

**Evaluation zellulärer Mechanismen der allergen-
spezifischen Immuntherapie in einem chronischen Modell
der allergischen Atemwegsentzündung**

Dissertation zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Livia Böhm

geboren in Görlitz

Mainz, 2013

Aus dem
Institut für Immunologie
der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Termin der Verteidigung: 25.04.2014

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

[Namen aus Datenschutzgründen gelöscht]

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Doktorarbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den 12.11.2013

Livia Böhm

Zusammenfassung

Klinische Studien haben gezeigt, dass die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) eine effektive Therapieoption für allergische Erkrankungen ist. Obwohl dieses Therapieverfahren, das auch als Hyposensibilisierung bezeichnet wird, seit über 100 Jahren existiert, sind die zugrunde liegenden Suppressionsmechanismen nicht vollständig verstanden. Bisher wird angenommen, dass der Behandlungserfolg der SIT auf einer Blockade durch allergenspezifische Antikörper, einer Verschiebung des Th1–Th2-Gleichgewichtes und/oder auf einer Suppression durch regulatorische T-Zellen (Tregs) basiert. Um die Effekte der SIT in einer chronischen Erkrankung in vivo untersuchen zu können, wurde in dieser Doktorarbeit ein Mausmodell für chronisches Asthma entwickelt, das die Situation im Menschen nach einer SIT nachahmt.

Durch SIT war es möglich, allergeninduzierte Asthmasymptome wie Atemwegshyperreagibilität (AHR), Eosinophilie in der Lunge, IgE-Produktion und Atemwegsentzündung im Modell zu unterdrücken. Bemerkenswert ist, dass durch OVA-spezifische Immuntherapie (OVA-IT) ebenfalls eine Verringerung der strukturellen Veränderungen im Lungengewebe im chronischen Krankheitsverlauf erreicht wurde. Des Weiteren wurde in diesem Modell nach den Prozessen gesucht, die für die toleranzinduzierende Wirkung der SIT verantwortlich sein können. Dabei wurde im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe eine erhöhte Antwort spezifischer IgG1-Antikörper, eine verstärkte Th1-Antwort sowie eine erhöhte Frequenz von FoxP3⁺ Tregs und von IL-10-produzierenden T-Zellen (Tr1-Zellen) nach OVA-IT festgestellt. Zur weiteren Untersuchung der von SIT-induzierten T-Zellantworten wurden Mausmodelle des allergischen Asthmas mit einem akuten Verlauf gewählt.

Die Bedeutung der Th1-Zellen für die SIT wurde in T-bet^{-/-} Mäusen untersucht, welche aufgrund des Fehlens des Transkriptionsfaktors T-bet keine stabile Th1-Antwort induzieren können. Durch SIT war es möglich, allergeninduzierte Asthmasymptome wie AHR, eosinophile Granulozyten in der Lunge, IgE-Produktion und Atemwegsentzündung in den T-bet^{-/-} Tieren im gleichen Maße wie in den Wildtyptieren zu unterdrücken. Diese Untersuchung zeigte, dass die SIT auch ohne funktionelle Th1-Zellen die allergische Entzündung unterdrücken kann.

Die Rolle der Tregs bei der SIT wurde in DO11.10 Mäusen und DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen untersucht. In beiden Stämmen konnten nach SIT eine Induktion OVA-spezifischer Tregs nachgewiesen werden. Durch den Knockout im *rag2*-Gen können in DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse keine natürlichen, d.h. im Thymus gereiften, Tregs entstehen. Dennoch war direkt nach Durchführung der OVA-IT eine FoxP3⁺ Treg-Population im Blut dieser Mäuse detektierbar. Demnach wird durch die OVA-IT eine de-novo-Induktion von FoxP3⁺ Tregs in Gang gesetzt.

In Abwesenheit der natürlichen Tregs zeigte sich weiterhin, dass diese Zellen zur Produktion von IL-10 in T-Zellen und somit zum Erfolg der Therapie beitragen.

Die Rolle der FoxP3⁺ Tregs bei der SIT wurde in DEREK Mäusen untersucht, die durch die Expression des Diphtherie-Rezeptors unter Kontrolle des FoxP3-Promotors die gezielte Abtötung von FoxP3⁺ Tregs durch Verabreichung des Diphtherie-Toxins ermöglichen. Eine Depletion der FoxP3⁺ Tregs während der Durchführung der OVA-IT hob die protektiven Effekte der Therapie im Vergleich zu nicht-Diphtherie-Toxin-behandelten DEREK Mäusen jedoch nur teilweise auf.

Um die Rolle des regulatorischen Zytokins IL-10 bei der SIT zu untersuchen, wurde ein blockierender Antikörper gegen den IL-10-Rezeptor (anti-IL-10R) im chronischen Modell des allergischen Asthmas mit SIT angewendet. Anti-IL-10R hob die protektive Wirkung der SIT auf die AHR, die Atemwegsentszündung und die strukturellen Veränderungen im Lungengewebe auf. Somit ist die protektive Wirkung der SIT abhängig vom IL-10-Signalweg.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit die Bedeutung der SIT für allergische Erkrankungen heraus. SIT kann durch die positive Beeinflussung der allergiebedingten, strukturellen Veränderungen in der Lunge auch für Asthmapatienten große Vorteile bringen. Die aus Studien bekannten Mechanismen konnten im Modell bestätigt werden und wurden im weiteren Verlauf untersucht. Die Arbeit stellt im Besonderen die Bedeutung der IL-10-produzierenden und FoxP3⁺ Tregs für die Effektivität der SIT in den Vordergrund. Zudem ist durch die Etablierung eines neuen Mausmodells der SIT für chronisches allergisches Asthma ein Mittel zur weiteren Erforschung der zugrunde liegenden Prozesse dieser erfolgreichen Therapie geschaffen worden.

Publikationen

Interleukin-10 and regulatory T cells cooperate in allergen specific immunotherapy to ameliorate chronic allergic asthma.

Böhm L, Maxeiner J, Meyer-Martin H, Reuter S, Finotto S, Klein M, Schild H, Schmitt E, Bopp T, Taube C.

zur Veröffentlichung eingereicht

weitere Publikationen:

Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions.

Doener F, Michel A, Reuter S, Friedrich P, Böhm L, Tenzer S, Klein M, Bopp T, Schmitt E, Schild H, Radsak MP, Taube C, Stassen M., Becker M

International Immunology, 2013 Jun 1.

TLR3 but not TLR7/8 ligand induces allergic sensitization to inhaled allergen.

Reuter S, Dehzad N, Martin H, Böhm L, Becker M, Buhl R, Stassen M, Taube C.

Journal of Immunology 2012 May 15; 188(10):5123-31.

Kongressbeiträge

Oktober 2011

Regulatory T cells but not Th1 cells are essential for the allergen specific immunotherapy in a mouse model for allergic asthma

7th Annual Retreat, Seeheim

L. Böhm, J. Maxeiner, N. Dehzad, H. Martin, S. Reuter, T. Bopp, E. Schmitt, H. Schild, S. Finotto, C. Taube

September 2011

Der Transkriptionsfaktor T-bet ist nicht essentiell für die Effektivität der Allergen spezifischen Immuntherapie in einem Mausmodell für allergisches Asthma.

6. Deutscher Allergiekongress, Wiesbaden

L. Böhm, C. Übel, J. Maxeiner, N. Dehzad, H. Martin, S. Reuter, A. Heinz, H. Schild, C. Taube, S. Finotto

Mai 2011

Allergic Experimental Asthma can be ameliorated by Allergen Specific Immunotherapy in the Absence of T-bet.

Immunology 2011, 98th Annual meeting, San Francisco

L. Böhm, C. Übel, J. Maxeiner, N. Dehzad, H. Martin, S. Reuter, A. Heinz, H. Schild, C. Taube, S. Finotto

Oktober 2010

A murine model of allergen immunotherapy for allergic asthma.

6th Annual Retreat, Königsstein

L. Böhm, C. Übel, J. Maxeiner, N. Dehzad, H. Martin, S. Reuter, A. Heinz, H. Schild, C. Taube, S. Finotto

Mai 2010

Role of IL-17 in a murine model of allergen immunotherapy for allergic asthma.

Immunology 2010, 97th Annual meeting, Baltimore

L. Böhm, K. Soo-Becker, C. Übel, P. Schuster, R. Karwot, H.-A. Lehr, H. Schild and S. Finotto

Oktober 2009

Role of IL-17 in a murine model of allergen immunotherapy for allergic asthma

5th Annual Retreat, Seeheim

L. Böhm, K. Soo-Becker, C. Übel, P. Schuster, R. Karwot, H.-A. Lehr, S. Finotto

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Allergie und Asthma	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiopathogenese	2
1.1.2 Immunpathogenese der Allergie und des allergischen Asthmas.....	3
1.1.3 T-Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung	5
1.1.4 Asthma-Phänotypen.....	9
1.2 Therapie allergischer Erkrankungen und des Asthmas.....	10
1.2.1 Pharmakotherapien	10
1.2.2 Die allergenspezifische Immuntherapie	12
1.3 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Laborgeräte.....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Puffer und Medien	20
2.1.4 Enzyme	21
2.1.5 Antikörper für Zellkultur, <i>in vivo</i> -Behandlung und Durchflusszytometrie	21
2.1.6 Histologie	24
2.1.7 Mausstämme	26
2.1.8 Software.....	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Experimentelle Versuchsabläufe	28
2.2.2 Intubieren der Mäuse unter Anästhesie mit Pentobarbital	35
2.2.3 Lungenfunktionsmessung	35
2.2.4 Mauspräparation	37
2.2.5 Zellbiologische Methoden.....	39
2.2.6 Differenzierung der bronchoalveolären Lavage (BAL)	40
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels ELISA	40
2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS®)	41
2.2.9 Histologische Methoden	45
2.2.10 Statistische Analyse	50

