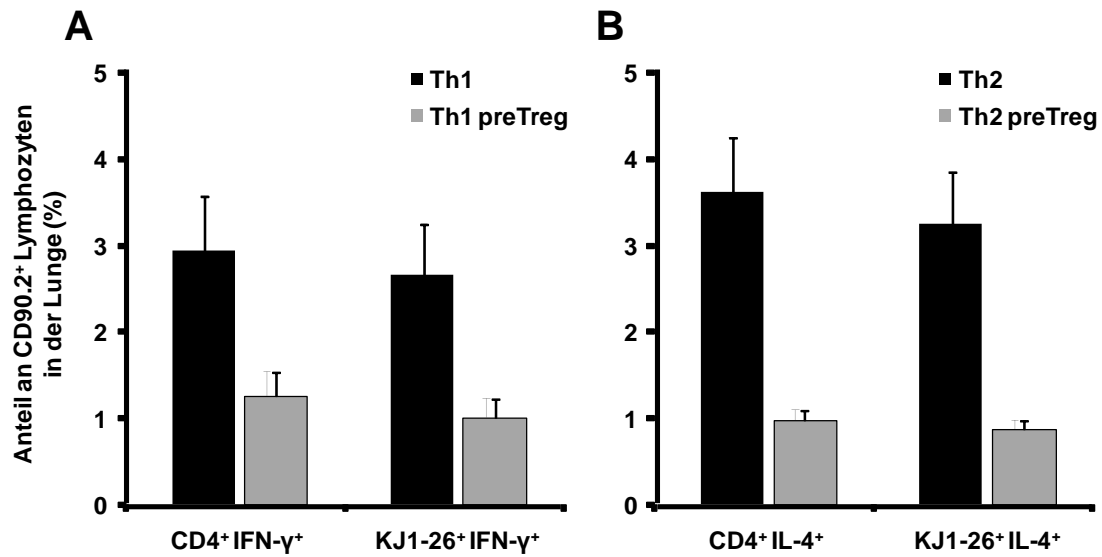


Abbildung 22: preTregs supprimieren die Einwanderung OVA-spezifischer Th1 und Th2 Zellen in die Lunge in vergleichbarem Maße.

Rag2^{-/-} Mäusen wurden OVA-spezifische CD90.2⁺ Th2 bzw. Th1 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus) mit oder ohne OVA-spezifische CD90.1⁺ preTregs (2×10^6 Zellen/Maus) i. v. transferiert. Durch OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Tiere allergenprovoziert. 24 h nach der vierten Allergenprovokation wurden die Lungen der Mäuse präpariert und die Lungenzellen isoliert. Für die durchflusszytometrische Identifizierung der transferierten, OVA-spezifischen CD90.2⁺ Th1 und Th2 Zellen wurden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen anti-CD90.2, anti-CD4, anti-KJ1-26, anti-IL-4 und anti-IFN- γ markiert. Die ermittelten Frequenzen der CD90.2⁺ CD4⁺IFN- γ ⁺ bzw. KJ1-26⁺IFN- γ ⁺ in Th1-transferierten Tieren (A) und CD4⁺IL-4⁺ bzw. KJ1-26⁺IL-4⁺ Zellen in Th2-transferierten Tieren (B) sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $n \geq 4$.

Um zu analysieren, wie sich die preTreg-vermittelte Suppression auf die lokale Proliferation von Th1 bzw. Th2 Zellen in vivo auswirkt, wurden die trachealen Lymphknoten (tLN) untersucht. Dafür wurden die Effektorzellen vor dem adoptiven Transfer in Rag2^{-/-} Tiere mit CFSE markiert. Anhand dieser Markierung konnten die transferierten Th1 bzw. Th2 Zellen ex vivo im tLN durchflusszytometrisch identifiziert werden. Da sich die Fluoreszenzintensität des CFSE bei jeder Zellteilung halbiert, ist die Proliferationsintensität der Effektorzellen im Durchflusszytometer darstellbar. Für die Auswertung wurden die Anteile der Zellen betrachtet, die im regionalen

Lymphknoten mehr als 4 Teilungen durchlaufen haben. Anhand dieser Daten konnte dann die prozentuale Inhibition der Th-Zellproliferation berechnet werden.

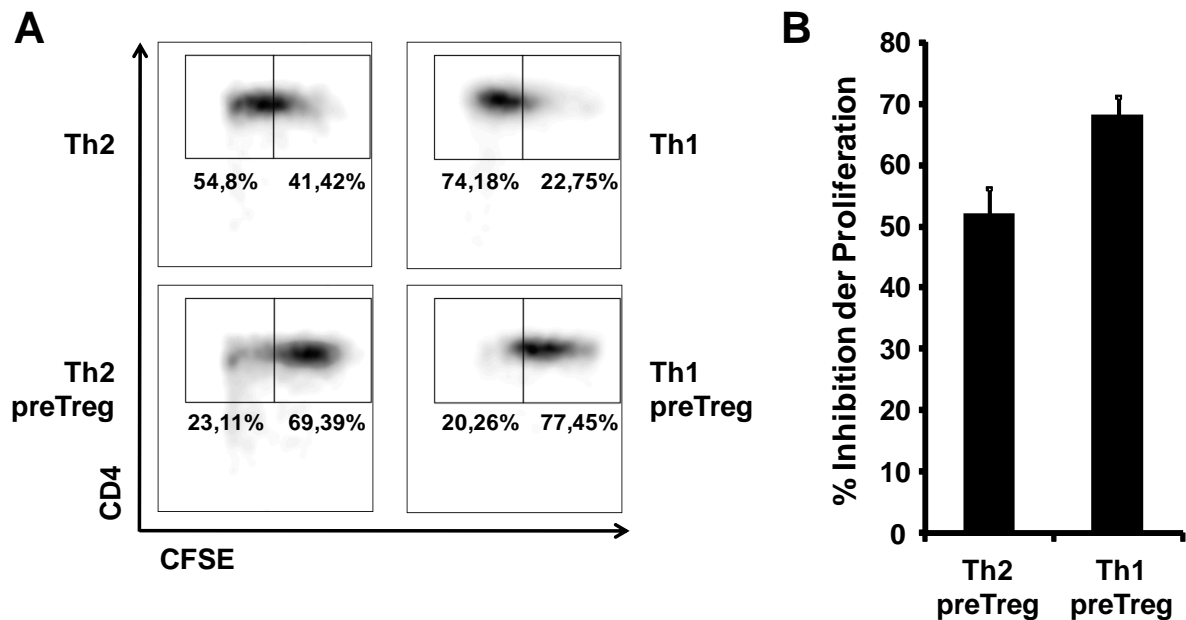


Abbildung 23: preTregs supprimieren in vivo effektiver die Zellproliferation der Th1 Zellen verglichen zu jener der Th2 Zellen.

2×10^6 CFSE-markierte OVA-spezifische CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen und 2×10^6 unmarkierte OVA-spezifische CD90.1⁺ preTregs wurden in Rag2^{-/-} Mäuse i. v. injiziert und die Tiere durch OVA Inhalation (1% in PBS, 20 min) an 4 aufeinanderfolgenden Tagen allergenprovokiert. 1 h nach der vierten Allergenprovokation wurden die trachealen Lymphknoten der Mäuse präpariert und die Zellen isoliert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden die CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellpopulationen ausgemacht und mit Hilfe der CFSE-Expression ihre Zellproliferation untersucht. Dabei wurde die Verteilung der Zellen gemessen und die relativen Anteile der Th Zellen mit mehr (niedrigere CFSE-Fluoreszenz) bzw. weniger (höhere CFSE-Fluoreszenz) als 4 Teilungen wurden bestimmt. A: Repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse zweier unabhängiger Experimente. B: Aus den durchflusszytometrischen Daten wurde die prozentuale Inhibition der Proliferation von Th1 bzw. Th2 Zellen in Anwesenheit von preTregs (n > 4) berechnet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM.

Wie in Abbildung 23 erkennbar ist, führte der adoptive Transfer von preTregs in vivo zu einer Hemmung der Th1 Zellproliferation im tLN von bis zu 68%. Verglichen dazu supprimierten preTregs die Th2-Proliferation lediglich um bis zu 52%. Bisher wurde gezeigt, dass die Th1-vermittelte AHR und Atemwegsentzündung deutlich effektiver durch preTregs supprimiert wurde als die Th2-induzierte allergische Atemwegserkrankung. Außerdem stellte sich heraus, dass dabei die Rekrutierung der allergenspezifischen Th1 und Th2 Zellen in die Lunge in vergleichbarem Maße gehemmt wurde. Anhand der zuletzt gezeigten Daten ist erkennbar, dass die In vivo Proliferation der Th1 Zellen verglichen mit Th2 Zellen durch preTregs nur geringfügig stärker inhibiert wird. Damit sind die beobachteten Unterschiede in der Suppressionsempfindlichkeit der Th1 und Th2 Zellen noch nicht vollständig geklärt.

3.11 Die effektivere nTreg-vermittelte Suppression der Th1-induzierten Atemwegserkrankung kann nicht auf eine höhere lokale nTreg-Präsenz oder erhöhte cAMP-Spiegel in supprimierten Th1 Zellen zurückgeführt werden.

Bisherige Experimente haben gezeigt, dass Tregs einen wesentlich stärkeren suppressiven Effekt auf die Th1-vermittelte Atemwegserkrankung, verglichen zum Th2-basierten Krankheitsbild ausüben. In weiteren Untersuchungen sollten nun die Grundlagen dieser unterschiedlichen Wirkung ergründet werden. Eine mögliche Ursache für die stärkere Suppressivität auf die Th1-induzierte Erkrankung könnte eine erhöhte Präsenz von nTregs in der Lunge oder dem regionalen Lymphknoten sein. Aus diesem Grund wurden lymphozytendefiziente Rag2^{-/-} Mäuse mit PBS, Th2 oder Th1 Zellen mit oder ohne vorherigen preTreg-Transfer versehen. Die Atemwege der Tiere wurden an den folgenden 6 Tagen dem Allergen OVA ausgesetzt. Anschließend wurden die Frequenzen von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Lymphozyten in Lunge und tLN mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 24, A).