3	Ergebnisse	51
3.1	Etablierung einer allergenspezifischen Immuntherapie in einem Modell des chronischen allergischen Asthmas.	51
3.1.1	Status vor Verabreichung der allergenspezifischen Immuntherapie im Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung	51
3.1.2	Suppressive Effekte der allergenspezifischen Immuntherapie im Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung	56
3.1.3	Immuntherapie führt zur Reduktion der Th2-vermittelten Immunantwort im chronischen Modell der allergischen Atemwegsentzündung	59
3.2	Beurteilung der intrapulmonalen pathohistologischen Veränderungen durch Analyse gefärbter Lungenpräparate	60
3.3	Nachweis möglicher toleranzinduzierender Zellen nach einer allergenspezifischen Immuntherapie	64
3.3.1	Induktion einer Th1-Antwort nach Immuntherapie	64
3.3.2	Die Immuntherapie führt zu einer Erhöhung der IL-10-Produktion und zu einem Anstieg von FoxP3 ⁺ regulatorischen T-Zellen im drainierenden Lymphknoten	66
3.4	T-bet-defiziente Mäuse profitieren von den suppressiven Effekten der Immuntherapie in einem Modell des akuten allergischen Asthmas	69
3.4.1	Immuntherapie reduziert die AHR und Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL von T-bet ^{-/-} Mäusen	69
3.4.2	Immuntherapie mildert die Atemwegsentzündung und reduziert Th2-Zytokine in der Lunge in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors T-bet	71
3.5	Effekte der Immuntherapie in DO11.10 Mäusen in einem akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung	75
3.5.1	Immuntherapie führt zur Reduktion des Atemwegswiderstandes und zur Verringerung der Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL	75
3.5.2	Die Immuntherapie führt zur Induktion OVA-spezifischer regulatorischer T-Zellen	76
3.6	Immuntherapie ist teilweise effektiv in Abwesenheit von natürlichen regulatorischen T-Zellen	79
3.6.1	Eine Induktion von regulatorischen T-Zellen ist direkt nach Gabe der Immuntherapie sichtbar	79
3.6.2	Immuntherapie reduziert die Atemwegsüberempfindlichkeit effektiv in Abwesenheit von nTregs	80
3.6.3	Die durch Immuntherapie induzierten IL-10-produzierenden T-Zellen weisen überwiegend eine Produktion von IFN- γ auf	83
3.7	Die Wirksamkeit der Immuntherapie ist nach Depletion von FoxP3 ⁺ T-Zellen in DEREK Mäusen nur partiell eingeschränkt	85
3.8	Die Effekte der Immuntherapie können durch Blockade des IL-10-Signalwegs aufgehoben werden	89

4	Diskussion	93
4.1	Evaluation eines chronischen Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung mit allergenspezifischer Immuntherapie.....	94
4.2	Immunglobuline und Th1-Zellen spielen für die Effektivität der Immuntherapie keine Rolle.....	95
4.2.1	Effekte der allergenspezifischen Immunglobuline nach SIT.....	95
4.2.2	Eine Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung einer Th1-Antwort ist für die Effektivität der SIT nicht von Bedeutung	96
4.3	Durch Immuntherapie entstehen induzierte regulatorische T-Zell-Antworten.....	97
4.3.1	Induktion von FoxP3 ⁺ regulatorischer T-Zellen	98
4.3.2	Induktion von IL-10 und Typ-1 regulatorischen T-Zellen nach SIT.....	99
4.4	Die Wirkung der SIT ist abhängig vom IL-10-Signalweg.....	100
4.5	Ausblick.....	101
5	Literaturverzeichnis	104
6	Abkürzungsverzeichnis	121
7	Danksagung.....	124
8	Curriculum Vitae.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersichtsschema über mögliche Mechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie.....	15
Abbildung 2:	Versuchsplan eines chronischen Modells für die allergische Atemwegsentzündung und begleitender allergenspezifischer Immuntherapie.....	29
Abbildung 3:	Prinzip der gezielten Depletion von Zellen in DT-Rezeptor-transgenen Mäusen	31
Abbildung 4:	Versuchsdurchführung eines prophylaktischen Modells einer allergenspezifischen Immuntherapie.....	32
Abbildung 5:	Ablauf des Immuntherapiemodells mit OVA-T-Zell-Rezeptor transgenen DO11.10 Mäusen oder DO11.10 Rag ^{-/-} Mäusen.	34
Abbildung 6:	Invasives Messgerät zur Messung der Lungenfunktion	37
Abbildung 7:	Scoring System nach Prof. H. Lehr, Lausanne.....	47
Abbildung 8:	Sensibilisierung und mehrfache Provokation der Atemwege mit OVA verstärkt die Atemwegshyperreagibilität und die Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL.	53
Abbildung 9:	Induktion der humoralen Immunantwort gegen das Allergen OVA vor Verabreichung der Immuntherapie. In den Seren der sensibilisierten und provozierten Mäuse ist ein Anstieg der Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a detektierbar.	54
Abbildung 10:	Durchflusszytometrische Analyse von Lungen- und Lymphknotenzellen. Die Frequenz der IL-5-produzierenden T-Zellen vor Verabreichung der OVA-Immuntherapie war nach Sensibilisierung und Provokation erhöht.	55
Abbildung 11:	Die OVA-Immuntherapie (OVA-IT) reduziert die AHR und die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL im Mausmodell des chronischen allergischen Asthmas.	57
Abbildung 12:	Messung der OVA-spezifischen Immunantwort im Serum. Nach OVA-IT wurden geringere Titer des OVA-spezifischen IgE und höhere Titer des OVA-spezifischen IgG1 im Vergleich zur Placebo-Behandlung detektiert.	58
Abbildung 13:	Durchflusszytometrische Analyse der IL-5-produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen in Lunge und tLN. Die OVA-IT schwächt die IL-5-Produktion der CD4 ⁺ T-Zellen im Lymphknoten ab.	59
Abbildung 14:	Nach SIT kommt es in der Lunge zu einer signifikanten Verminderung inflammatorischer Infiltrate sowie mukusproduzierender Becherzellen.....	61
Abbildung 15:	Beurteilung der Umbauprozesse im Lungengewebe durch Analyse von histologischen Paraffinschnitten. Nach Behandlung mit OVA-IT war eine Verringerung der Dicke der Bronchialmuskelschicht und der Kollagenschicht detektierbar.	63
Abbildung 16:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Lungen- und Lymphknotenzellen. Die Frequenz der IFN- γ -produzierenden CD4 ⁺ T-Lymphozyten nimmt nach Gabe der OVA-IT in Lungenzellen und tLN-Zellen zu.	65

Abbildung 17:	Durchflusszytometrische Analyse von Lungen- und tLN-Zellen. In OVA-IT behandelten Tieren waren höhere Frequenzen an CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Tregs und IL-10 ⁺ CD4 ⁺ detektierbar.....	67
Abbildung 18:	Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholin-konzentration und Differentialzählung der Zellen aus der BAL. Die Verabreichung von OVA-Immuntherapie in T-bet ^{-/-} Mäusen reduziert die AHR und Anzahl der Eosinophilen in der BAL.	70
Abbildung 19:	Histologische Evaluation von Lungenschnitten. OVA-Immuntherapie unterdrückt effizient die allergische Atemwegsentzündung und Mukusproduktion durch Becherzellen.....	72
Abbildung 20:	Messung der Th2- und Th17-Zytokine in Überständen von <i>ex vivo</i> kultivierten Lungenzellen. Die OVA-IT reduziert die Produktion der Th2- jedoch nicht der Th17-Zytokine in Lungenzellen von T-bet ^{-/-} Mäusen.	73
Abbildung 21:	Die Frequenz IL-5- (Th2-Zellen) und IL-17A-produzierender CD4 ⁺ T-Zellen (Th17-Zellen) ist in Lungen von BALB/c Mäusen nach OVA-IT-Behandlung im Vergleich zu Lungenzellen von OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren geringer. In den Lungen von T-bet ^{-/-} -Mäusen ist die Frequenz von Th2-Zellen nach OVA-IT niedriger. Die Frequenz der Th17-Zellen bleibt hingegen unverändert.	74
Abbildung 22:	Messung der Lungenfunktion unter steigenden Dosen von Methacholin und absolute Anteile der neutrophilen Granulozyten in der BAL. Die OVA-IT reduziert AHR und den Einstrom von Neutrophilen in den bronchoalveolären Raum in DO11.10 Mäusen.	76
Abbildung 23:	Durchflusszytometrische Analyse von Blut-, Lungen- und Lymphknoten-Zellen. Die Durchführung von OVA-IT in DO11.10 Mäusen führt zum Anstieg der OVA-spezifischen CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Tregs.	77
Abbildung 24:	Durchflusszytometrische Analyse von Lungenzellen. Die Durchführung der OVA-IT von DO11.10 Mäusen führte zum Anstieg der CD4 ⁺ IL-10 ⁺ und CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die induzierten IL-10 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen exprimieren kein FoxP3 ⁺ , sondern produzieren überwiegend IFN- γ	78
Abbildung 25:	Die Durchführung der OVA-IT von DO11.10 RAG ^{-/-} Mäusen, die keine natürlichen Tregs (nTregs) besitzen, führt zum Anstieg der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Tregs im Blut.	79
Abbildung 26:	Messung der Lungenfunktion unter steigenden Dosen von Methacholin und absolute Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL von DO11.10 RAG ^{-/-} Mäusen. Behandlung mit OVA-IT führt zur Verringerung des Atemwegwiderstandes jedoch nicht zu signifikant geringeren Zellzahlen von Neutrophilen in der BAL.	81
Abbildung 27:	Die prophylaktische Behandlung mit OVA-IT führt in DO11.10 RAG Mäusen zum Anstieg der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Tregs in der Peripherie.	82
Abbildung 28:	FACS-Analyse von Lungenzellen. Die prophylaktische Behandlung mit OVA-IT von DO11.10 RAG ^{-/-} Mäusen ohne nTregs führt zum Anstieg der CD4 ⁺ IL-10 ⁺ und CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die induzierten IL-10 ⁺ T-Zellen sind jedoch nicht FoxP3 ⁺ sondern produzieren überwiegend IFN- γ	83

Abbildung 29:	Depletion der FoxP3 ⁺ Zellen im Blut nach Gabe von Diphtherietoxin in DEREK Mäusen. Die einmalige Gabe von Diphtherietoxin verringert die Frequenz der CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	86
Abbildung 30:	Messung der Lungenfunktion und Zellzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL nach Depletion von FoxP3 ⁺ T-Zellen in DEREK Mäusen. Depletion der FoxP3 ⁺ Zellen verursacht nur teilweise eine Aufhebung der suppressiven Effekte der IT.	87
Abbildung 31:	Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholin-konzentration, Bestimmung der Eosinophilenzellzahl aus der BAL und des Titers des OVA-spezifischen IgE im Serum. Die Verabreichung von anti-IL-10R bei gleichzeitiger Durchführung der OVA-IT hebt deren suppressive Wirkung auf.	90
Abbildung 32:	Unter Behandlung mit anti-IL-10R wird die protektive Wirkung auf die Atemwegsentzündung der Immuntherapie aufgehoben.	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	17
Tabelle 2: Labor- und Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3: Puffer	20
Tabelle 4: Medien.....	21
Tabelle 5: Enzyme.....	21
Tabelle 6: Antikörper für Zellkultur	21
Tabelle 7: Antikörper zur Behandlung.....	22
Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	22
Tabelle 9: Antikörper (-Sets) für ELISA.....	23
Tabelle 10: Reagenzien für immunhistochemische Färbungen.....	24
Tabelle 11: Reagenzien für Histologische Färbungen	24
Tabelle 12: Mausstämme	26
Tabelle 13: Verwendete Programme	27