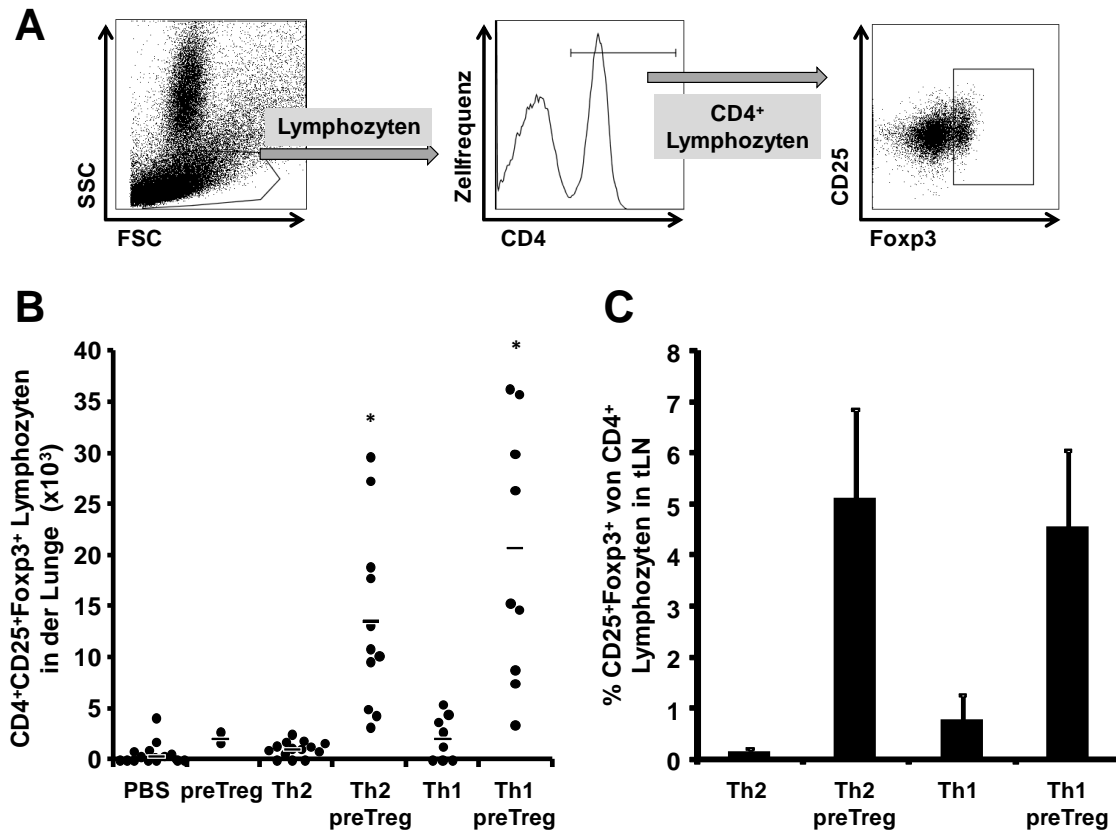


Abbildung 24: In Lunge und tLN waren in Th1/preTreg- und Th2/preTreg-Empfängern vergleichbare Mengen an nTregs detektierbar.

Nachdem den Rag2^{-/-} Mäusen PBS, 2×10^6 OVA-spezifische Th1 (Th1) bzw. Th2 Zellen (Th2) alleine oder mit 2×10^6 OVA-spezifischen preTregs (Th1 preTreg bzw. Th2 preTreg) oder preTregs alleine (preTreg) i. v. transferiert wurden, folgte an den darauffolgenden 6 Tagen eine Allergenprovokation (1% OVA in PBS, 20 min) der Atemwege. 24 h nach der letzten OVA Nebulisierung wurden Lungen und tracheale Lymphknoten (tLN) entnommen und die Zellen isoliert. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Zellen mit anti-CD4-PECy7, anti-CD25-PE und anti-Foxp3-APC angefärbt. In A ist die Gating-Strategie exemplarisch anhand einer Lungenzellpräparation dargestellt, wie sie für die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der Lungen und tLN angewendet wurde. B: Die Gesamtzellzahlen der einzelnen Lungen wurden bestimmt und gemeinsam mit den durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen für die Berechnung der absoluten nTreg-Zahl in der Lunge verwendet. Jeder Punkt repräsentiert die ermittelte Zellzahl einer einzelnen Maus und die Balken stellen die errechneten Mittelwerte dar. *p < 0,05 verglichen mit Th2 und Th1. C: Für eine durchflusszytometrische Bestimmung der nTreg-Anteile in den lokalen tLN wurden die Zellen mit anti-CD4-PECy7, anti-CD25-PE und anti-FoxP3-APC markiert und anhand der in A dargestellten durchflusszytometrischen Analyse evaluiert. Es sind die Mittelwerte ± SEM der Frequenzen der CD25⁺Foxp3⁺ Zellen aller CD4⁺ Lymphozyten dargestellt. n ≥ 10.

Wie zu erwarten, konnten in den Lungen von Tieren ohne preTreg-Transfer (PBS, Th1 und Th2) keine CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs identifiziert werden (Abbildung 24, B). Haben Rag2^{-/-} Mäuse ausschließlich preTregs verabreicht bekommen, konnten in den Lungen ebenfalls keine CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs detektiert werden, da trotz Atemwegsprovokation keine Effektorzellen im Organismus vorhanden waren, die eine Entzündungsreaktion auslösen und damit eine Inflammationsregulation hervorrufen konnten. Induzierte man allerdings eine Th1 oder Th2-gerichtete allergische Atemwegserkrankung und injizierte zusätzlich preTregs, konnten diese als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen in der Lunge nachgewiesen werden. Interessant dabei war, dass in Lungen von Th1/preTreg- und Th2/preTreg-transferierten Mäusen vergleichbare nTreg-Frequenzen auffindbar waren. Das gleiche Bild zeigte die Analyse der nTreg-Populationsanteile im tLN (Abbildung 24, C). Die Frequenzen der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs zeigten in Th1/preTreg- und Th2/preTreg-Rezipienten keine signifikanten Differenzen. Folglich kann eine erhöhte lokale nTreg-Präsenz in Lunge und tLN als Ursache für die effektivere Suppression einer Th1-gesteuerten Atemwegserkrankung ausgeschlossen werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die nTreg-vermittelte Suppression von T-Effektorzellantworten von einem cAMP-Transfer von der nTreg Zelle zur T-Effektorzelle abhängig ist. Eine unterschiedliche Aufnahme von nTreg-generiertem cAMP durch Th1 bzw. Th2 Zellen könnte daher eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Wirkung der Suppressoren auf die Th1- bzw. Th2-induzierten Atemwegserkrankungen sein. Um dem nachzugehen, wurden CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen und CD90.1⁺ preTregs in Rag2^{-/-} Mäuse transferiert. Nach einer viermaligen Allergenexposition mit OVA Aerosol wurden die Lungen der Tiere präpariert und die Lungenzellen isoliert. Durch MACS-basierte Zellseparation der CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen und Depletion der CD90.1⁺ T-Zellen konnten die CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen aus den Lungen der Tiere gezielt extrahiert werden. Durch diese Vorgehensweise wurde ex vivo eine Reinheit der CD90.2⁺ Th Zellen von über 98% erreicht (Daten nicht gezeigt). Mittels cAMP-ELISA konnten schließlich die intrazellulären Konzentrationen des sekundären Botenstoffs bestimmt werden.

In nicht-supprimierten Th1 und Th2 Zellen aus der Lunge konnten nur geringe Mengen an intrazellulärem cAMP detektiert werden. In Abbildung 25 ist zu sehen,

dass der zytosolische cAMP-Spiegel in den Th Zellpopulationen der Lunge signifikant erhöht ist, sobald im Vorfeld preTregs in die Maus kotransferiert wurden. Dennoch konnten zwischen Th1 und Th2 Zellen keine signifikanten Differenzen der cAMP-Konzentrationen detektiert werden. Somit kann man die distinkten nTreg-vermittelten Effekte nicht auf eine unterschiedliche cAMP-Aufnahme der Th1 und Th2 Zellen zurückführen.

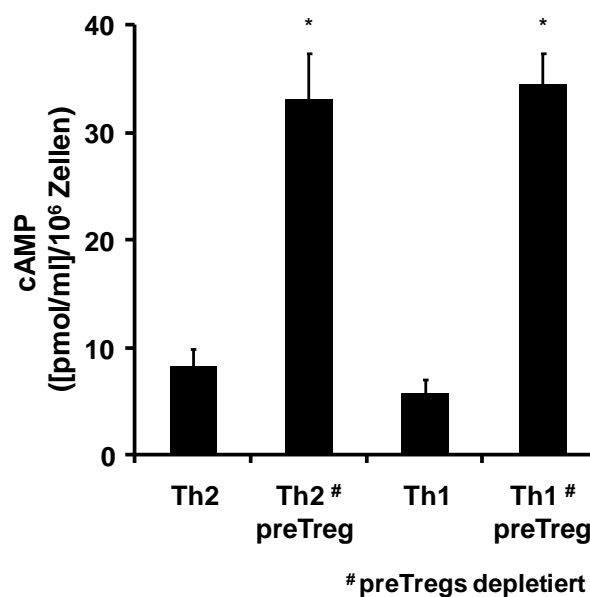


Abbildung 25: In der Lunge werden von preTregs vergleichbare Mengen an cAMP auf Th1 und Th2 Zellen übertragen.

Rag2^{-/-} Mäusen wurden OVA-spezifische CD90.2⁺ Th2 bzw. Th1 Zellen (2×10^6 Zellen/Maus) mit oder ohne OVA-spezifische CD90.1⁺ preTregs (2×10^6 Zellen/Maus) i. v. transferiert. Die Th1 und Th2 Zellen wurden aus BALB DO11.10 Mäusen isoliert, während die preTregs aus BALB DO11.10 Thy1.1 Mäusen gewonnen wurden. Die Provokation der Atemwege erfolgte an 4 aufeinanderfolgenden Tagen durch Allergeninhalation (1% OVA in PBS, 20 min). 2 h nach der vierten Atemwegsprovokation wurden die Lungenzellen isoliert. Die CD90.1⁺ preTregs wurden mittels MACS®-basierter Separation aus der Zellsuspension entfernt und die CD90.2⁺ Th Zellen ex vivo angereinigt. Die Reinheit der extrahierten CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen betrug >98% (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde der zytosolische cAMP-Gehalt der Th1 und Th2 Zellen anhand eines cAMP-spezifischen ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *p < 0,05 verglichen mit Th1 und Th2. n = 7.

3.12 Verglichen zu Th2 Zellen demonstrieren Th1 Zellen eine höhere Empfindlichkeit auf die nTreg-vermittelte Suppression in vitro.

Aus den In vivo-Studien in 3.11 war erkennbar, dass in den Lungen nTregs vergleichbare Mengen an cAMP auf Th1 und Th2 Zellen übertragen. Im weiteren Verlauf sollte ermittelt werden, ob dies auch in vitro bestätigt werden kann. Dafür wurden aus Milzen isolierte CD90.1⁺ preTregs mit CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen kokultiviert. Anschließend wurden die supprimierten Th Zellpopulationen anhand ihrer CD90.2 Expression isoliert und ihr intrazellulärer cAMP-Gehalt, ihre Proliferationsfähigkeit und ihre Zytokinsekretion untersucht.

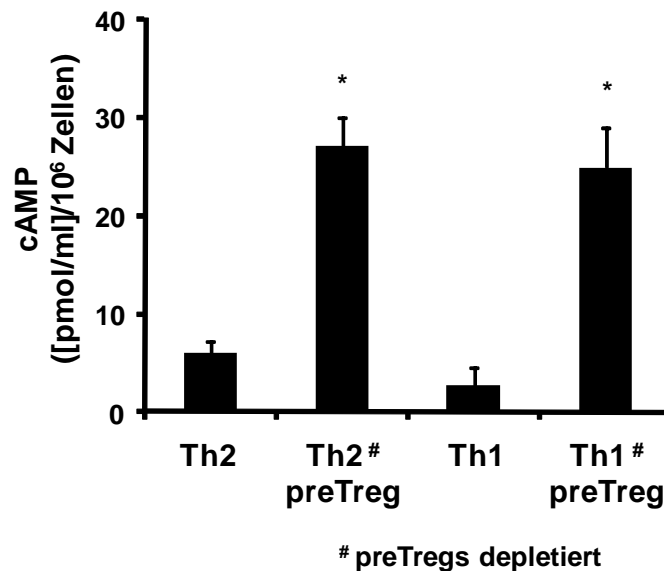


Abbildung 26: Die höhere Sensibilität der Th1 Zellen auf die nTreg-vermittelte Suppression ist nicht auf einen verstärkten cAMP-Transfer in die supprimierte Zelle zurückzuführen.