1 Einleitung

1.1 Allergie und Asthma

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 durch den Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet beschrieben. Unter Allergie versteht man eine überschießende Abwehrreaktion des Organismus gegenüber harmlosen Umweltstoffen, den Allergenen (1). Häufige Quellen von Allergenen stellen vor allem Tierhaare, Pollen, Hausstaubmilben und verschiedene Nahrungsmittel dar. Je nach Exposition können die allergischen Symptome auf Schleimhäuten, Haut und im Gastrointestinaltrakt auftreten. Häufig sind aber auch die Atemwege von allergischen Reaktionen betroffen. Die allergische Rhinitis ist mittlerweile als „Volkskrankheit“ unter dem Begriff „Heuschnupfen“ bekannt. Weitere allergische Erkrankungen sind z.B. das allergische Asthma, die allergische Konjunktivitis, das atopische Ekzem und die Urtikaria. Bleibt eine starke allergische Reaktion unbehandelt, kann eine Verschlechterung der Erkrankung eintreten. So kann eine persistierende Provokation mit dem Allergen in den Atemwegen in einem sogenannten „Etagenwechsel“ von einer allergischen Rhinitis zum Asthma bronchiale führen (2, 3).

Das Asthma bronchiale ist eine heterogene chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, bei der die variierenden Symptome anfallsweise auftreten. Im akuten Zustand leidet der Betroffene unter Hustenreiz, Bronchialschleim (Mucus), Kurzatmigkeit bis hin zur Atemnot. Die pathophysiologischen Merkmale des Asthmas sind die spontane Verengung der Atemwege (Bronchialobstruktion), die primär durch die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur verursacht wird. Dabei reagieren die Atemwege mit einer Überempfindlichkeit, der sogenannten Atemwegshyperreagibilität (AHR). Ein weiterer Parameter ist die Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen, insbesondere der eosinophilen Granulozyten, und die gesteigerte Mukusproduktion durch Umwandlung der Epithelzellen in Becherzellen¹ (Becherzellmetaplasie).

Die AHR ist ein charakteristisches Merkmal des Asthmas und bezeichnet die gesteigerte Empfindlichkeit der Atemwege gegenüber verschiedenen Auslösern, wie Allergenen, Rauch oder kalte Luft. Gegenüber einer Reizung der Atemwege mit einem inhalierten Bronchokonstriktor (Methacholin) reagieren Asthmatiker im Vergleich zu gesunden Individuen mit einem gesteigerten Bronchospasmus. Zur Diagnosestellung wird dieses Merkmal im Lungenfunktionstest analysiert. Dabei entsteht nach Provokation mit Methacholin eine reversible Obstruktion der Atemwege, wodurch sich der

¹ **Becherzellen** sind mukusproduzierende Drüsenzellen, die sich in der Epithelschicht der Atemwege befinden. Bei Asthma-Patienten treten sie vermehrt in den Bronchien auf.

Atemwegswiderstand erhöht. Der Mechanismus, der zu AHR führt, ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Atemwegsentszündung mit der Entstehung der AHR in Verbindung steht (4).

Neben diesen medikamentös reversiblen Erscheinungen kommt es bei Asthma bronchiale längerfristig zu bleibenden strukturellen Veränderungen in den Atemwegen, dem sogenannten *airway remodeling*. Das *airway remodeling* ist ein Sammelbegriff, der die verschiedenen Umbauprozesse im Lungengewebe bei Asthmatikern umschreibt (5). Zu diesen Prozessen gehört die Verdickung der äußeren und inneren Atemwegswand, deren Ausmaß mit der Schwere der Erkrankung korreliert (6). Studien deckten auf, dass es dabei zu einer dichten Einlagerung von Fibronectin und Kollagenen in die Basalmembran kommt, die schließlich zur Ausweitung der subepithelialen extrazellulären Matrix führt (6–8). *Transforming growth factor beta* (TGF- β) ist ein profibrotisches Zytokin und trägt zur Verdickung bei, indem es Myofibroblasten und Fibroblasten aktiviert und deren Kollagensynthese anregt (9–12). Des Weiteren wurde in vielen Fällen die Fläche der glatten Atemwegsmuskulatur als vergrößert beschrieben (6). Die Untersuchungen fanden sowohl Anzeichen für eine Hypertrophie² als auch einer Hyperplasie³ der glatten Muskelzellen (13, 14). Weitere Veränderungen, die zum *airway remodeling* zählen, sind die Hypertrophie der Epithelzellen und die Becherzellmetaplasie (5, 7).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiopathogenese

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch gestiegen (15). Weltweit leidet jeder Fünfte an einer Allergie. Vor allem in der westlichen Welt sind die Inzidenzen im Kindesalter alarmierend. Auch die Prävalenzen des Asthma bronchiale sind mit ca. 5 % bis zu 30 % der Bevölkerung in Europa erhöht (16). Durch diese hohen Raten sind die Ausgaben des Gesundheitswesens für allergische Erkrankungen enorm. Leider können die ätiologischen Ursachen für diesen Anstieg der Prävalenzen nicht eindeutig bestimmt werden. Einige Thesen lassen sich dennoch durch epidemiologische Studien aufstellen.

Mit der Zunahme der allergischen Erkrankungen haben in den letzten Jahren bakterielle Infektionen durch höhere Hygienestandards abgenommen. Diese gemeinsame Entwicklung prägte die Annahme, dass bestimmte Infektionen einer Entwicklung von allergischen Erkrankungen entgegenwirken können. Die fehlende Immunantwort auf bestimmte

² **Hypertrophie:** Zunahme des Zellvolumens einer Zellart

³ **Hyperplasie:** Zunahme der Zellzahl

bakterielle Erreger könnte die Entwicklung der allergenspezifischen Immunantwort begünstigen (17). Diese Annahme ist auch als Hygienehypothese bekannt (18). Sie wird untermauert durch Studien, die zeigten, dass Kinder in größeren Familien, die mit Haustieren oder auf dem Bauernhof aufwachsen, vor allergischen Erkrankungen geschützt sind (19–21). Im Gegensatz zu bakteriellen Infektionen werden virale Infektionen mit der Entwicklung des Asthmas in Verbindung gebracht. Eine Infektion mit dem Virus RSV (*respiratory syncytial virus*) kann das Risiko erhöhen, später im Leben an Asthma zu erkranken (22), indem die immunologische Toleranz negativ beeinflusst wird (23).

Auch die zunehmende Umweltbelastung durch Luftverschmutzung trägt nachweislich zur Verschlechterung der Asthmasymptome bei. Sie kann aber auch das allergieauslösende Potential der Pollen verstärken (24).

Genetische Faktoren scheinen für die Entwicklung allergischer Erkrankungen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. 1923 prägten Coca und Cooke den Begriff Atopie (25). Das atopische Syndrom bezeichnet heute die genetische Prädisposition, IgE-vermittelte Reaktionen zu entwickeln. Atopiker leiden meist unter mehr als einer allergischen Erkrankung oder haben eine positive Familienanamnese für Atopie.

1.1.2 Immunpathogenese der Allergie und des allergischen Asthmas

Allergien sind Überreaktionen des Immunsystems und können nach Coombs und Gell anhand der zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge differenziert werden (26). Am häufigsten vorkommend ist die klassische Typ-I-Allergie, unter der man eine IgE-vermittelte Sofortreaktion versteht. In der meist symptomfreien Sensibilisierungsphase werden allergenspezifische T-Helfer-2-Zellen (Th2-Zellen)⁴ aktiviert, die durch die Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) die Produktion von spezifischem Immunglobulin-E (IgE)⁵ induzieren. IgE kann nun an den hoch-affinen Rezeptor FcεRI auf Mastzellen⁶ binden. Beim Kontakt mit dem Allergen erfolgt die Kreuzvernetzung von

⁴ **Th2-Zellen** sind eine Untergruppe der T-Helfer-Zellen, die sich durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD4 auszeichnen. Th2-Zellen produzieren bestimmte Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) und beeinflussen dadurch die B-Zellen und weitere Entzündungszellen.

⁵ **IgE** ist ein Antikörper, der durch Isotypen-Wechsel mit Hilfe der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 gebildet wird. Er kommt im Serum kaum vor, aber in gebundener Form auf Mastzellen und Granulozyten.

⁶ **Mastzellen** sind Leukozyten, die im Knochenmark reifen. Sie enthalten Granula, die Entzündungsmediatoren enthalten. Bei einer Aktivierung durch eine Quervernetzung des IgE erfolgt das Freisetzen dieser Botenstoffe (Degranulation).

gebundenem IgE auf den Mastzellen. Hierdurch werden sie aktiviert und es kommt zu einer schlagartigen Degranulation, bei der proinflammatorische Mediatoren wie Histamin, Heparin, Chemokine und Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), freigesetzt werden. Durch die freigesetzten Chemokine werden weitere Entzündungszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, rekrutiert und verstärken die allergische Entzündungsreaktion, welche lokal Gewebeschäden verursachen kann. Betrifft die allergische Überreaktion den gesamten Organismus, bezeichnet man diese als anaphylaktische Reaktion. Im schlimmsten Fall kommt es dabei zur starken Vasodilatation mit Flüssigkeitsverschiebung, die zum lebensbedrohlichen Kreislaufschock führt.