OVA-spezifische CD90.2⁺ Th1 Zellen (1×10^6 Zellen /ml) bzw. Th2 Zellen wurden mit oder ohne OVA-spezifische CD90.1⁺ preTregs (1×10^6 Zellen /ml) stimuliert. Die Th1 und Th2 Zellen wurden aus BALB DO11.10 Mäusen isoliert, während BALB DO11.10 Thy1.1 Mäuse die Donoren der preTregs waren. 4 h nach der Kokultur wurden die CD90.1⁺ preTregs mittels MACS®-Separation depletiert, sodass nur noch CD90.2⁺ Th1 bzw. Th2 Zellen vorlagen. Der zytosolische cAMP-Gehalt der Th1 und Th2 Zellen wurde schließlich unter Verwendung eines cAMP-spezifischen ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. *p < 0,05 verglichen mit Th1 und Th2. n \geq 4.

Die In vivo-Erkenntnisse bestätigend konnten auch in vitro in Th1 und Th2 Zellen signifikant erhöhte cAMP-Konzentrationen ermittelt werden, wenn sie mit preTregs kokultiviert wurden (Abbildung 26). Ebenfalls analog zu den In vivo-Studien wurden in den supprimierten Th1 und Th2 Zellen vergleichbare Konzentrationen an cAMP beobachtet. Demnach übertragen preTregs nicht nur in vivo sondern auch in vitro vergleichbare Mengen an cAMP auf Th1 und Th2 Zellen.

Aus einer Th/preTreg-Kokultur in unterschiedlichen Verhältnissen konnten auch Erkenntnisse über die Suppression der Zellteilungsfähigkeit der Th Zellen gewonnen werden. Im Gegensatz zum cAMP-Gehalt war die Proliferation von Th1 und Th2 Zellen durch die Anwesenheit von preTregs in der Kultur unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 27).

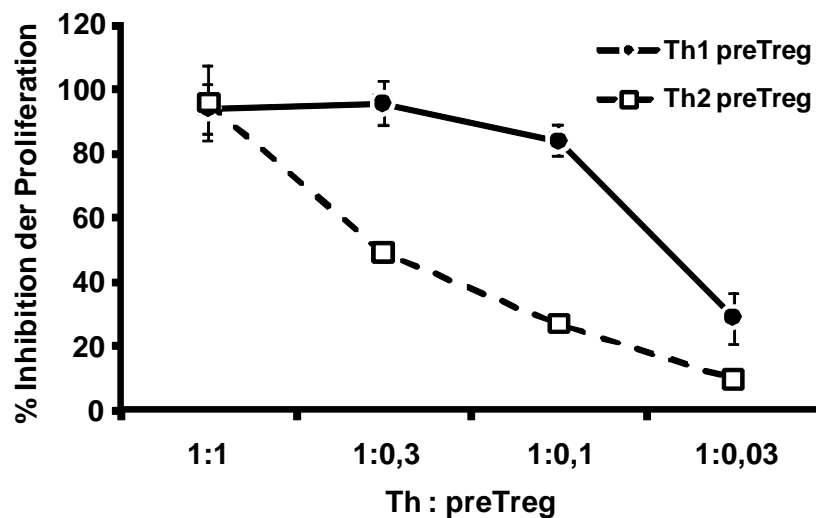


Abbildung 27: Die Proliferation der Th1 Zellen wird durch die nTreg-vermittelte Suppression stärker beeinflusst als die Th2 Zellproliferation.

Titrierte Zahlen an aus der Milz von BALB DO11.10 Mäusen isolierten und in vitro expandierten OVA-spezifischen preTregs wurden mit Th1 oder Th2 Zellen (2×10^5 Zellen/ml) stimuliert. [^3H]TdR wurde nach 96-stündiger Kokultur hinzugefügt und nach weiteren 18 h die Thymidinaufnahme mittels β -Szintillationszählung gemessen. Die prozentuale Inhibition wurde berechnet. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten dargestellt.

Die Inhibition der Th2-Proliferation verlief linear von 95% (Th2 Zellen und preTregs zu gleichen Teilen kultiviert) bis hin zu 10% bei einem Th2:preTreg-Verhältnis 1:0,03. Im Gegensatz dazu verhielt sich die Inhibition der Th1-Proliferation bei etwa 80% weitgehend stabil und senkte sich nicht bis zu einem Th1:preTreg-Verhältnis von 1:0,03. Folglich zeigten selbst geringe Mengen preTregs eine hohe Kapazität, die Zellteilung der Th1 Zellen zu supprimieren, während sie die Th2-Proliferation nur noch geringfügig hemmten.

Einen ähnlichen Einfluss der preTregs konnte man in der Analyse der Th-Zytokinproduktion beobachten. Nach der Kokultur wurden die Konzentrationen der Effektorzytokine in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Aus der Kokultur der Th2 Zellen mit preTregs ermittelte man den Gehalt an IL-4, während IFN- γ in den Kulturüberständen der Th1/preTreg-Kultur bestimmt wurde.

In Abbildung 28 A wird dargestellt, dass sowohl die IL-4 Produktion der Th2 Zellen, als auch die IFN- γ Produktion der Th1 Zellen in ähnlichem Maße inhibiert wurden, kultivierte man sie mit der gleichen Menge an preTregs. Verringerte man die Zahl der preTregs in der Kultur, verringerte sich auch der inhibitorische Einfluss auf die Zytokinproduktion, allerdings waren dabei IL-4 und IFN- γ Sekretion unterschiedlich betroffen. Während die IL-4 Produktion bei einem Verhältnis von 1:0,03 (Th2:preTreg) nicht mehr gehemmt erschien, konnte die gleiche preTreg-Zahl in der Kultur die IFN- γ Produktion durch Th1 Zellen noch maßgebend beeinträchtigen. Vergleichbare Ergebnisse ergab die Analyse der IL-2 Produktion, die in Th1 Zellen auch durch sehr geringe preTreg-Mengen noch supprimierbar war (Abbildung 28, B). Diese Daten verdeutlichen, dass Zytokinproduktion und Proliferation der Th1 Zellen durch die preTreg-vermittelte Suppression stärker betroffen sind als die Effektorfunktionen der Th2 Zellen. Anhand dieser differenziellen Supprimierbarkeit von Th1 und Th2 Zellfunktionen unterscheidet sich die Effektivität der preTreg-basierten Regulation.

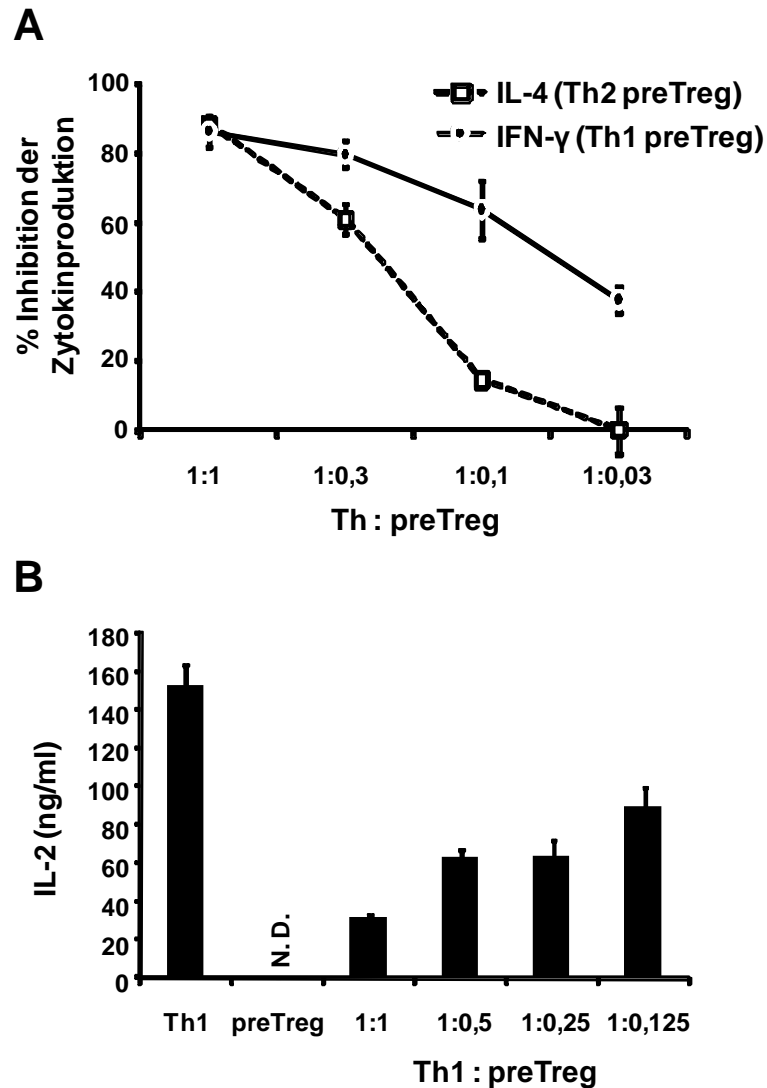


Abbildung 28: Im Vergleich zur Th2-gesteuerten Zytokinsekretion wird die Th1-basierte Zytokinproduktion von preTregs effektiver supprimiert.

A: OVA-spezifische Th1 Zellen (2×10^5 Zellen /ml) und Th2 Zellen, isoliert aus BALB DO11.10 Mäusen wurden ohne oder mit titrierten Mengen in vitro expandierter, OVA-spezifischen preTregs restimuliert. Nach 24 h Kultur wurde die IL-4 Produktion der Th2 Zellen und die IFN- γ Produktion der Th1 Zellen in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. B: OVA-spezifische Th1 Zellen (2×10^5 Zellen /ml) wurden ohne oder mit titrierten Mengen in vitro expandierter preTregs restimuliert. Nach 24 h Kultur wurde die IL-2 Produktion der Th1 Zellen in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten dargestellt. N. D. = nicht detektierbar.

4 Diskussion

Das Immunsystem der Vertebraten erfüllt die wichtige Aufgabe, den Organismus gegen potenzielle Krankheitserreger und Schädlinge zu verteidigen. Gleichzeitig ist es in der Lage, solche Pathogene einerseits von körpereigenen Strukturen und andererseits von harmlosen Partikeln aus der Umwelt zu unterscheiden und Immunreaktionen zu regulieren. Dieser *immunologischen Toleranz* unterliegen zahlreiche komplexe, zelluläre Mechanismen, in denen Tregs eine zentrale Rolle spielen. Dysfunktionen in Toleranzmechanismen führen zu fehlgeleiteten und unverhältnismäßigen Immunreaktionen gegen harmlose Substanzen aus der Umwelt (Allergien) oder gegen körpereigene Bestandteile (Autoimmunität) und können schwere, gesundheitsgefährdende Folgen haben. An Asthma bronchiale leiden weltweit 300 Millionen Menschen und innerhalb der nächsten 20 Jahre wird ein Anstieg um weitere 100 Millionen Patienten erwartet (105). Die aktuellen Behandlungsstrategien umfassen die inhalative Verabreichung von entzündungshemmenden Corticosteroiden und β_2 -Agonisten. Die Krankheitssymptome von durchschnittlich 80 – 90% der Asthmapatienten können dadurch gelindert werden. Trotz der hohen Effizienz der klassischen Steroidtherapie besteht der Nachteil, dass die charakteristischen Asthmasymptome wie AHR und Atemwegsentzündung nach Unterbrechung der Behandlung wieder aufkommen. Der restliche Patientenanteil ist trotz Medikation nicht adäquat kontrolliert und leidet an einem steroidresistenten Asthma oder schweren Asthma (91). Daher sind weitere Kenntnisse für die Entwicklung alternativer Therapieansätze gegen alle Asthmavarianten notwendig sind. In diesem Zusammenhang werden in der aktuellen immunologischen Forschung unter anderem Tregs in Betracht gezogen. Vor allem das nähere Verständnis von Funktion und Wirkungsmechanismen der natürlich vorkommenden Tregs (nTregs) kann die Möglichkeit einer nTreg-basierten Asthmatherapie näherbringen.