Bei der Sensibilisierung gegen ein inhaliertes Allergen spielt das Atemwegsepithel eine entscheidende Rolle (27). Epithelzellen erkennen durch *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs), die typischerweise in Erregern aber auch in Allergenen enthalten sind. PRRs lösen eine Signalkaskade aus, die an der Initiation einer Entzündungsreaktion beteiligt ist. Zu den PRRs gehören auch die *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs). Lipopolysaccharide (LPS), die z. B. im Hausstaubmilbenextrakt enthalten sind, regen den TLR-4 auf Epithelzellen an. Dieser aktiviert durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B viele proinflammatorische Gene (28). So aktivierte Epithelzellen produzieren Chemokine und Zytokine, wie *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), IL-25 und IL-33, die Dendritische Zellen⁷ (DCs) in die Lunge locken und aktivieren (29–31). Infolge der Aktivierung von PRRs auf Epithelzellen brechen *tight junctions*⁸ auf, wodurch das Eindringen von Pathogenen und Allergenen ermöglicht wird. Die aktivierten DCs nehmen das Allergen auf, prozessieren und präsentieren es. Dabei wird die Toleranz gegenüber dem Allergen durchbrochen. Die aktivierten DCs migrieren in die drainierenden Lymphknoten (LN) und aktivieren dort naive T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR). Je nach Zusammensetzung der von den DCs freigesetzten Zytokine, wird eine Polarisierung der T-Helfer-Zellen induziert (32). In den meisten Fällen resultiert daraus eine Differenzierung von Th2-Zellen, welche darauffolgend den Isotypenwechsel zur IgE-Produktion in B-Zellen hervorrufen.

Kommt es nach der Sensibilisierungsphase zu einem Allergenkontakt, erfolgt die Aktivierung von Mastzellen in den Atemwegen durch die gebildeten Antigen-IgE-Komplexe. Durch

⁷ **Dendritische Zellen** (engl.: *dendritic cells* = DCs) sind in der Lage, eine adaptive Immunantwort zu induzieren. Als „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen nehmen sie fremdartige Strukturen durch Phagozytose auf, prozessieren sie und präsentieren Bruchstücke auf ihrer Oberfläche.

⁸ **tight junctions**: Engverbundene Zonen zwischen Epithelzellen bestehend aus einem Membran-Protein-Komplex. Stränge dieses Protein-Komplexes umgürten die Zellen vollständig und bilden eine undurchlässige Barriere.

Degranulation werden Entzündungsmediatoren (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine) ausgeschüttet, die zur Exazerbation führen. Diese Sofortreaktion wird wenige Sekunden nach der Inhalation des Allergens herbeigeführt. DCs nehmen das Allergen in der Lunge auf und präsentieren es gegenüber den Th2-Zellen. Im Lymphknoten erfolgt daraufhin die Vermehrung der spezifischen T-Zellen, welche durch die persistierende Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten in die Lunge gelockt werden. Weitere Entzündungszellen, vor allem eosinophile Granulozyten, wandern in die Lunge ein. Es kommt zur Spätreaktion nach dem Allergenkontakt. Parallel zu dieser Entzündung werden im Lymphknoten T-Gedächtnis-Zellen gebildet. Kommt es nach Abklingen der Entzündung erneut zum Allergenkontakt, wird durch die T-Gedächtnis-Zellen die Entzündung rapide wieder eingeleitet (33).

1.1.3 T-Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung

1.1.3.1 T-Helfer-Zellen

Bei der allergischen Atemwegsentzündung spielen die Th2-Zellen eine entscheidende Rolle (34, 35). Für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th2-Zellen sind das Zytokin IL-4 und die Transkriptionsfaktoren GATA3⁹ sowie *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6)¹⁰ entscheidend (36, 37). Bei Inhalation von Allergenen werden Th2-Zellen in die Atemwege gelockt, proliferieren und produzieren die Effektorzytokine IL-4, IL-5, und IL-13 (38). Diese Th2-Zytokine führen in der allergischen Atemwegsentzündung verschiedene Funktionen aus. IL-4 und IL-13 regen die IgE-Synthese in B-Zellen an. Darüber hinaus fördert IL-4 in einer autokrinen Schleife die Proliferation der Th2-Zellen und unterstützt die Mastzellhomöostase. Das Zytokin IL-13 hat einen direkten, verstärkenden Effekt auf die Mukusproduktion und die AHR (39). IL-5 induziert die Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen und fördert weiterhin deren Aktivierung und Rekrutierung (40).

Th1-Zellen stellen eine weitere Untergruppe der T-Helfer-Zellen dar und zeichnen sich durch die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) aus. Für die Differenzierung der Th1-Zellen ist das proinflammatorische Zytokin IL-12 sowie der Transkriptionsfaktor T-box 21 (T-bet) essentiell. Th1-Zellen können durch die T-bet-abhängige Induktion von IFN- γ Th2-Zellen inhibieren,

⁹ **GATA3** ist ein Mitglied der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnet an „GATA“-DNA-Sequenzen zu binden.

¹⁰ **STAT6** ist STAT-Familie von Transkriptionsfaktoren. Es bringt die Wirkung von IL-4 zur Geltung und beeinflusst dadurch die Th2-Antwort.

indem die Genexpression des *il-4*-Gens unterdrückt wird (41, 42). Th2-Zellen können wiederum durch das regulatorische Zytokin IL-10 die Th1-Antwort unterdrücken (43–45). Durch diese gegenseitige Regulation wurde angenommen, dass ein Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen für die Immunhomöostase entscheidend ist. Dieser Hypothese zufolge wurde postuliert, dass die Th2-vermittelte allergische Atemwegentzündung im allergischen Asthma durch eine zu schwache Gegenreaktion der Th1-Zellen nicht genügend unterdrückt wird. Eine Stärkung der Th1-Antwort würde demzufolge diese Balance wieder ausgleichen. Dieses Th1/Th2-Paradigma ist jedoch umstritten. Studien im Mausmodell konnten zeigen, dass Th1-Zellen zur Sensibilisierung und zur Atemwegentzündung beitragen können, statt sie zu supprimieren (46, 47).

Seit der Entdeckung neuer T-Helfer-Zellpopulationen wurde gezeigt, dass weitere T-Zellpopulationen an der Atemwegentzündung beteiligt sind (33, 48). Wie kürzlich gezeigt, können Th9-Zellen ebenfalls zur Mukusproduktion und dem Influx eosinophiler Granulozyten in der allergischen Atemwegentzündung im Mausmodell beitragen (49, 50). Sie zeichnen sich durch die Produktion des Leitzytokins IL-9 aus (51, 52). Th9-Zellen differenzieren unter Einfluss von IL-4 und TGF- β und exprimieren die Transkriptionsfaktoren *Interferon regulating factor 4* (IRF4) (49) und PU.1 (53). Die Rolle der Th9-Zellen im Asthma in humanen Individuen ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht (54).

Th17-Zellen bilden eine weitere T-Zellpopulation, die durch ihre Produktion des Zytokins IL-17A aus der IL-17-Familie charakterisiert sind. Für ihre Differenzierung sind die Transkriptionsfaktoren *RAR-related orphan receptor γ* (ROR γ t) und STAT3 essentiell. IL-17A ist in den Atemwegen von Asthmatikern erhöht (55, 56). Die Rolle der Th17-Zellen in der allergischen Entzündung ist jedoch bisher nicht adäquat aufgeklärt. Einige Studien weisen darauf hin, dass sie zu AHR und zum *airway remodeling* im chronischen Asthma sowie zur Resistenz gegen Glukokortikoide beitragen (57, 58).

1.1.3.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind wichtige Gegenspieler der Effektorzellen in der allergischen Entzündung, da sie diese in ihrer Proliferation, Differenzierung und Funktion inhibieren oder funktionell inaktivieren (Anergie) können (59). Es werden natürliche, im Thymus gereifte, Tregs (nTregs) von induzierten Tregs (iTregs), die in der Peripherie entstehen, unterschieden (60).

1.1.3.2.1 Natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs)

nTregs verlassen den Thymus im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen im gereiften Zustand. Sie tragen den Transkriptionsfaktor *forkhead box protein P3* (FoxP3), der durch das Gen *foxp3* codiert wird und die Entwicklung und Funktion dieser Zellen reguliert (61). Mäuse, die eine Mutation im diesem Gen besitzen, haben einen „*scurfy*“-Phänotyp, der zur Ausbildung starker Autoimmunreaktionen führt (62). Studien zeigten, dass hauptsächlich jene T-Zellen das FoxP3-Protein aufweisen, die die Oberflächenmarker CD4 und CD25¹¹ tragen. Die Expression des *foxp3*-Gens ist ein zuverlässiger Marker für murine nTregs. Zur Charakterisierung humaner nTregs wird zusätzlich die niedrige Expression des IL-7-Rezeptors (CD127) hinzugezogen.

nTregs supprimieren, indem sie mit der Zielzelle einen Zell-Zell-Kontakt aufbauen und über Rezeptor-Ligand-Verbindungen suppressive Moleküle wie cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) oder Granzyme B in die Zelle schleusen. Dabei wird das cAMP durch einen Proteintransfer über *gap junctions*¹² von nTreg-Zellen in hohen Konzentrationen zu den Empfängerzellen überführt (63). cAMP inhibiert die *il-2*-Genexpression in CD4⁺ T-Effektorzellen und ist ein Inhibitor des T-Zellwachstums, der Differenzierung und der Proliferation. Darüber hinaus übt das von den T-Effektorzellen sezernierte, IL-2 einen parakrinen Effekt auf nTregs aus und steigert deren Proliferation und Suppressionskapazität (64).

1.1.3.2.2 Induzierte (adaptive) regulatorische T-Zellen

Im Gegensatz zu nTregs entwickeln sich iTregs außerhalb des Thymus aus naiven T-Zellen. Diese heterogene Gruppe besteht aus FoxP3⁺ Tregs und FoxP3⁻ Tregs (65, 66). FoxP3⁻ Tregs zeichnen sich durch die Ausschüttung von toleranzinduzierenden Zytokinen wie TGF- β und IL-10 aus, durch welche iTregs ohne Zellkontakt eine Hemmung der Immunantwort vermitteln können.

TGF- β ist ein multifunktionelles Protein, das vor allem die Zellproliferation, -aktivierung und -differenzierung vieler Zellen durch autokrine oder parakrine Effekte beeinflusst. TGF- β wird von vielen Geweben und Immunzellen produziert und in seiner inaktiven Form ausgeschüttet. Die aktive Form entsteht nach enzymatischer Abspaltung des LTBP- (*latent TGF-beta binding protein*) und des LAP- (*latency associated peptide*) Komplexes. TGF- β kann Apoptose induzieren, spielt eine entscheidende Rolle im Zellzyklus und blockiert die

¹¹ **CD25** ist der α -Baustein des hoch-affinen IL-2-Rezeptors. Er befindet sich auf aktivierten T-Zellen.

¹² **gap junctions**: Zell-Zell-Kanäle

Aktivierung von Lymphozyten und Monozyten. Auch bei der Induktion von FoxP3⁺ T-Zellen ist TGF- β beteiligt (67, 68). T-Zellen, die hauptsächlich TGF- β produzieren, werden als Th3-Zellen bezeichnet und haben suppressive Eigenschaften (69). Th3-Zellen sind vor allem bei der Entstehung der oralen Toleranz gegenüber Antigenen von Bedeutung (70, 71).

IL-10 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das von vielen verschiedenen Immunzellen produziert wird und pleiotrope Effekte ausübt. IL-10 besitzt potente anti-inflammatorische Eigenschaften, indem es die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-1 aus aktivierten Makrophagen hemmt. Diese Funktionen werden durch den IL-10-Rezeptor (IL-10R) auf den Zielzellen vermittelt (72). Bindet IL-10 an den Rezeptor, werden Januskinase 1 (Jak1) und Tyrosinkinase 2 (Tyk2) aktiviert. Durch die Aktivierung der Jak1 wird STAT3 homodimerisiert und anschließend wird es in den Nucleus transloziert, um dort als Transkriptionsfaktor Gene zu regulieren. Weiterhin führt STAT3 zur Produktion von SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling-3*), welches als negativer Regulator auf den IL-10-Signalweg fungiert und die Produktion von IL-1 und TNF- α in Monozyten reduziert. Ein weiterer wichtiger Signalweg des IL-10 ist die Inhibition des p38/MAPK- (*Mitogen-activated Protein-Kinase*) Signalwegs, durch welchen die antiinflammatorische Wirkung des IL-10 induziert wird.

T-Zellen, die sich durch eine hohe IL-10-Produktion auszeichnen, bezeichnet man als Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) (73). Sie werden in Gegenwart von hohen Dosen eines Antigens (74, 75) durch tolerogene IL-10-produzierende DCs differenziert (76). Tr1-Zellen können zwar über CTLA-4, *programmed cell death 1* (PD1) und den ICOS-ICOSL-Signalweg Effekte ausüben, jedoch wirken sie hauptsächlich durch IL-10 ohne Zellkontakt (77, 78). IL-10-seziernde Tr1-Zellen können zur Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 angeregt werden (79, 80) und ebenfalls Effektorzytokine produzieren (81). Somit ist die Unterscheidung dieser Treg-Subpopulationen eine herausfordernde Aufgabe.

1.1.3.2.3 Regulatorische T-Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung

Die Fähigkeit regulatorischer T-Zellen, schädliche Immunantworten zu supprimieren, suggeriert, dass bei einer Allergie eine Dysfunktion dieser Toleranzmechanismen vorliegt. Bei Asthma-Patienten konnte, entsprechend dieser Annahme, eine verminderte Expression von FoxP3 in Tregs und eine abgeschwächte Funktion dieser Tregs festgestellt werden (82, 83).

Darüber hinaus ist auch die Frequenz IL-10-produzierender Tr1-Zellen im Blut von Allergikern im Vergleich zu gesunden Individuen vermindert (77). Tr1-Zellen dominieren in

gesunden Individuen die spezifische T-Zell-Antwort auf Umweltstoffe. Im Gegensatz dazu sind es bei Allergikern spezifische Th2-Zellen, die auf das Allergen reagieren. Somit scheint bei allergischen Patienten die Balance zwischen Toleranz-vermittelnden Treg-Zellen und allergieauslösenden Th2-Zellen gestört. Im Mausmodell konnte dieser Effekt durch den Transfer von Tregs aufgehoben werden und wirkte sich mildernd auf die Asthma-Symptome aus (84–86).

1.1.4 Asthma-Phänotypen

Das Asthma bronchiale ist eine heterogene Erkrankung, bei der zwischen der allergischen (atopischen) und der intrinsischen (nicht-atopischen) Form unterschieden wird (87). Individuen mit allergischem Asthma erkranken meist schon in der Kindheit und erleiden Exazerbationen infolge eines Kontakts mit dem Allergen. Im Blut von Patienten mit allergischem Asthma sind hohe Titer von spezifischem IgE gegen Allergene nachweisbar.

Das Intrinsische Asthma entwickelt sich in einem späteren Lebensalter und wird nicht mit einer Allergie in Zusammenhang gebracht, da es nicht von Allergenen, sondern von Auslösern wie Medikamenten (z.B. Aspirin), Umweltfaktoren, virale Infektionen oder Zigarettenrauch ausgelöst werden kann. Jedoch ist eine Auftrennung in diese zwei Asthmaformen oft erschwert, denn eine Th2-vermittelte Entzündung liegt auch bei Patienten vor, die dem nicht-atopischen Asthma zugeordnet werden (34, 88). Weitere Asthma-Phänotypen können durch die Analyse der Entzündungszellen bestimmt werden. Eine eosinophile Entzündung ist bei Atopikern nachweisbar, während nicht-atopisches Asthma meist mit einer neutrophilen Entzündung verknüpft ist. Die Abwesenheit eines nachweisbaren Entzündungsprozesses stuft man als „paucigranulozytisches“ Asthma ein (89). Während der Influx von Eosinophilen mit einer Th2-Antwort erklärt werden kann, wird das neutrophile Asthma mit der Aktivierung von Th1- oder Th17-Zellen begründet. Die Pathogenese dieses Phänotyps ist jedoch bisher nicht ausreichend verstanden.

Aktuelle Studien befassen sich mit der Einteilung von Asthmapatienten anhand ihrer Symptome, dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns, dem Vorhandensein von Eosinophilen und Übergewicht. Eine aktuelle Analyse ergab fünf verschiedene *Cluster* von Asthmaerkrankten (89, 90). Das Verständnis über die einzelnen Asthmaphänotypen und deren Ursachen soll in Zukunft die Entwicklung individualisierter, erfolgreicher und phänotypenspezifischer Therapien verbessern.

1.2 Therapie allergischer Erkrankungen und des Asthmas

Das derzeitige Ziel der Therapie allergischer Erkrankungen besteht darin, dass betroffene Individuen frei von Symptomen sind. Für die Prophylaxe allergischer Reaktionen steht die Allergenkarenz im Vordergrund. Kommt es jedoch zur allergischen Reaktion, soll die frühestmögliche Behandlung der Exazerbationen erfolgen.

1.2.1 Pharmakotherapien

1.2.1.1 Antiallergika

Für die Behandlung allergischer Reaktionen stehen Antiallergika in Form von Tabletten, Nasensprays, Augentropfen etc. zur Verfügung. Hauptsächlich werden H1-Antihistaminika und Mastzellstabilisatoren eingesetzt.

H1-Antihistaminika inhibieren die Wirkung des Botenstoffs Histamin durch die Blockade des H1-Histamin-Rezeptors. Histamin wird von Mastzellen freigesetzt und ist als Gewebshormon bei immunologischen Prozessen an der Entzündungsreaktion und dem Anschwellen des Gewebes beteiligt.

Die **Mastzellstabilisatoren** verhindern durch die Hemmung des Chlorid-Ionen-Influx in aktivierten Mastzellen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (91). Mastzellstabilisatoren werden prophylaktisch bei allergischen Reaktionen eingesetzt. Ihre Wirkung setzt allerdings erst zwei bis vier Wochen nach Therapiebeginn ein.

1.2.1.2 Therapie des Asthma bronchiale

Die Pharmakotherapie des Asthma bronchiale erfolgt nach einem Stufenplan, der auf einer Klassifizierung fünf verschiedener Schweregrade des Asthmas beruht (92). Die Einteilung in die einzelnen Stufen richtet sich nach der Häufigkeit der Symptome, dem Bedarf der Akutmedikation und der körperlichen Beeinträchtigung. Für jeden Schweregrad ist als Akuttherapeutikum ein inhalatives rasch wirkendes β 2-Sympathomimetikum (RABA) indiziert. **β 2-Sympathomimetika** (Bronchodilatoren) stimulieren den β 2-Rezeptor des sympathischen Nervensystems, wodurch die glatte Muskulatur in den Atemwegen relaxiert wird. Sie führen somit zur Erschlaffung der Bronchialmuskulatur und Erweiterung der Bronchien. Kurzwirksame Stoffe (RABA) werden als Notfallmedikament (*Reliever*) während einer Asthmaattacke eingesetzt, während langwirksame β 2-Sympathomimetika bei schwerem Asthma zum Einsatz kommen.

Inhalative **Glukokortikoide** sind durch ihre entzündungshemmende Wirkung als Langzeittherapeutika (*Controller*) vorgesehen. Synthetische Glukokortikoide sind von Kortikosteroiden (Steroidhormone der Nebennierenrinde) abstammende Arzneistoffe und beeinflussen den Stoffwechsel, den Wasser- und Elektrolythaushalt, Herz-Kreislauf und das Nervensystem. Sie wirken ebenfalls immunsuppressiv und entzündungshemmend. Die entzündungshemmende Wirkung von Glukokortikoiden wird durch zytosolische Glukokortikoid-Rezeptoren vermittelt, welche zu einer verstärkten Produktion des antiinflammatorischen Lipokortin und zur Supression spezifischer Transkriptionsfaktoren wie *activator protein 1* (AP-1) oder NF κ B führen (93). Glukokortikoide werden aufgrund ihrer starken entzündungshemmenden Wirkung bei vielen inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt. Bei allergischen Reaktionen und Asthma kommen sie meist topisch zur Anwendung. Als Controller sind Glukokortikoide in der Asthmatherapie unersetzlich, denn sie sind das effektivste Mittel, um gesetzte Therapieziele zu erreichen (94, 95).

Eine weitere Gruppe der Asthmatherapeutika sind die **Leukotrienantagonisten**, welche an den Leukotrien-Rezeptor 4 im Bronchialtrakt binden. Dort blockieren sie die Wirkung der proinflammatorischen Leukotriene, die bei der Atemwegsentzündung und der AHR mitwirken. Leukotrienantagonisten werden zur Anfallsprophylaxe bei leichtem bis mittelschwerem Asthma bronchiale eingesetzt. Sie können die Asthmasymptomatik nachweislich verbessern, sind aber in ihrer Wirkung den Glukokortikoiden unterlegen (96).