4.1 Die höhere suppressive Kapazität der nTregs nach Voraktivierung ist auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus zurückzuführen.

Frisch isolierte $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nTregs unterscheiden sich von in vitro voraktivierten nTregs (preTregs) in ihrer Kapazität $CD4^+$ T-Effektorzellen zu supprimieren. Analog zu einer veröffentlichten Studie konnte hier gezeigt werden, dass preTregs die IL-4 Produktion der asthma- und allergierelevanten Th2 Zellen effektiv hemmte, während die Suppressoren unmittelbar nach der Isolation nur minimale, inhibierende Effekte auslösten (103). Begründet wurde die bis zu 6-fach gesteigerte Inhibitionsfähigkeit damit, dass voraktivierte preTregs mit einer schnelleren Kinetik die T-Effektorzellen hemmen. In den Ergebnissen einer anderen Studie wurde ein weiterer möglicher Mechanismus identifiziert. Im Zytosol von preTregs konnten verglichen mit frisch isolierten nTregs die doppelte Menge an zytosolischem cAMP nachgewiesen werden (43). Und dass cAMP bzw. Adenosin in nTreg-basierten Suppressionsmechanismen eine wichtige Rolle spielt, konnte in mehreren Studien demonstriert werden (43,106-108). Naganuma et al. brachten beispielsweise im Mausmodell einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (Colitis ulcerosa) T-zellassozierte Adenosinrezeptoren mit der T-zellvermittelten Suppression der Entzündung in Zusammenhang (108). nTregs interagieren mit T-Effektorzellen, indem aus Proteinkomplexen bestehende Zell-Zell-Kanäle, so genannte Gap junctions, gebildet werden. Durch diesen Zellkontakt findet ein interzellulärer Proteintransfer statt. nTregs enthalten hohe Konzentrationen des sekundären Botenstoffs cAMP. Dieses cAMP gelangt über die Gap junctions in die zu suppressierende T-Effektorzelle (43) und bewirkt die Inhibition von Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation (46). Bopp et al. zeigten anhand von In vitro-Analysen, dass die Suppressivität der nTregs auf T-Effektorzellen aufgehoben war, sobald cAMP-Agonisten oder Gap junction-Inhibitoren in der Kultur eingesetzt wurden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden nach einer Kokultur von preTregs mit Th-Zellen in supprimierten Th1 und Th2 Zellen erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel beobachtet und der Anstieg des cAMP-Spiegels führte in der Effektorzelle zur Inhibition der IL-2 Produktion und zur Hemmung der Zytokinsekretion und Zellproliferation. Sowohl die IL-4 Produktion der Th2 Zellen, als auch die IFN- γ Sekretion der Th1 Zellen waren durch preTregs deutlich beeinträchtigt. Bei erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen, wie sie in voraktivierten preTregs verglichen

zu frisch isolierten nTregs aufzufinden sind, können gesteigerte Mengen auf die Effektorzelle übertragen werden (43). Aus diesem Grund nahmen in den Kokultorexperimenten die frisch isolierten nTregs nur eingeschränkten, inhibitorischen Einfluss auf die Th2-vermittelte IL-4 Sekretion, während preTregs sie effektiv und dosisabhängig supprimierten.

4.2 Die Inhibition des cAMP-Abbaus unterstützt die nTreg-basierte Suppression in vitro und im Modell der allergischen Atemwegserkrankung.

Die Funktion, die erhöhten cAMP-Mengen in der Zelle wieder abzubauen, wird in T-Zellen vor allem von der PDE4 erfüllt. Dieses hydrolytisch wirkende Enzym ist cAMP-spezifisch und wandelt sein Substrat in 5'-AMP um. Werden T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor stimuliert und erfolgt parallel eine starke Kostimulation über CD28, werden PDE4 Moleküle in der Zelle vorzugsweise zu den Lipid Rafts an der Zellmembran rekrutiert, wo sich die cAMP-Moleküle befinden (66). Damit wird der Abbau des intrazellulären cAMP erhöht, was der Suppression entgegenwirkt. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass durch die Inhibition von PDE4 sowohl in der supprimierten, als auch in der regulativen Zelle der cAMP-Abbau gestört und damit die nTreg-vermittelte Suppression unterstützt werden kann. In dieser Arbeit wurden mit Rolipram und Piclamilast zwei cAMP-spezifische PDE4-Inhibitoren eingesetzt und beide verstärkten in vitro den suppressiven Effekt von preTregs auf Th2-Zellen. In der Tat konnte durch die zusätzliche Gabe von PDE4-Inhibitoren die Proliferation und Zytokinproduktion von Th2 Zellen effektiver supprimiert werden. Nun stellte sich die Frage, ob dabei die PDE4-Funktionen in den preTregs oder in den Effektorzellen gehemmt wurden. Durch gezielte Separation der Th2-Zellen aus der nTreg/Th2-Kokultur konnte der zytosolische cAMP-Spiegel in den Effektorzellen überprüft werden. Nach Kokultur mit preTregs wiesen die supprimierten Th2 Zellen gesteigerte Mengen cAMP auf, während unsupprimierte, allein kultivierte Th2 Zellen sehr niedrige cAMP-Konzentrationen enthielten. Wurden die Th2 Zellen nicht nur mit preTregs, sondern auch mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram inkubiert, war der zytosolische cAMP-Spiegel noch weiter erhöht. Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PDE4 die nTreg-vermittelte Suppression verstärkt und dass dies

auf einen reduzierten cAMP-Abbau in den Th2 Zellen zurückzuführen ist. In Betrachtung der Tatsache, dass nTregs in der Lage sind, mit Unterstützung von PDE4-Inhibitoren die Effektorfunktionen von Th2 Zellen gezielt zu supprimieren, erscheint die Hemmung der PDE4-Aktivität als eine mögliche Behandlung gegen Th2-gesteuerten Allergien und Autoimmunerkrankungen. Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel und einem immunsuppressiven Milieu konnte schon in diversen Zelltypen nachgewiesen werden. DCs beispielsweise sind in der Lage, über einen IL-10-abhängigen Mechanismus Tregs zu induzieren. Diese toleranzfördernde Fähigkeit ist allerdings eng verknüpft mit dem intrazellulären cAMP-Gehalt der DCs (69). Auch wurde bereits in einem Mausmodell einer allergischen Atemwegserkrankung gezeigt, dass PDE4-Inhibitoren zur Reduktion von Atemwegsentzündung und AHR beitragen (70). In dieser Studie wurde das Modell einer sekundären Atemwegsprovokation gewählt, in dem sensibilisierte Wildtypmäuse zunächst primär allergenprovoziert wurden. Nach Abklingen der dadurch induzierten Atemwegsentzündung erfolgte eine zweite Atemwegsprovokation. Die Versuchstiere verfügten über ein intaktes Immunsystem und der PDE4-Inhibitor wurde systemisch verabreicht. Aufgrund dieser Gegebenheiten konnten potenziell alle Effektorzelltypen, die an der Inflammation beteiligt waren, von der PDE4-Inhibitorbehandlung betroffen sein. Eine differenzierte Aussage über den Einfluss des PDE4-Inhibitors auf die nTreg-vermittelte Suppression war deshalb nicht möglich. Um den Zusammenhang zwischen PDE4-Inhibition und nTreg-basierter Asthmaregulation eindeutig in vivo darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Protokoll verwendet, in dem allergenspezifische Th-Zellen durch adoptiven Transfer in lymphozytendefiziente Mäuse gebracht und anschließend inhalative Allergenprovokationen durchgeführt wurden (10). Die Applikation OVA-spezifischer Th2-Zellen resultierte nach Allergeninhalation in einer erhöhten Atemwegsreaktivität und einer ausgeprägten Atemwegsentzündung. Etwa 80% der in der BAL befindlichen Zellen waren Eosinophile, die typischerweise bei einer Th2-vermittelten Entzündung in die Atemwege rekrutiert werden. In vitro zeigten Th2-Zellen, kultiviert mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram, keine Beeinträchtigungen in Zytokinproduktion und Zellproliferation. Eine Behandlung der Th2-transferierten Tiere mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram während der Allergenprovokationsphase hatte ebenfalls selbst unter Verwendung hoher Dosen (1

mg/kg) keinen signifikanten Einfluss auf die Erkrankungsparameter. In einigen früheren Studien wurde jedoch gegensätzliches beobachtet. Behandlungen mit PDE4-Inhibitoren reduzierten effektiv die Anzeichen einer allergischen Atemwegserkrankung, da sowohl die Entzündung der Atemwege, als auch die Entwicklung einer AHR gemildert waren (70,109-111). Für diese Veröffentlichungen wurden Wildtypmäuse eingesetzt, d. h. die Experimente wurden in Gegenwart von nTregs und iTregs durchgeführt. Im Hinblick auf unsere Beobachtungen kann man daher davon ausgehen, dass in diesen Modellen die PDE4-Inhibitoren ihre Effekte zumindest zum Teil über nTregs vermitteln, obwohl genaue Aussagen darüber aus den Studien nicht hervorgehen.

Voraktivierte preTregs supprimieren effektiv die Th2-basierte Immunantwort in vitro (103). Um zu untersuchen, ob dies auch in vivo gilt, wurden preTregs vor der Th2-Gabe in lymphozytendefiziente Tiere transferiert. Ähnlich den Beobachtungen von Hadeiba und Locksley (74) hatte der preTreg-Transfer keinen signifikanten Einfluss auf die Th2-induzierte AHR. Die Inflammation des Gewebes und die Becherzellmetaplasie wurden durch Applikation von preTregs mäßig reduziert. Dies zeigt, dass preTregs, wie auch in anderen Studien beschrieben wurde, prinzipiell in der Lage sind, in vivo ihre suppressive Funktion auszuüben (75,76). Der größte suppressive Effekt auf die Th2-induzierte AHR und Inflammation zeigte sich, wenn der preTreg-Transfer mit einer PDE4-Inhibitorbehandlung kombiniert wurde. Durch die Verwendung von Rolipram und Piclamilast wurden zwei cAMP-spezifische, kommerziell erwerbliche PDE4-Inhibitoren eingesetzt, die effektiv zur Hemmung der Atemwegserkrankung beitrugen. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die PDE4-Inhibitoren in vivo zur Induktion oder Expansion von Suppressoren beitragen. Dies kann allerdings ausgeschlossen werden, da sich die Frequenz der in der BAL und Lunge befindlichen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ preTregs nach einer Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor nicht signifikant änderte, wie die durchflusszytometrischen Analysen zeigten. Auch könnte es sein, dass die PDE4-Inhibition den cAMP-Gehalt der preTregs erhöht, wodurch die Suppressoren mehr Botenstoffmoleküle in die Effektorzelle transferieren können. Vielmehr basiert die Wirkung von Rolipram oder Piclamilast auf der Reduktion des cAMP-Abbaus im Zytosol der supprimierten Th2 Zellen in der Lunge. Die Analyse der isolierten Lungenzellen von rekonstituierten und allergenprovozierten Rag2^{-/-} Tieren konnte zeigen, dass die Applikation von preTregs

oder die Verabreichung von PDE4-Inhibitoren den cAMP-Gehalt in Th2 Zellen der Lunge nur mäßig steigerte. Wurde die Gabe von preTregs und PDE4-Inhibitor kombiniert, zeigte sich ein massiver Anstieg der cAMP-Konzentration in den Th2 Zellen. Diese Daten implizieren, dass die PDE4-Inhibition einerseits die regulatorische Kapazität von preTregs verstärkt und andererseits die Empfänglichkeit der Th2 Zellen gegenüber der nTreg-vermittelten Suppression erhöht. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in einem therapeutischen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung gemacht werden. Dieses Asthmodell basiert auf einer sekundären Allergenprovokation der Atemwege, begleitet von einer therapeutischen Gabe des PDE4-Inhibitors bzw. von preTregs. Auch hier erschien die kombinierte Applikation von preTregs und PDE4-Inhibitor am effektivsten in der Suppression von AHR und Atemwegsentzündung. In einer früheren Studie von Kanehiro et al. wurde gezeigt, dass die in diesem sekundären Modell eingesetzte Rolipram-Dosis nur in geringem Maße AHR und Entzündung beeinflusste (70). Kombinierte man aber die Rolipram-Gabe mit dem Transfer allergenspezifischer preTregs, konnte die AHR nahezu vollständig supprimiert werden, wie unsere Daten zeigten. Kearley et al. beobachteten ebenfalls, dass die alleinige Gabe von nTregs eine ausgeprägte AHR nicht inhibieren kann (112). In der vorliegenden Arbeit wird schließlich deutlich, dass die kombinierte Behandlung der Th2-induzierten Atemwegserkrankung auch unter therapeutischen Bedingungen einsetzbar ist. Demnach können nun PDE4-Inhibitoren in der Tat als innovative, therapeutische Möglichkeit gegen allergische Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

4.3 Eine allergische Atemwegserkrankung kann nicht nur von Th2 Zellen sondern auch von Th1 Zellen hervorgerufen werden.

In vielen experimentellen Modellen werden allergische Atemwegserkrankungen anhand von Th2-gesteuerten Immunreaktionen dargestellt, da sie mit Eosinophilie und AHR häufig beobachtete Charakteristika bei Patienten mit dieser Krankheit darstellen. Lange galt die Ansicht, dass das in gesunden Individuen herrschende Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-basierten Immunantworten in Asthmatikern in Richtung der Th2-Reaktion verschoben sei (8,9,113-116). Diese Annahme wurde nicht zuletzt aus den Erkenntnissen erhoben, dass Th1 Zellen anhand ihres

Zytokinprofils die Proliferation von Th2 Zellen und die Th2-gesteuerte IgE-Synthese unterdrücken können (12,13). In diesem Zusammenhang wurde versucht, durch Förderung der Th1-gesteuerten Immunantworten in der Lunge das immunologische Gleichgewicht wieder herzustellen, um dem allergischen Asthma entgegenwirken zu können (14,15). In den vergangenen Jahren wurden vermehrt unterschiedliche Asthmaphänotypen identifiziert. Man hat erkannt, dass, abgesehen von der Eosinophilie, auch die neutrophile Atemwegsentzündung in Asthmapatienten vorkommt (16). Vor allem in Patienten, die an schwerem Asthma leiden, konnte dieser Phänotyp vermehrt charakterisiert werden (117). Experimentelle Untersuchungen im Tiermodell deckten auf, dass nicht nur Th2 Zellen, sondern auch allergenspezifische Th1 Zellen in die Lunge von sensibilisierten und allergenexponierten Tieren rekrutiert werden und dort massive, entzündliche Immunreaktionen als Antwort auf eine Allergenprovokation auslösen (20,21). Des Weiteren wurde erkannt, dass nach Exposition sensibilisierter Mäuse mit dem Allergen die Expression von Th1 und Th2 Genen zeitgleich hochreguliert werden (22). Im Sputum von Patienten mit außerordentlich schwerem Asthma wurde eine erhöhte Expression Th1-typischer Zytokine nachgewiesen (17,18). Außerdem fand sich in den bronchialen Epithelzellen dieser Patienten eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT-1, welcher auf das Th1-typische Zytokin IFN- γ reagiert (19).

In dieser Arbeit wurde die Th2-vermittelte mit der Th1-gesteuerten Atemwegserkrankung anhand experimenteller Modelle verglichen. Dafür wurden allergenspezifische Th1 bzw. Th2 Zellen in lymphozytendefiziente Mäuse transferiert und diese anschließend durch wiederholte Allergeninhalation provoziert. Sowohl Th1 als auch Th2 Zellen waren nach dem Transfer in vivo nachweisbar und die Exposition mit dem Allergen induzierte eine entzündliche Reaktion in den Atemwegen. Entsprechend der veröffentlichten Daten anderer Gruppen und der vorangegangenen Experimente riefen Th2 Zellen in der Lunge Eosinophilie und erhöhte Mukusproduktion hervor. In Th1-transferierten Tieren war zwar eine massive Infiltration neutrophiler Granulozyten zu beobachten, eine wesentliche Becherzellmetaplasie blieb allerdings aus (10,118). Des Weiteren wurde berichtet, dass Th1 Zellen zusätzlich zur Entzündung auch eine gesteigerte Atemwegsreaktivität auslösen (119,120). Die in der vorliegenden Arbeit

durchgeführten Experimente belegen diese Aussagen. Der Transfer von Th1 Zellen in B- und T-zelldefiziente Mäuse und die anschließende Atemwegsprovokation führten zur Entwicklung einer AHR. Die invasive Lungenfunktionsmessung zeigte jedoch, dass der Effekt in Th1-transferierten Tieren verglichen mit der Th2-induzierten AHR schwächer ausgeprägt war. Aufgrund der Komplexität von Asthmasyndromen ist das gewählte System nicht geeignet, um vollständige Vorgänge und Gegebenheiten dieser Erkrankung darzustellen. Dennoch erlauben die Experimente einen deutlichen Einblick in das Zusammenspiel verschiedener T-Zellsubpopulationen in vivo während der asthmatischen Pathogenese.

4.4 Eine Th1-induzierte Atemwegserkrankung kann im Gegensatz zur Th2-geprägten Erkrankung durch preTreg-Gabe effektiv behandelt werden.

Im weiteren Verlauf sollte die nTreg-vermittelte Suppression von Th1 und Th2-induzierten Immunantworten in vivo und in vitro analysiert und verglichen werden. Innerhalb der In vivo-Experimente erfolgte vor einem Th1- bzw. Th2-Transfer in Rag2^{-/-} Mäuse die Applikation in vitro expandierter, allergenspezifischer preTregs. Den vorangegangenen Experimenten entsprechend, wurden Th2-induzierte AHR, Atemwegsentzündung und Becherzellmetaplasie durch preTregs mäßig supprimiert. Gleichzeitig konnten reduzierte Zahlen IL-4-produzierender T-Zellen in der Lunge nachgewiesen werden. Interessanterweise inhibierte der preTreg-Transfer die Th1-induzierte AHR und Atemwegsneutrophilie nahezu vollständig. Auch die Proliferation der Th1 Zellen war in vivo effektiv supprimiert. Die unterschiedlichen Einflüsse des preTreg-Transfers lassen vermuten, dass sich die Th Effektorsubtypen in ihrer Empfänglichkeit gegenüber der nTreg-vermittelten Suppression unterscheiden.

In Asthmatikern auftretende, chronische Atemwegsentzündungen und AHR werden üblicherweise durch eine inhalative Behandlung mit entzündungshemmenden Corticosteroiden behandelt. Sind die Symptome aber nicht auf eine Th2- sondern auf eine Th1-induzierte Immunreaktion zurückzuführen, verhält sich die Erkrankung charakteristischerweise resistent gegenüber Steroiden (121). Aus diesem Grund ist eine alternative Behandlungsmethode wünschenswert, insbesondere für Patienten mit Anzeichen eines Th1-basierten Asthmas, einschließlich Atemwegsneutrophilie und erhöhter Th1-typischer Zytokine. Die Erkenntnis, dass im Gegensatz zum Th2-

Phänotyp die Th1-induzierte Atemwegserkrankung effektiv durch nTregs supprimiert wird, kann als hilfreicher Hinweis für eventuelle, neue therapeutische Ansätze angesehen werden.

Die Auswirkungen von nTregs auf Th1-induzierte Atemwegserkrankungen verglichen mit der Th2-basierten Krankheit sind bislang nicht vollständig untersucht. In gastroenterologischen Studien wurde in einem Modell einer T-zellinduzierten, autoimmunen Gastritis demonstriert, dass die Th2-induzierte Entzündung der Magenschleimhaut weniger effektiv durch nTregs supprimierbar war als die Th1-gesteuerten Immunantworten (122). Eine mögliche Ursache für die bessere Supprimierbarkeit Th1-induzierter Erkrankungen durch nTregs könnte darin liegen, dass größere Mengen der Suppressoren an den Entzündungsort rekrutiert werden. In den vorliegenden Untersuchungen zeigen durchflusszytometrische Analysen, dass in Lunge und BAL von allergenprovozierten, Th1- und preTreg-transferierten Mäusen die Frequenzen von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Lymphozyten vergleichbar war mit jenen Tieren, die Th2 und preTregs erhielten. Des Weiteren könnten Unterschiede im Suppressionsmechanismus der variierenden nTreg-Effizienz zugrunde liegen. In zahlreichen Veröffentlichungen wurden diverse Mechanismen beschrieben, mit denen nTregs ihre Suppression ausüben. Dabei können je nach Entzündung verschiedene Zelltypen von den Suppressoren beeinflusst werden, weshalb es durchaus wahrscheinlich ist, dass sich nTregs diverser Mechanismen bedienen können, um Immunantworten zu hemmen. Die anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 werden u. a. von nTregs sezerniert und mit immunsuppressiven Antworten in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen in einem Mausmodell für entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa) und auch in einem Modell einer allergischen Atemwegserkrankung demonstrierten aber, dass diese beiden Zytokine nicht die nTreg-vermittelte Suppressionskapazität verstärken. Vielmehr induzieren sie die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine in $CD4^+$ Effektorzellen, welche daraufhin weitere syngene $CD4^+$ Effektorzellen zellkontakt-unabhängig supprimieren (40,75,123,124). Dieser Vorgang wird als *infektiöse Toleranz* bezeichnet und ist von zentraler Bedeutung für die Kontrolle von bestehenden Immunantworten. Die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β üben folglich ihre Funktionen nicht über Thymus-gereifte nTregs, sondern über, in der Peripherie induzierte Tregs (iTregs) aus. In der vorliegenden Arbeit wurden für den adoptiven Zelltransfer

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs angereinigt und in vitro expandiert. Um auszuschließen, dass die hier beobachteten Effekte auf nTregs und nicht auf iTregs zurückzuführen waren, wurden die Suppressoren vor der Gabe durchflusszytometrisch auf die Expression des Transkriptionsfaktors Helios untersucht. In einer Studie von Thornton et al. wurde beschrieben, dass Thymus-gereifte Foxp3⁺ nTregs konstitutiv Helios exprimieren, während es sich bei CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aber Helios negativen Zellen um induzierte Tregs handelt (125). In den jetzigen Untersuchungen konnte in den verwendeten Modellen die Beteiligung von iTregs bei der Suppression der Entzündungsreaktion in den Atemwegen ausgeschlossen werden, da mehr als 98% der transferierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs Helios exprimierten.

4.5 Die effektivere nTreg-vermittelte Suppression der Th1-induzierten Atemwegserkrankung begründet sich weder in einer höheren lokalen nTreg-Präsenz noch in erhöhten cAMP-Spiegel in supprimierten Th1 Zellen.