Der therapeutische Einsatz von monoklonalen Antikörpern hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Durch eine Antikörper-Therapie ist es möglich, das Immunsystem des Patienten spezifisch auf ein Molekül oder eine Zelle auszurichten. Der Antikörper **Omalizumab** (Xolair[®]) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das IgE. Er wird zur Behandlung des schwer kontrollierbaren Asthma bronchiale oder bei allergischer Rhinitis eingesetzt. Omalizumab bindet an die Bindestelle des IgE-Antikörpers mit dem Rezeptor und verhindert das Kreuzvernetzen des gebundenen IgE auf Basophilen und Mastzellen (97). Gleichzeitig reduziert er die Serumkonzentration des freien IgE, die Zahl der Eosinophilen im Blut und die Expression des IgE-Rezeptors Fc ϵ RI (98, 99).

In vielen klinischen und präklinischen Studien wird derzeit versucht, die allergische Entzündung durch eine spezifische Blockade von proinflammatorischen Zytokinen zu bekämpfen. Die Blockade des IL-4 und oder IL-13 soll die Wirkung auf den Isotypenswitch zu IgE und die Differenzierung der Th2-Zellen verhindern (100). In den Studien mit einem Antikörper gegen IL-4 und löslichem IL-4-Rezeptor konnten jedoch keine signifikanten Verbesserungen für Asthma-Patienten festgestellt werden (101, 102). Zur Reduktion der eosinophilen Atemwegsentzündung wurde die Blockade von IL-5 intensiv untersucht (103). Obwohl eine Abnahme der Eosinophilenzahl nach Gabe eines Antikörpers gegen IL-5

detektiert wurde, wirkte sich die Behandlung jedoch kaum auf die weiteren Asthmasymptome aus (104).

Weitere Zytokine und Zielzellen wie IL-9, IL-17, IL-25 oder TSLP werden in präklinischen Studien untersucht. Mit den Fortschritten in der Immunologie und Biotechnologie wird in Zukunft die Entwicklung von spezifischen Biologika zu einem wichtigen Teil der Allergie- und Asthma-Forschung.

1.2.2 Die allergenspezifische Immuntherapie

Die allergenspezifische Immuntherapie (SIT), auch Hyposensibilisierung genannt, vermittelt durch Verabreichung ansteigender Dosen des sensibilisierenden Allergens eine allmähliche Herabsetzung der Sensitivität gegenüber dem Allergen. 1911 wurden die ersten Berichte über Injektionen mit Allergenextrakten bei allergischen Patienten von Leonard Noon und John Freeman veröffentlicht (105, 106). Noon verabreichte Pollenallergikern in regelmäßigen Abständen einen wässrigen Pollenextrakt in aufsteigender Dosierung. Der Erfolg dieser Therapie bestätigte sich im konjunktivalen Provokationstest durch die Abnahme der Intensität der allergischen Reaktion. Seither wird die SIT als Therapiemaßnahme angewandt und stellt für IgE-vermittelten Typ-I-Allergien im Gegensatz zu Pharmakotherapien die einzige kausale Therapie dar (107). Das Ziel der SIT ist die Veränderung der Immunantwort gegenüber dem Allergen, die in einer Langzeit-Toleranz resultiert, welche sogar nach Absetzen der Therapie anhält (108). Besonders gut etabliert ist sie bei der allergischen Rhinitis, der Insektengiftallergie, der Tierhaarallergie und dem leichtem allergischen Asthma.

Bei der konventionellen subkutanen Form der SIT (SCIT) erfolgen die Injektionen nach einem festen Therapieschema, beginnend mit geringen Allergendosen. Die Allergendosen werden in der darauffolgenden Phase kontinuierlich gesteigert, bis ein Dosisplateau erreicht ist. In größeren Zeitabständen wird anschließend die Erhaltungsdosis zur Aufrechterhaltung der Toleranzinduktion über drei bis fünf Jahre verabreicht. Diese langwierige Dauer der Therapie ist für den Langzeiteffekt der Therapie unerlässlich (109). Bei Insektengiftallergien wird teilweise eine lebenslange Therapie empfohlen. Die SIT verbessert die Lebensqualität der behandelten Patienten durch Reduktion des Medikamentenverbrauchs und der Symptome (110, 111). Darüber hinaus wirkt die SIT präventiv der Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung von bronchialer Hyperreagibilität bei allergischer Rhinitis entgegen (112, 113) und verhindert Neusensibilisierungen (114).

Die SIT birgt neben ihren suppressiven Effekten allerdings auch Risiken. Die am meisten gefürchtete Komplikation ist der anaphylaktische Schock nach Verabreichung des

Allergenextraktes. Aber auch lokale Reaktionen in Form von Schwellungen und Juckreiz sind möglich. Zur Verbesserung der Sicherheit und der Compliance der Patienten wurden verschiedene Weiterentwicklungen der SIT eingeführt. Neben der subkutanen Form (SCIT) wird seit einigen Jahren auch die sublinguale Form der SIT (SLIT) eingesetzt, welche nach Beurteilung der deutschen allergologischen Fachgesellschaften (DGAKI, ÄDA) jedoch aufgrund der bisherigen Datenlage nicht als gleichwertig zur SCIT angesehen wird. Grund dafür sind die mangelnden Evidenzen für Langzeiteffekte und für die Prävention im Kindesalter (115).

Auch in Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass SIT die Entwicklung der Atemwegsentzündung und AHR entgegenwirkt (116–119). In den meisten Studien wurde die SIT vor der eigentlichen Atemwegsentzündung eingesetzt. Die Effekte von SIT in einer bereits vorhandenen Entzündung und auf die strukturellen Veränderungen in den Atemwegen sind bisher jedoch noch unzureichend verstanden (120).

1.2.2.1 Suppressionsmechanismen der SIT

SIT induziert Toleranz gegenüber dem Allergen, dabei werden multiple, zelluläre und molekulare Immunantworten in Gang gesetzt. Die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen sind jedoch nicht vollständig geklärt. Durch klinische Studien konnten bereits mögliche Initiatoren der Toleranzentwicklung identifiziert werden.

1.2.2.1.1 Blockierende Antikörper

Die Rolle der allergenspezifischen Immunglobuline bei der SIT wurde bereits 1935 serologisch untersucht (121). Jedoch war das IgE bis zum Jahr 1966 nicht bekannt (122), so dass die Verminderung von IgE durch SIT erst wesentlich später entdeckt wurde. Durch die SIT kommt es zum Anstieg von verschiedener spezifischer Immunglobuline im Blut (123). Dieser Anstieg wurde als protektiver Effekt der SIT postuliert. Besonders spezifische IgG₄-Antikörper, können das Allergen abfangen, bevor es an IgE-beladene Mastzellen oder basophile Granulozyten bindet und eine Kreuzvernetzung der FcεRI und Aktivierung dieser Zellen verursacht (124). Zusätzlich wirkt die Aktivierung des niedrigaffinen IgGR (FcγRBII) inhibierend auf die Mastzellaktivierung und die IgE-Produktion in B-Zellen (125, 126). Doch die Beziehung zwischen der Induktion spezifischer Antikörper und der Wirkung der SIT wird weiterhin kontrovers diskutiert (127–129).

1.2.2.1.2 Gegenregulation durch Th1-Zellen

Ein weiterer Mechanismus der SIT wurde durch die Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses zugunsten der Th1-Antwort postuliert (130). Th1-Zellen und Th2-Zellen regulieren sich gegenseitig (44, 131). Th1-Zellen sind somit auch in der Lage die IgE-Synthese zu unterdrücken (132). Daher wurde die These aufgestellt, dass durch SIT diese Regulationsmechanismen der Th1-Zellen verstärkt werden und die allergievermittelnde Th2-Antwort unterdrückt wird (133–135). Ein Anstieg von IFN- γ bzw. Th1-Zellen in therapierten Allergikern bekräftigte diese Ansicht (136–138). Auch die Expression des Th1-Transkriptionsfaktors T-bet ist nach SIT erhöht (139). Neben Th1-Zellen sind jedoch weitere T-Zellen an den Suppressionsprozessen bei der SIT beteiligt. Die Bedeutung der verstärkten Th1-Antwort nach SIT wurde bisher nicht ausreichend aufgeklärt.

1.2.2.2 Aktivierung regulatorischer T-Zellen

Tregs können die Entwicklung allergenspezifischer T-Zell-Antworten inhibieren und spielen deshalb eine wichtige Rolle in der Reaktion gesunder Individuen auf potentielle Allergene. Tregs supprimieren auch die Effekte von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, die an der allergischen Entzündung beteiligt sind. Verschiedene Zellpopulationen werden als Tregs bezeichnet. (Siehe 1.1.3.2) Eine Expansion der Foxp3⁺ Tregs wurde in der Peripherie und lokal nach SIT nachgewiesen (102, 140–142).

Auch das Zytokin IL-10 spielt in der SIT eine Rolle (143–145). Schon nach sieben Tagen ist bei therapierten Allergikern ein Anstieg von IL-10 nachweisbar (143). Tr1-Zellen sind induzierte Tregs und zeichnen sich durch die Produktion von IL-10 aus (73). Eine erhöhte Frequenz allergenspezifischer Tr1-Zellen sind im Blut therapierter Allergiker nach SIT oder nach hohen Allergendosen von Insektengift nachweisbar (74, 146). Welche Auswirkung die Aktivierung der unterschiedlichen Treg-Populationen auf die Effektivität der SIT hat und wie Treg-Zellen zusammenwirken, ist bisher allerdings kaum beschrieben.