Für die Suppression CD4⁺ Effektorzellen durch nTregs wurde ein Mechanismus beschrieben, in dem der sekundäre Botenstoff cAMP zellkontakt-abhängig über Gap Junctions auf die Zielzelle übertragen wird, mit der Folge einer inhibierten IL-2 Expression und gehemmter Zellproliferation und Zytokinproduktion (43,106-108). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass preTregs in vivo eine Th2-induzierte allergische Atemwegserkrankung nur mäßig supprimierten. Eine Störung des cAMP-Abbaus durch Inhibition der PDE4 verstärkte die nTreg-vermittelte Suppression von AHR und Entzündung und bestätigte, dass nTregs in der Lunge über den cAMP-abhängigen Suppressionsmechanismus auf Th2 Zellen wirken. Um dem auch in Th1-induzierten allergischen Atemwegserkrankungen nachzugehen und mit dem Th2-vermittelten Krankheitsbild zu vergleichen, wurden die zytosolischen cAMP-Spiegel supprimierter Th1 und Th2 Zellen ex vivo bestimmt. Aus den Lungen von Th1/preTreg- und Th2/preTreg-rekonstituierten, allergenprovozierten Rag2^{-/-} Mäusen isoliert, wiesen die supprimierten Effektorsubpopulationen signifikant erhöhte, zytosolische cAMP-Mengen auf, verglichen mit unsupprimierten Th1 bzw. Th2 Zellen. Interessanterweise waren die cAMP-Spiegel in supprimierten Th1 und Th2 Effektorzellen vergleichbar. Demnach induzierte die gleiche Menge cAMP die effektive Suppression einer Th1-

induzierten Immunantwort, während Th2-gesteuerte Reaktionen nur mäßig betroffen waren. Die Beobachtungen in vivo wurden im Folgenden durch in vitro Analysen bestätigt. Auch nach Kokultur von preTregs mit Th1 bzw. Th2 Zellen konnten vergleichbare cAMP-Spiegel in den supprimierten Effektorzellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass preTregs die Th2-Effektorfunktionen (Zytokinproduktion, Proliferation) nicht mehr effektiv beeinflussen konnten, sobald man ihren Anteil in der Kokultur unter ein Verhältnis von Th2:preTreg 1:0,3 senkte. Unter diesen Bedingungen wurden die IL-4 Produktion der Th2 Zellen zu 60%, die Th2-Proliferation lediglich zu 40% inhibiert. Verglichen dazu hatte die nTreg-vermittelte Suppression einen stärkeren Effekt auf IFN- γ und IL-2-Produktion und die Zellproliferation von Th1 Zellen. Selbst bei einem Verhältnis von Th1:preTreg 1:0,1 konnten derartige geringe preTreg-Mengen eine Suppression der Th1-Proliferation von mehr als 80% und der IFN- γ Produktion von mehr als 60% verursachen. Auch in Studien mit humanen Tregs wurde gezeigt, dass sie einen größeren, inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation von Th1 Zellen ausüben, verglichen mit Th2 Zellen (104). Diese Erkenntnis wurde damit begründet, dass Th2 Zellen in der Lage sind, mit Hilfe eigens produzierter Zytokine auch in Abwesenheit von IL-2 zu proliferieren. Weiterhin wurde schon in einer frühen Veröffentlichung anhand von In vitro-Tests dargestellt, dass Th1 und Th2 Zellen sich wesentlich in ihren Reaktionen auf erhöhte, zytosolische cAMP-Spiegel unterscheiden (126). Entsprechend der in diesen Experimenten gezeigten Daten führte die Steigerung des cAMP-Gehalts (mittels chemischer Reagenzien wie Forskolin und Choleratoxin) in Th1 Zellen zur Inhibition der IL-2 Produktion und Zellproliferation. Im Gegensatz dazu blieben Zellteilung und IL-4 Produktion der Th2 Zellen ohne Beeinträchtigung.

4.6 Ausblicke

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass Atemwegsentzündung und AHR durch den Transfer von Th1 und Th2 Zellen hervorgerufen werden können und die Darstellung unterschiedlicher Phänotypen dieser Erkrankung ermöglichen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass murine nTregs in vitro und in vivo ihre suppressive Kapazität auf die Effektorzellspopulationen über einen cAMP-Transfer vermitteln. Die Behandlung mit PDE4-Inhibitoren unterstützte die nTreg-basierte

Suppression und verhalf zur effektiven Regulation der Th2-induzierten Krankheitssymptome. Ein Vergleich der Suppression beider Phänotypen erbrachte, dass trotz vergleichbarer Mengen des übertragenen Botenstoffs cAMP, die Th1-induzierte Atemwegserkrankung effektiver durch nTregs gehemmt wurde als die Th2-gesteuerten Parameter. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass mögliche nTreg-basierte Therapiestrategien effektiver in Patienten wirksam sind, die wie z. B. bei schwerem Asthma Symptome einer Th1-induzierten, neutrophilisch geprägten Atemwegsentzündung aufweisen. Als Möglichkeit einer neuen Behandlungsvariante könnten Asthmapatienten ex vivo generierte oder individuell modifizierte nTregs verabreicht werden (102). In vorklinischen Studien in Mausmodellen allergischer Atemwegserkrankungen konnte bereits die Effektivität dieses Therapieansatzes gezeigt werden (75).

Die Übertragung auf den Menschen ist allerdings mit Hindernissen verbunden und die Therapievariante, den Patienten in vitro expandierte, allergenspezifische nTregs zu transferieren, ist kritisch zu bewerten. Trotz des Fortschritts in der Durchführung von Isolation und Expansion humaner nTregs in vitro (100,101) bestehen hohe Risiken, die während der In vitro-Expansion der Suppressoren auftreten könnten. Beispielsweise könnten unbeachtet autoreaktive oder virusinfizierte T-Zellen die Kultur kontaminieren und für den Patienten ein erhöhtes Tumor- bzw. Infektionsrisiko bedeuten. Davon abgesehen ist die Ausbeute an humanen nTregs äußerst limitiert. Daher sollte hinterfragt werden, ob große Zellmengen überhaupt den Patienten applizierbar sind. Aus den genannten Gründen ist eine Kombination mit Pharmazeutika erstrebenswert, die die Suppressivität der nTregs bestärken. So kann die notwendige Menge der zu transferierenden Suppressoren reduziert werden. Die Daten verdeutlichen, dass die Hemmung der PDE4-Funktionen die Kapazität der transferierten nTregs entscheidend erhöht, eine akute, Th2-induzierte allergische Atemwegserkrankung zu supprimieren. Auch im Modell einer sekundären Allergenprovokation sensibilisierter Individuen, welches dem realen Allergieverlauf eines Asthmapatienten näher liegt, konnte dieser Effekt beobachtet werden. Diese Erkenntnisse unterstützen die Idee, dass eine zusätzliche, pharmakologische Behandlung die Effektivität einer therapeutischen nTreg-Applikation fördern kann. Die Suppression einer allergischen Atemwegserkrankung könnte damit schon durch den Transfer geringerer nTreg-Mengen erreicht werden. Diverse Untersuchungen

beschäftigten sich mit der Wirkung von Vitamin D₃ (92) oder Corticosteroiden (90), IL-10-produzierende CD4⁺ T-Zellen bzw. So genannte iTregs zu induzieren. Die hemmenden Effekte von PDE4-Inhibitoren und Corticosteroiden auf die Lungenfunktion asthmatischer Patienten nach einer Allergenprovokation sind vergleichbar, was auf eine ähnliche anti-inflammatorische Kapazität schließen lässt (127,128). In Kombination könnte durch Pharmakotherapie die Suppressivität der allergenspezifischen nTregs erhöht werden, während durch simultane Behandlung mit Corticosteroiden parallel iTregs induziert werden. Des Weiteren kann aufgrund ihrer hohen Effektivität eine Reduktion der eingesetzten Konzentrationen beider Substanzen in Betracht gezogen werden, was unerwünschte Nebenwirkungen minimiert und damit ein weiterer Vorteil dieser Behandlungsstrategie darstellt.

Den nTreg-vermittelten Suppressionsmechanismus durch den Einsatz von Pharmazeutika zu unterstützen, bietet einen viel versprechenden und realistischen Ansatz zur Therapie des allergischen Asthmas.

5 Zusammenfassung

Das allergische Asthma ist eine weit verbreitete, immunologische Erkrankung, deren Prävalenz in den vergangenen 20 Jahren vor allem in industrialisierten Regionen drastisch zugenommen hat. Trotz intensiver Forschung und Entwicklung medikamentöser Therapien steigt die Zahl der Patienten stetig an. Charakteristisch für diese Erkrankung sind entzündliche Veränderungen in der Lunge, erhöhte Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR), Mukusproduktion und in chronischen Fällen auch Atemwegsobstruktion. Bei der Entstehung des allergischen Asthmas wird ein anfälliges Individuum durch die Inhalation eines normalerweise unschädlichen, in der Umwelt vorkommenden Antigens (Allergen) sensibilisiert, wodurch im Körper eine eigentlich unangebrachte Immunreaktion in Gang gesetzt wird. CD4⁺ T-Lymphozyten und ganz besonders die Subpopulationen der T-Helfer 1 (Th1) und Th2 Zellen spielen in dem Prozess eine zentrale Rolle. Obwohl ein Großteil der Asthmatiker mit einer Atemwegseosinophilie und erhöhter Expression der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-13 ein Th2-typisches Krankheitsbild aufweisen, wurden weitere Asthmaphänotypen identifiziert. Vornehmlich in Patienten, die an schwerem Asthma leiden, sind dominierende Neutrophilie und erhöhte Mengen IFN- γ in den Atemwegen nachweisbar, was auf eine Th1-gesteuerte Immunreaktion hindeutet. Eine effektive, heilende Therapie des Asthmas wurde bislang nicht entwickelt. Die Inhibition der T-Zellantwort etwa durch Applikation allergenspezifischer, regulatorischer T-Zellen (Tregs) gilt als ein vielversprechender, aber nicht vollständig erforschter Ansatz zur Kontrolle der Krankheitssymptome.

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen und Effekte natürlich vorkommender CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen (nTregs) auf eine Th1 bzw. Th2-induzierte allergische Atemwegserkrankung untersucht. Anhand eines adoptiven Zelltransfermodells unter Einsatz lymphozytendefizienter Rag2^{-/-} Mäuse konnte gezeigt werden, dass sowohl Th1 als auch Th2 Zellen, kombiniert mit mehrfacher, inhalativer Allergenprovokation, eine erhöhte AHR induzieren. Während der Transfer allergenspezifischer Th2 Zellen eine Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und vermehrte Mukusproduktion in den Atemwegen hervorrief, war in Th1-transferierten Tieren zwar eine massive Infiltration neutrophiler Granulozyten zu beobachten, eine Becherzellmetaplasie mit

vermehrten, mukusproduzierenden Atemwegsepithelzellen blieb allerdings aus. In vitro und in vivo waren voraktivierte nTregs (preTregs) nur eingeschränkt in der Lage, die Th2-gesteuerte Atemwegserkrankung zu inhibieren. Im Gegensatz dazu konnten die Th1-Effektorfunktionen in vitro und die Th1-induzierte AHR und Atemwegsentzündung in vivo durch preTregs effektiv gehemmt werden, was auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Th-Subpopulationen weist. Innerhalb der nTreg-vermittelten Suppression wird der sekundäre Botenstoff cAMP auf die zu supprimierende Zelle übertragen und führt zur Hemmung von Proliferation und Zytokinproduktion. Dass dieser Mechanismus nicht nur in vitro, sondern auch in der Suppression der Th2-gesteuerten allergischen Atemwegserkrankung eine Rolle spielt, konnte durch die Störung des intrazellulären cAMP-Abbaus mittels PDE4-Inhibitoren verdeutlicht werden. Sowohl die prophylaktische, als auch die therapeutische Applikation der PDE4-Inhibitoren verstärkte den regulativen Effekt der nTregs auf AHR und Entzündung, korrelierend mit erhöhten, zytosolischen cAMP-Konzentrationen in den Th2 Zellen der Lunge. Trotz des Fortschritts in der Isolation und In vitro-Expansion humaner nTregs ist die Ausbeute an Zellen äußerst limitiert und die Übertragbarkeit größerer Zellmengen nicht zuletzt aufgrund von hohem Kontaminationsrisiko während mehrtägiger In vitro-Expansion fragwürdig. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor die suppressive Kapazität der allergenspezifischen nTregs deutlich erhöhte. Den nTreg-vermittelten Suppressionsmechanismus durch den Einsatz von Pharmazeutika zu unterstützen bietet einen viel versprechenden und realistischen Ansatz zur Therapie des allergischen Asthmas.

6 Abstract

Over the past 20 years, prevalence and morbidity of allergic asthma have increased dramatically, especially in industrialized countries. Numbers of patients still increase despite of intensive research and the development of various medical therapies. Allergic asthma is characterized by chronic inflammation of the airways, airway hyperresponsiveness (AHR), mucus production, airway obstruction and airway remodeling in chronic disease. The inhalation of usually harmless antigens (aeroallergens) leads to an allergic sensitization of susceptible individuals inducing inappropriate immune responses against these aeroallergens. CD4⁺ T lymphocytes, especially T helper 1 (Th1) and Th2 cells play a key role during allergic sensitization. Most asthmatic patients display a Th2-derived inflammatory phenotype by airway eosinophilia and increased expressions of the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. However, in the recent years clinically different phenotypes of asthma were identified. Airway neutrophilia and increased expression of IFN- γ have been reported in patients with severe asthma, indicating a Th1-driven immune response. To date, curative asthma therapies have not been developed. The inhibition of inflammatory T cell responses by application of allergen-specific regulatory T cells (Tregs) is seen as a promising but poorly defined approach to control allergic airway diseases. In this thesis mechanisms and effects of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (nTregs) on Th1 and Th2-induced allergic airway disease were analyzed. In a mouse model of allergic airway disease using lymphocyte-deficient Rag2^{-/-} mice it was shown that the adoptive transfer of Th1 as well as Th2 cells induced increased AHR after inhalative allergen exposure. The transfer of allergen-specific Th2 cells resulted in eosinophilic accumulation in bronchoalveolar lavage (BAL) and increased mucus production. Infiltration of neutrophils but no goblet cell metaplasia was detected in Th1-transferred mice. In vitro and in vivo the additional transfer of allergen-specific pre-activated nTregs (preTregs) did not significantly inhibit Th2-based airway disease. In contrast, Th1 effector functions and Th1-induced AHR and airway inflammation were effectively suppressed by preTregs, suggesting a different susceptibility of the Th subtypes concerning nTreg-mediated suppression. The mechanism of nTreg-based suppression includes a cell-contact dependent transfer of the second messenger molecule 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) to T

effector cells mediating the inhibition of cell proliferation and cytokine production. To demonstrate that this mechanism is also true for the suppression of a Th2-induced allergic airway disease in vivo, phosphodiesterase 4 (PDE4)-inhibitors were used to block intracellular cAMP degradation. Prophylactic and therapeutic treatment with PDE4-inhibitors enhanced the suppressive effect of nTregs on AHR and airway inflammation. These findings correlated with increased levels of intracellular cAMP in the Th2 cells of the lungs. The application of ex vivo generated or modified human nTregs to patients with allergic asthma may exhibit insuperable problems. The isolation of nTregs is highly limited as their fraction in the peripheral blood is very small and the fact that the cells have to be expanded ex vivo before transfer marks accessory risks since the possibility of concurrently expanding autoreactive T effector cells or the introduction of transforming viruses during culture is present. The results of this thesis indicate that the treatment with PDE4-inhibitors clearly augmented the suppressive capacity of allergen-specific nTregs. Thus, the selective pharmaceutical improvement of the suppressive potency of nTregs is a promising intervention strategy to suppress immune responses unwanted in allergic asthma.

7 Literaturverzeichnis

1. Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* 28:445-89.:445.
2. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21:713-58. Epub;2001 Dec;19.:713.
3. Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* 24:607-56.:607.
4. Cain, H. 2001. Bronchoprovocation testing. *Clin. Chest Med.* 22:651.
5. Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* 344:350.
6. Umetsu, D. T., and R. H. DeKruyff. 2006. The regulation of allergy and asthma. *Immunol. Rev.* 212:238-55.:238.
7. Gosset, P., M. Pichavant, C. Faveeuw, F. Bureau, A. B. Tonnel, and F. Trottein. 2005. Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur. J. Immunol.* 35:1491.
8. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* 326:298.
9. Taube, C., C. Duez, Z. H. Cui, K. Takeda, Y. H. Rha, J. W. Park, A. Balhorn, D. D. Donaldson, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J. Immunol.* 169:6482.
10. Cohn, L., R. J. Homer, A. Marinov, J. Rankin, and K. Bottomly. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J. Exp. Med.* 186:1737.
11. Taube, C., A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135:173.
12. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383:787.

13. Coffman, R. L., B. W. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Cherwinski, H. F. Savelkoul, F. D. Finkelman, M. W. Bond, and . 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102:5-28.:5.
14. Gavett, S. H., D. J. O'Hearn, X. Li, S. K. Huang, F. D. Finkelman, and M. Wills-Karp. 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* 182:1527.
15. Lack, G., K. L. Bradley, E. Hamelmann, H. Renz, J. Loader, D. Y. Leung, G. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J. Immunol.* 157:1432.
16. Wenzel, S. E. 2006. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet.* 368:804.
17. Truyen, E., L. Coteur, E. Dilissen, L. Overbergh, L. J. Dupont, J. L. Ceuppens, and D. M. Bullens. 2006. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax.* 61:202.
18. Shannon, J., P. Ernst, Y. Yamauchi, R. Olivenstein, C. Lemiere, S. Foley, L. Cicora, M. Ludwig, Q. Hamid, and J. G. Martin. 2008. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest.* 133:420.
19. Sampath, D., M. Castro, D. C. Look, and M. J. Holtzman. 1999. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J. Clin. Invest.* 103:1353.
20. Randolph, D. A., C. J. Carruthers, S. J. Szabo, K. M. Murphy, and D. D. Chaplin. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* 162:2375.
21. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 103:175.
22. Dharajiya, N., S. Vaidya, M. Sinha, B. Luxon, I. Boldogh, and S. Sur. 2009. Allergen challenge induces Ifng dependent GTPases in the lungs as part of a Th1 transcriptome response in a murine model of allergic asthma. *PLoS. One.* 4:e8172.

23. Kim, H. Y., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 11:577.
24. Boyton, R. J., and D. M. Altmann. 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 23:526.
25. Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K. M. Ansel. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Irfng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat. Immunol.* 8:145.
26. Naoe, Y., R. Setoguchi, K. Akiyama, S. Muroi, M. Kuroda, F. Hatam, D. R. Littman, and I. Taniuchi. 2007. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer. *J. Exp. Med.* 204:1749.
27. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 185:817.
28. Gershon, R. K., P. Cohen, R. Hencin, and S. A. Liebhaber. 1972. Suppressor T cells. *J. Immunol.* 108:586.
29. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22:329.
30. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6:345.
31. Bopp, T., H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Ann. Med.* 39:322.
32. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389:737.
33. Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:5986.
34. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2

- receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151.
35. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68.
 36. Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A. M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106:R75-R81.
 37. Gambineri, E., T. R. Torgerson, and H. D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:430.
 38. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27:18.
 39. Shevach, E. M. 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389.
 40. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* 196:255.
 41. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183.
 42. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 7:83.
 43. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204:1303.

44. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* %20;188:287.
45. Yu, A., L. Zhu, N. H. Altman, and T. R. Malek. 2009. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity.* %20;30:204.
46. Bodor, J., L. Feigenbaum, J. Bodorova, C. Bare, M. S. Reitz, Jr., and R. E. Gress. 2001. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leukoc. Biol.* 69:1053.
47. Rannels, S. R., and J. D. Corbin. 1980. Two different intrachain cAMP binding sites of cAMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 255:7085.
48. Skalhegg, B. S., B. F. Landmark, S. O. Doskeland, V. Hansson, T. Lea, and T. Jahnsen. 1992. Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267:15707.
49. Schillace, R. V., S. F. Andrews, S. G. Galligan, K. A. Burton, H. J. Starks, H. G. Bower, G. S. McKnight, M. P. Davey, and D. W. Carr. 2005. The role of protein kinase A anchoring via the RII alpha regulatory subunit in the murine immune system. *J. Immunol.* 174:6847.
50. Amieux, P. S., D. E. Cummings, K. Motamed, E. P. Brandon, L. A. Wailes, K. Le, R. L. Idzerda, and G. S. McKnight. 1997. Compensatory regulation of RIalpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J. Biol. Chem.* 272:3993.
51. Sands, W. A., and T. M. Palmer. 2008. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal.* 20:460.
52. Impey, S., S. R. McCorkle, H. Cha-Molstad, J. M. Dwyer, G. S. Yochum, J. M. Boss, S. McWeeney, J. J. Dunn, G. Mandel, and R. H. Goodman. 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell.* 119:1041.
53. Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599.
54. Brenner, S., S. Prosch, K. Schenke-Layland, U. Riese, U. Gausmann, and C. Platzer. 2003. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J. Biol. Chem.* 278:5597.

55. Hughes-Fulford, M., E. Sugano, T. Schopper, C. F. Li, J. B. Boonyaratanakornkit, and A. Cogoli. 2005. Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal.* 17:1111.
56. Lamas, M., E. Lalli, N. S. Foulkes, and P. Sassone-Corsi. 1996. Rhythmic transcription and autoregulatory loops: nuclear pacemaker CREM. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61:285-94.:285.
57. Bodor, J., A. L. Spetz, J. L. Strominger, and J. F. Habener. 1996. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:3536.
58. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 37:884.
59. Yehia, G., F. Schlotter, R. Razavi, A. Alessandrini, and C. A. Molina. 2001. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin-mediated destruction. *J. Biol. Chem.* 276:35272.
60. Chuvpilo, S., E. Jankevics, D. Tyrsin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling. 2002. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity.* 16:881.
61. Bodor, J., and J. F. Habener. 1998. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *J. Biol. Chem.* 273:9544.
62. Vaeth, M., T. Gogishvili, T. Bopp, M. Klein, F. Berberich-Siebelt, S. Gattenloehner, A. Avots, T. Sparwasser, N. Grebe, E. Schmitt, T. Hunig, E. Serfling, and J. Bodor. 2011. Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:2480.
63. Conti, M., and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76:481-511.:481.
64. Essayan, D. M. 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:671.
65. Muller, T., P. Engels, and J. R. Fozard. 1996. Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 17:294.