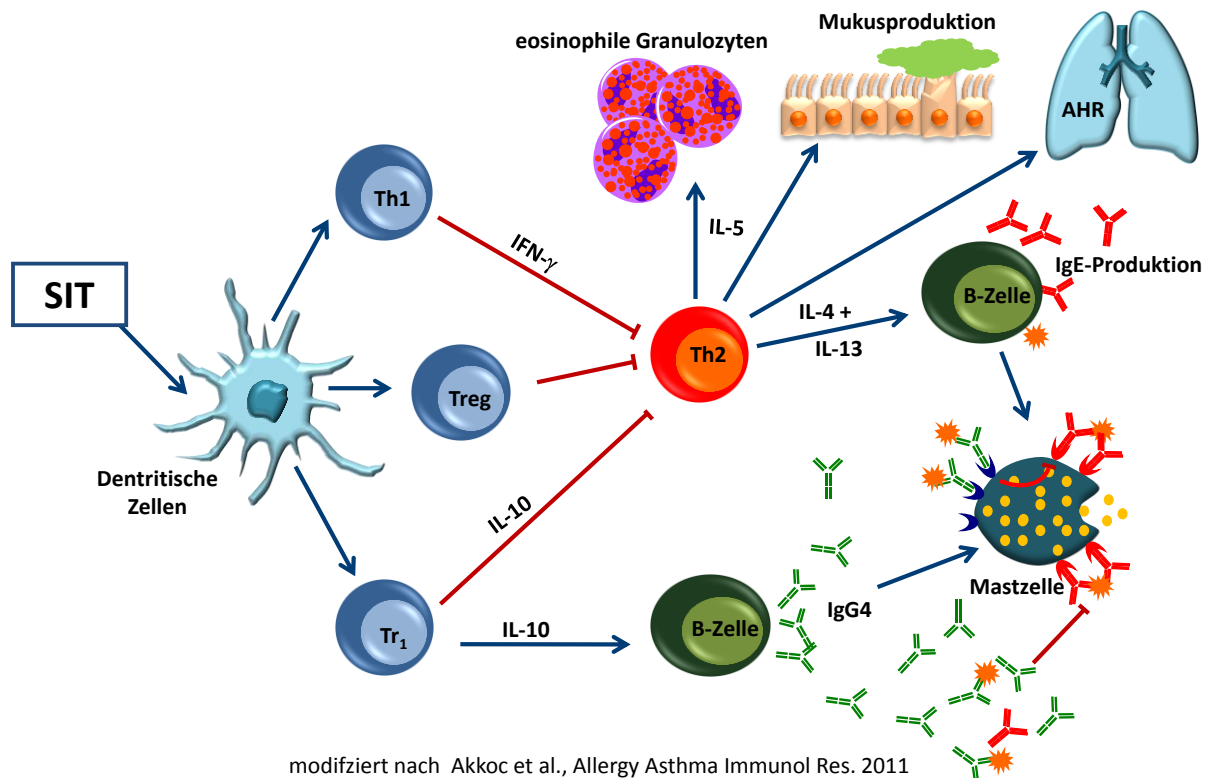


Abbildung 1: Übersichtsschema über mögliche Mechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie

Das Allergen wird nach Verabreichen des Allergenextraktes von regionalen Dendritischen Zellen aufgenommen, welche eine Induktion von Th1-Zellen, Tr1-Zellen und Tregs induzieren. Durch verschiedene suppressive Faktoren (IFN- γ , IL-10), die von diesen Zellen ausgeschieden werden, wird die Th2-vermittelte allergische Entzündung unterdrückt. Die Produktion der Th2-Zytokine wird dadurch verringert, so dass die Differenzierung und Aktivität von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie mukosproduzierenden Becherzellen gehemmt wird. Die allergische Reaktion wird unterdrückt.

AHR = Atemwegshypereagibilität, SIT = allergenspezifische Immuntherapie

1.2.2.2.1 Weitere Mechanismen

Neben den FoxP3⁺ und FoxP3⁻ CD4⁺ Tregs sind weitere regulatorische Zellpopulationen bekannt. Im Blut von therapierten Allergikern konnten regulatorische CD8⁺ FoxP3⁺ Zellen, die IL-10 und Granzyme B¹³ produzieren, nachgewiesen werden (147). Auch CD4⁻CD8⁻ doppeltnegative T-Zellen, regulatorische B-Zellen (Bregs) oder regulatorische NK-Zellen

¹³ **Granzyme B** ist eine spezifische Serinprotease, die an der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität beteiligt ist.

können spezifische Immunantworten in Maus und Mensch inhibieren. Sie sind jedoch nach SIT noch nicht identifiziert worden (148–150).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die SIT nimmt bei der Therapie von allergischen Erkrankungen eine besondere Bedeutung ein, denn sie kann als einzige kausale Therapie den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen.

Die Immunantworten, die nach SIT induziert werden, sind deshalb von besonderem Interesse für die Forschung. Diese zellulären Suppressionsmechanismen beinhalten die Aktivierung von spezifischen T-Zellen, die als Zielzellen bei der Entwicklung moderner Therapien fungieren. Die Identifikation der effektiven Mechanismen, die zu einem Erfolg der Therapie führen, ist deshalb von entscheidender Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein therapeutisches Mausmodell für chronisches Asthma zu entwickeln, das die Situation nach SIT im Menschen nachahmt. In diesem Modell sollten die suppressiven Effekte der SIT nachgewiesen und untersucht werden. Die nachgewiesenen T-Zell-Antworten sollten in weiteren Mausmodellen analysiert und durch gezielte Manipulation *in vivo* die Auswirkung auf die Toleranzinduktion in der SIT untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller/Vertrieb
Ausgießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek USA
Autoklav	3150 EL	Tuttnauer, USA
Tubus für BAL-Gewinnung	18g	Buxco
Einbettstation	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek USA
Digitalfeinwaage	Cubis Analysenwaage	Satorius, Göttingen
Dispenser	HandyStep	Brand, Wertheim
Durchflusszytometer	FACS LSRII	BD, Heidelberg
Ganzkörperplethysmograph	Invasivplethysmograph	Buxco Electronics
Infrarotlampe		Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel
Inkubator	CO ₂ Incubator	Sanyo, Wood Dale USA
Kaltlichtlampe	KL 1500	Schott, Mainz
Kühlplatte	MPS/C	SLEE, Mainz
Magnetrührer	IKAMAG®RH	IKA®-Werke GmbH&Co. KG Staufen
Mehrkanalpipetten	12-Kanal	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Mikroskop mit Kamera	Olympus BX 40 Colorview	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten-Wascheinheit	Nunc-Immuno-Wash 12	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mikrowelle		Bauknecht
NanoDrop UV-Vis Spectrometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

Gerät	Modell	Hersteller
Rotationsmikrotom	Thermo Scientific HM	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	ErgoOne Einkanalpipetten 2.5, 10, 20, 200, 1000 max.	Starlab, Hamburg
pH-Meter	pH 100 VWR	VWR, Darmstadt
Mikroskop	Keyenze BZ8000	Biozero, Osaka
Präparierbesteck	Feine Schere, Splitterpinzette, Gefäßschere mit Knopf, anatomische Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Schüttler	VF2	IKA®-Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Spectralphotometer	Anthos Lucy	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Sterilbank	Tecnoflow	Integra Biosciences, Ruhberg
Trockenschrank	T6030	Haraeus, Hanau
Wärmeplatte	MST	SLEE, Mainz
Zellzählgerät	Casy Cell Counter	Schärfe System

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Labor- und Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Abdichtungsfolie	Parafilm N	Nationalcan, Chicago
Deckglas	24x24 mm	Menzel, Saarbrücken
Deckglas	24x32 mm	Menzel, Saarbrücken
Einmalspritzen	Omnican 1 mL	Braun, Melsungen
Kanüle 0,4x12 mm	Sterican	Braun, Melsungen
Kanüle 0,9x40 mm	Sterican	Braun, Melsungen
Mikrotiterplatte, 96-Loch	96 Vertiefungen, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Objektträger, Mattrand		Menzel, Braunschweig
Objektträger, beschichtet	Polylysin Slides	Menzel, Braunschweig
Petrischale, 60mm		Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 mL)		Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, (15mL; 50 mL)		Greiner, Frickenhausen
Rundboden-Polystyrol-Röhrchen, 0,5 mL		BD, Heidelberg
Rundboden-Polystyrol-Röhrchen, 5 mL	Falcon	BD, Heidelberg
Skalpell	Feather disposable scalpel	Pfm medical, Köln
Spritzen, 1 mL	Injekt 1 mL	Braun, Melsungen
Spritzen, 10 mL	Discardit II	BD, Heidelberg
Zellkulturplatte, (24-; 48-; 96-Loch)		Greiner, Frickenhausen
Zellsieb (40 und 70 µm Maschenweite)		BD, Heidelberg

2.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 3: Puffer

Puffer	Anwendung	Zusammensetzung/Hersteller
ACK-Lysepuffer	Lyse von Erythrozyten	0,15 M Ammoniumchlorid 0,1 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure in Aqua dest. pH 7,2-7,4
EDTA-Puffer	Auffangflüssigkeit bei Blutentnahmen	30 mM EDTA 0,01 % NaN ₃ in PBS 1x
ELISA-Blockpuffer	Blockierung freier Bindungsstellen	5 % FCS in PBS
ELISA-Carbonat-Beschichtungspuffer	Beschichtung von Mikrotiter-Platten mit Primäantikörpern	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	Beschichtung von Mikrotiter-Platten mit Primäantikörpern	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
ELISA-Stopplösung	1M Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
ELISA-Substratlösung	Enzym-vermittelte Farb-reaktion	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Waschpuffer	Auswaschen der ELISA-Platten	PBS Dulbecco (9,55 g/l) 10 L Aqua dest. 5 ml Tween
Gey'scher Lysepuffer	Lyse von Erythrozyten	10 mM Kaliumhydrogencarbonat 155 mM Ammoniumchlorid 100 µM Ethylendiamintetraessigsäure
HBSS (Hanks balanced salt solution)	Zellpräparation der Lymphknoten	Gibco, life technologies, Karlsruhe
PBS, 1x	Bronchoalveoläre Lavage, Zellwaschung,	Gibco, life technologies, Karlsruhe
Waschpuffer bei Färbungen für die Durchflusszytometrie	Puffer für Färbung und Waschen bei Durchflusszytometrischen Analysen	PBS 1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Natriumazid

Tabelle 4: Medien

Medium	Anwendung	Zusammensetzung/ Hersteller
Testmedium 10% FCS	Zellkultur	IMDM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Natriumpyruvat
IMDM (Iscoves Modified Dulbeccos Medium)	Zellkultur	Gibco, life technologies, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Enzym / Einsatz	Hersteller
Kollagenase Typ IA (aus <i>Clostridium histolyticum</i>) Aktivität chargenabhängig, → zur Lungenzellpräparation	Sigma, Steinheim
Streptavidin–Meerrettich-Peroxidase → Nachweisreaktion von ELISA	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.5 Antikörper für Zellkultur, *in vivo*-Behandlung und Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Antikörper für Zellkultur

Antikörperspezifität/Epitop	Klon	Hersteller
mCD3 (murines CD3)	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg
mCD28	37.51	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 7: Antikörper zur Behandlung