66. Abrahamsen, H., G. Baillie, J. Ngai, T. Vang, K. Nika, A. Ruppelt, T. Mustelin, M. Zaccolo, M. Houslay, and K. Tasken. 2004. TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling. *J. Immunol.* 173:4847.
67. Schudt, C., H. Tenor, and A. Hatzelmann. 1995. PDE isoenzymes as targets for anti-asthma drugs. *Eur. Respir. J.* 8:1179.
68. Barst, R. J., J. S. Gibbs, H. A. Ghofrani, M. M. Hoeper, V. V. McLaughlin, L. J. Rubin, O. Sitbon, V. F. Tapson, and N. Galie. 2009. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54:S78-S84.
69. Hammad, H., M. Kool, T. Soullie, S. Narumiya, F. Trottein, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2007. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 19204:357.
70. Kanehiro, A., T. Ikemura, M. J. Makela, M. Lahn, A. Joetham, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2001. Inhibition of phosphodiesterase 4 attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a model of secondary allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 163:173.
71. Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Kohl, Y. Belkaid, and M. Wills-Karp. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J. Exp. Med.* 202:1549.
72. Suto, A., H. Nakajima, S. I. Kagami, K. Suzuki, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2001. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164:680.
73. Jaffar, Z., K. S. Wan, and K. Roberts. 2002. A key role for prostaglandin I2 in limiting lung mucosal Th2, but not Th1, responses to inhaled allergen. *J. Immunol.* 169:5997.
74. Hadeiba, H., and R. M. Locksley. 2003. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J. Immunol.* 170:5502.
75. Kearley, J., J. E. Barker, D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* 202:1539.
76. Joetham, A., K. Takeda, C. Taube, N. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, Y. H. Rha, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2007. Naturally occurring lung

- CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J. Immunol.* 178:1433.
77. Wilson, M. S., M. D. Taylor, A. Balic, C. A. Finney, J. R. Lamb, and R. M. Maizels. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 202:1199.
78. Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, T. B. Oriss, B. von-McCarthy, L. Yang, B. T. Ameredes, T. E. Corcoran, and A. Ray. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J. Clin. Invest.* 114:28.
79. Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 8:1024.
80. Stock, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat. Immunol.* 5:1149.
81. Zuany-Amorim, C., E. Sawicka, C. Manlius, M. A. Le, L. R. Brunet, D. M. Kemeny, G. Bowen, G. Rook, and C. Walker. 2002. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat. Med.* 8:625.
82. Doganci, A., T. Eigenbrod, N. Krug, G. T. De Sanctis, M. Hausding, V. J. Erpenbeck, e. Haddad, H. A. Lehr, E. Schmitt, T. Bopp, K. J. Kallen, U. Herz, S. Schmitt, C. Luft, O. Hecht, J. M. Hohlfeld, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, H. Renz, M. F. Neurath, P. R. Galle, and S. Finotto. 2005. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115:313.
83. Strickland, D. H., P. A. Stumbles, G. R. Zosky, L. S. Subrata, J. A. Thomas, D. J. Turner, P. D. Sly, and P. G. Holt. 2006. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 203:2649.
84. Meiler, F., J. Zumkehr, S. Klunker, B. Ruckert, C. A. Akdis, and M. Akdis. 2008. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* 205:2887.
85. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. Immune responses in

- healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 199:1567.
86. Bellinghausen, I., B. Klostermann, J. Knop, and J. Saloga. 2003. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:862.
87. Grindebacke, H., K. Wing, A. C. Andersson, E. Suri-Payer, S. Rak, and A. Rudin. 2004. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin. Exp. Allergy.* 34:1364.
88. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 363:608.
89. Hartl, D., B. Koller, A. T. Mehlhorn, D. Reinhardt, T. Nicolai, D. J. Schendel, M. Giese, and S. Krauss-Etschmann. 2007. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1258.
90. Karagiannidis, C., M. Akdis, P. Holopainen, N. J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P. Y. Mantel, G. Menz, C. A. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114:1425.
91. Hawrylowicz, C., D. Richards, T. K. Loke, C. Corrigan, and T. Lee. 2002. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:369.
92. Xystrakis, E., S. Kusumakar, S. Boswell, E. Peek, Z. Urry, D. F. Richards, T. Adikibi, C. Pridgeon, M. Dallman, T. K. Loke, D. S. Robinson, F. J. Barrat, A. O'Garra, P. Lavender, T. H. Lee, C. Corrigan, and C. M. Hawrylowicz. 2006. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J. Clin. Invest.* 116:146.
93. Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 5:271.
94. Bellinghausen, I., G. Metz, A. H. Enk, S. Christmann, J. Knop, and J. Saloga. 1997. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* 27:1131.
95. Faith, A., D. F. Richards, A. Verhoef, J. R. Lamb, T. H. Lee, and C. M. Hawrylowicz. 2003. Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by

- allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B: relevance to immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy*. 33:1209.
96. Francis, J. N., S. J. Till, and S. R. Durham. 2003. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:1255.
97. Nouri-Aria, K. T., P. A. Wachholz, J. N. Francis, M. R. Jacobson, S. M. Walker, L. K. Wilcock, S. Q. Staple, R. C. Aalberse, S. J. Till, and S. R. Durham. 2004. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J. Immunol.* 172:3252.
98. Abramson, M. J., R. M. Puy, and J. M. Weiner. 2003. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD001186.
99. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193:1285.
100. Godfrey, W. R., Y. G. Ge, D. J. Spoden, B. L. Levine, C. H. June, B. R. Blazar, and S. B. Porter. 2004. In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood.* 104:453.
101. Hoffmann, P., R. Eder, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and M. Edinger. 2004. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood.* 104:895.
102. Xystrakis, E., Z. Urry, and C. M. Hawrylowicz. 2007. Regulatory T cell therapy as individualized medicine for asthma and allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7:535.
103. Stassen, M., H. Jonuleit, C. Muller, M. Klein, C. Richter, T. Bopp, S. Schmitt, and E. Schmitt. 2004. Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J. Immunol.* 173:267.
104. Cosmi, L., F. Liotta, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, L. Lasagni, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, F. Annunziato, and S. Romagnani. 2004. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood.* 103:3117.
105. Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley. 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 59:469.

106. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257.
107. Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell, and T. R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* 177:6780.
108. Naganuma, M., E. B. Wiznerowicz, C. M. Lappas, J. Linden, M. T. Worthington, and P. B. Ernst. 2006. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J. Immunol.* 177:2765.
109. Underwood, D. C., R. R. Osborn, L. B. Novak, J. K. Matthews, S. J. Newsholme, B. J. Udem, J. M. Hand, and T. J. Torphy. 1993. Inhibition of antigen-induced bronchoconstriction and eosinophil infiltration in the guinea pig by the cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266:306.
110. Danahay, H., and K. J. Broadley. 1997. Effects of inhibitors of phosphodiesterase, on antigen-induced bronchial hyperreactivity in conscious sensitized guinea-pigs and airway leukocyte infiltration. *Br. J. Pharmacol.* 120:289.
111. Turner, C. R., C. J. Andresen, W. B. Smith, and J. W. Watson. 1994. Effects of rolipram on responses to acute and chronic antigen exposure in monkeys. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 149:1153.
112. Kearley, J., D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:617.
113. Mattes, J., M. Yang, A. Siqueira, K. Clark, J. MacKenzie, A. N. McKenzie, D. C. Webb, K. I. Matthaei, and P. S. Foster. 2001. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. *J. Immunol.* 167:1683.
114. Tomkinson, A., A. Kanehiro, N. Rabinovitch, A. Joetham, G. Cieslewicz, and E. W. Gelfand. 1999. The failure of STAT6-deficient mice to develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160:1283.
115. Tomkinson, A., C. Duez, M. Lahn, and E. W. Gelfand. 2002. Adoptive transfer of T cells induces airway hyperresponsiveness independently of airway

- eosinophilia but in a signal transducer and activator of transcription 6-dependent manner. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:810.
116. Shimoda, K., D. J. van, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul, and J. N. Ihle. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature.* 380:630.
117. Haldar, P., and I. D. Pavord. 2007. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1043.
118. Cohn, L., J. S. Tepper, and K. Bottomly. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J. Immunol.* 161:3813.
119. Takaoka, A., Y. Tanaka, T. Tsuji, T. Jinushi, A. Hoshino, Y. Asakura, Y. Mita, K. Watanabe, S. Nakaike, Y. Togashi, T. Koda, K. Matsushima, and T. Nishimura. 2001. A critical role for mouse CXC chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during Th type 1-dependent airway inflammation. *J. Immunol.* 167:2349.
120. Cui, J., S. Pazdziorko, J. S. Miyashiro, P. Thakker, J. W. Pelker, C. Declercq, A. Jiao, J. Gunn, L. Mason, J. P. Leonard, C. M. Williams, and S. Marusic. 2005. TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:309.
121. Yang, M., R. K. Kumar, and P. S. Foster. 2009. Pathogenesis of steroid-resistant airway hyperresponsiveness: interaction between IFN-gamma and TLR4/MyD88 pathways. *J. Immunol.* 182:5107.
122. Stummvoll, G. H., R. J. DiPaolo, E. N. Huter, T. S. Davidson, D. Glass, J. M. Ward, and E. M. Shevach. 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* 181:1908.
123. Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* 196:247.
124. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201:737.
125. Thornton, A. M., P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 184:3433.

126. Munoz, E., A. M. Zubiaga, M. Merrow, N. P. Sauter, and B. T. Huber. 1990. Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 172:95.
127. Lipworth, B. J. 2005. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 365:167.
128. Bousquet, J., M. Aubier, J. Sastre, J. L. Izquierdo, L. M. Adler, P. Hofbauer, K. D. Rost, U. Harnest, B. Kroemer, A. Albrecht, and D. Bredenbroker. 2006. Comparison of roflumilast, an oral anti-inflammatory, with beclomethasone dipropionate in the treatment of persistent asthma. *Allergy.* 61:72.

8 Abkürzungsverzeichnis

[³ H]TdR	Radioaktives [³ H]-Thymidin
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AHR	Airway hyperresponsiveness, Atemwegsüberempfindlichkeit
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BM	Basalmembran
BM	Basalmembran
bzw.	Beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat, Adenosin-3',5'-Monophosphat
CD	Cluster of Differentiation
C _{dyn}	Dynamische Compliance
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
chall	Challenged, allergenprovoziert
cpm	Counts per minute, Impulse pro Minute
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsible binding Protein
CREM	cAMP response element modulator
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-induced tumor antigen-4
d. h.	Das heißt
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
engl.:	Englisch

EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
GATA3	Transacting T-cell-specific transcription factor-3
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HBSS	Hank's balanced salt solution
hIL	Humanes Interleukin
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
ICER	Inducible cAMP early repressor
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
kg	Kilogramm
MACS®	Magnetic activated cell sorting
Mch	Methacholin
MEM	Minimal essential medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mr	Murin rekombinant

n	Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe
N	Mol
N. D.	Nicht detektierbar
NFAT	Nuclear factor of activated T cell
nm	Nanometer
nM	Nanomol
nTreg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ natürliche regulatorische T-Zellen
OD	Optische Dichte
OP-Garn	Operationsgarn
OVA	Ovalbumin
p	p-Wert, Signifikanzniveau
PAS	Periodic Acid-Schiff Stain
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE	3',5'-Cyclonucleotid-Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
pmol	Picomol
preTreg	voraktivierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ natürliche regulatorische T-Zellen
Rag2	Recombination activating gene 2
Rag2 ^{-/-}	Recombination activating gene 2-deficient
R _L	Pulmonaler Widerstand
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Runx-3	Runt-related transcription factor-3
s	Sekunde
s.	siehe

SA	Streptavidin
SEM	Standard error of the mean
Sens	Sensibilisiert
SIT	Spezifische Immuntherapie
SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T-bet	T box transcription factor
TCR	T-Zellrezeptor
tg	transgen
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
Thy1	Thymocyte differentiation antigen 1, CD90
TM	Testmedium
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit, enzymatische Reaktionseinheit
u. a.	Unter anderem
vgl.	Vergleiche
WT	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

9 Lebenslauf