Antikörperspezifität/Epitop	Hersteller
mCD25 (Klon PC61)	BD Biosciences, Heidelberg
mIL-10R	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper-spezifität/ Epitop	Klon	Fluorochrom	Isotyp	Hersteller
mCD3	145-2C11	FITC	Hamster IgG1	BD Bioscience, Heidelberg
mCD4	RM4-5	PE-Cy7	Ratte IgG2b	Biolegend, San Diego, USA
mCD25	PC61	Alexa 488, PE	Ratte IgG1, λ	BD Biosciences, Heidelberg
mCD16/32	2 4G2	purified	Ratte IgG2a, λ	eBioscience, Frankfurt
mFoxP3	3G3	APC	Maus IgG1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
mIFN- γ	XMG 1.2	FITC, APC	Ratte IgG1, κ	eBioscience, Frankfurt
mIL-5	TRFK5	PE	Ratte IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
mIL-10	JES5-16E3	PE, APC	Ratte IgG2b, κ	BD Biosciences, Heidelberg
mIL-17A	TC11- 18H10	PE	Ratte IgG1, κ	Biolegend, San Diego, USA
DO11.10 TZR	KJ1-26	PE, FITC	Maus IgG2a, κ	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 9: Antikörper (-Sets) für ELISA

Antikörper	Klon/Set	Hersteller
Anti-mIgG1 , Biotin-konjugiert, aus Ratte	A85-1, monoklonaler Antikörper	BD, Heidelberg
Anti-mIgG2a , Biotin-konjugiert, aus Ratte	R19-5, monoklonaler Antikörper	BD, Heidelberg
Anti-mIgE , Biotin-konjugiert, aus Ratte	R35-118, monoklonaler Antikörper	BD, Heidelberg
IL-4	Mouse IL-4 ELISA Set	BD, Heidelberg
IL-5	Mouse IL-5 ELISA Set	BD, Heidelberg
IL-13	Mouse IL-13 DuoSet	R&D, Wiesbaden
IL-17A	Mouse IL-17A DuoSet	R&D, Wiesbaden
IL-22	Mouse IL-22 Construction-Kit	Antigenix America,

2.1.6 Histologie

Tabelle 10: Reagenzien für immunhistochemische Färbungen

Antikörperspezifität/Epitop	Klon/Produktname	Hersteller
Anti-α-smooth-muscle actin , polyklonal, aus Kaninchen	Ab5694	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Rabbit-IgG		Thermo
Detektionssystem ABC-Methode mit AP (Alkalische Phosphatase)	Vectastain ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame
Detektionssystem ABC-Methode mit HRP (Horseradish-Peroxidase)	Vectastain <i>Elite</i> ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame
Fast Red , magentafarbenes Substrat für AP	Vector Red	Vector Laboratories, Burlingame
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) braunes Substrat für HRP	ImmPACT DAB	Vector Laboratories, Burlingame

Tabelle 11: Reagenzien für Histologische Färbungen

Reagenz	Verwendung	Hersteller
Entellan	Eindecken der Objektträger	Merck, Darmstadt
Eosin	Bestandteil der H&E Färbung	Merck, Darmstadt
Hämacolor Schnellfärbung	Färbung der Zytospins	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Bestandteil der H&E Färbung	Merck, Darmstadt
Liquid-Barrierenmarker		Roth, Karlsruhe

Reagenz	Verwendung	Hersteller
Perjodsäure	PAS-Reaktion	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	Bestandteil der Sirius Red Färbung	
Roti-Histofix	Gewebefixierung	Roth, Karlsruhe
Schiffsreagenz (PAS)	PAS-Reaktion	Merck, Darmstadt
Sirius Red (Direkt Rot)		Aldrich Chemicals, Deisenhofen
SO₂-Wasser 200ml Aqua dest.	PAS-Reaktion	Bestandteile: Merck, Darmstadt

2.1.7 Mausstämme

Für die Experimente wurden weibliche Mäuse im Alter von 6-12 Wochen eingesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierexperimente erfolgten streng nach den aktuellen, institutionellen Richtlinien und entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz.

Tabelle 12: Mausstämme

Mausstamm	Abkürzung	Beschreibung	Herkunft
BALB/c		Wildtyp	Zentrale Versuchstiereinrichtung, Universität Mainz
BALB/c T-bet^{-/-}	T-bet ^{-/-}	Defizienz des Th1-Transkriptionsfaktors T-bet (Tbox21)	Zur Verfügung gestellt von Dr. L. Glimcher, Harvard School of Public Health
BALB/c DEREГ	DEREG ¹⁴	Besitz eines BAC ¹⁵ -Transgen, das unter der Kontrolle des <i>FoxP3</i> Genlocus einen DTR ¹⁶ und ein eGFP ¹⁷ exprimiert.	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Tim Sparwasser, Hannover
BALB/c-Tg(DO11.10)	DO11.10	Transgen für den spezifischen TZR ¹⁸ für OVA-Peptid	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
BALB/c Tg(DO11.10) RAG^{-/-}	DO11.10 RAG ^{-/-}	Transgen für den spezifischen TZR für OVA-Peptid und RAG2-Defizienz bzw. Lymphozytendefizienz	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie der Joh. Gutenberg-Universität Mainz

¹⁴ **DEREG**: *Depletion of regulatory T cells*

¹⁵ **BAC**: *bacterial artificial chromosome*

¹⁶ **DTR**: Diphtherietoxin-Rezeptor

¹⁷ **eGFP**: *enhanced green fluorescent protein*

¹⁸ **TZR**: T-Zell-Rezeptor

2.1.8 Software

Tabelle 13: Verwendete Programme

Programme	Hersteller	Anwendung
Olympus Soft Imaging	Olympus	Aufnahme und Auswertungen von histologischen Färbungen
Adap	Anthos	Messung der ELISA
Diva	BD Biosciences, Heidelberg	Einstellung des FACS-Gerätes und Aufnahme der Daten
FlowJo	Treestar	Auswertung und Darstellung der FACS-Daten
Prism	Graphpad	Statistische Analyse und Darstellung von Daten
BZ Analyzer 2.5	Biozero	Aufnahme und Auswertungen auf histologischen Färbungen

2.2 Methoden

2.2.1 Experimentelle Versuchsabläufe

2.2.1.1 Modell des chronischen allergischen Asthmas mit allergenspezifischer Immuntherapie

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Mausmodell des chronischen Asthmas etabliert, in dem eine allergenspezifische Immuntherapie nach entstandener Atemwegsentzündung durchgeführt wurde (Abbildung 2). In diesem Modell erfolgte zur Sensibilisierung eine dreimalige Gabe des OVA/Alum-Komplexes an den Tagen 0, 14 und 21. In der darauffolgenden Provokationsphase wurden wöchentlich zwei intratracheale Gaben von OVA-Lösung oder PBS verabreicht. Diese Behandlung wurde unter Narkose mit Ketamin-/Rompun-Gemisch durchgeführt. Nach vier Wochen Provokation fand die erste Untersuchung statt, bei der der Status der Entzündung und der Atemwegshyperreagibilität (AHR) analysiert wurde. Danach wurde den OVA-sensibilisierten Mäusen in den folgenden drei Wochen parallel zur Provokation mit OVA eine OVA-spezifische Immuntherapie (OVA-IT) in Form von OVA-Lösung 200 µl (5 mg/mL) oder Placebo (PBS-Lösung) dreimal pro Woche subkutan (s.c.) appliziert. Am Tag 70, 48 Stunden nach der letzten Provokation, erfolgten die Messung der AHR, die Entnahme der BAL, der Lunge und der drainierenden Lymphknoten.

Um die Bedeutung des IL-10-Signalwegs in der SIT zu erschließen, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit während des chronischen Modells ein Antikörper gegen den IL-10R (anti-IL-10R) i.p. verabreicht. Dazu erfolgte während der Durchführung der OVA-IT eine zweimalige Gabe des anti-IL-10R oder IgG aus Rattenserum als Kontrolle.

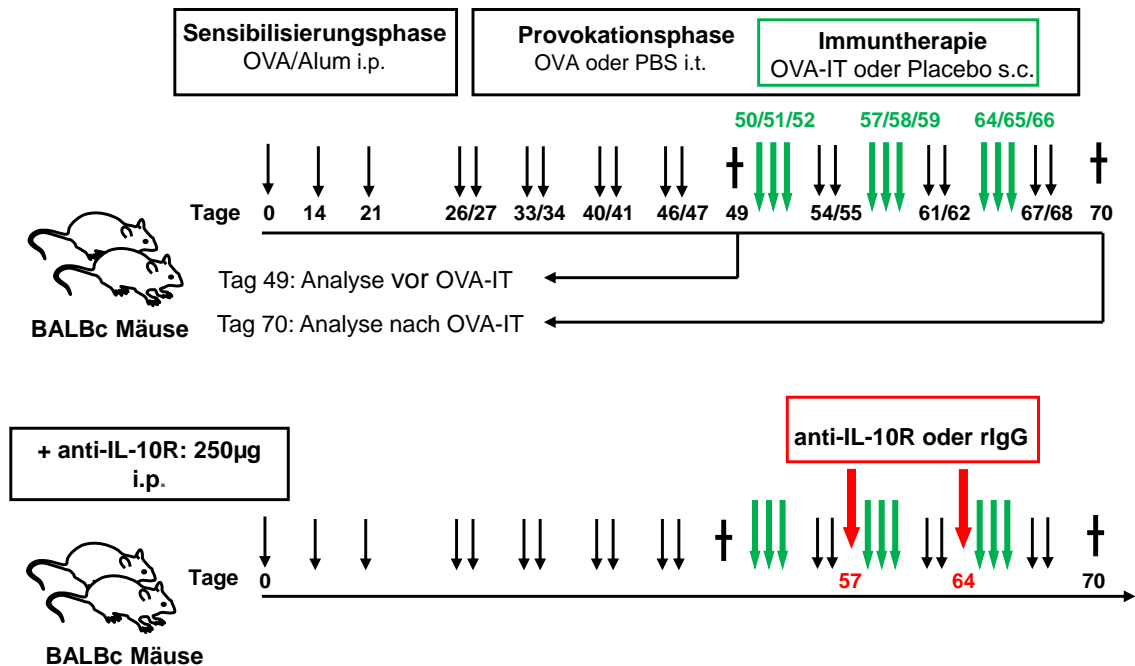


Abbildung 2: Versuchsplan eines chronischen Modells für die allergische Atemwegs-entzündung und begleitender allergenspezifischer Immuntherapie

BALB/c Mäuse wurden mit OVA/Alum-Komplex oder PBS i.p. behandelt. Anschließend erfolgte die Provokation zweimal wöchentlich indem eine OVA-Lösung intratracheal verabreicht wurde. An Tag 49 erfolgte die erste Analyse. Ab Tag 50 wurde OVA-sensibilisierten und –provozierten Tieren dreimal wöchentlich OVA-IT oder PBS s.c. injiziert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde Mäusen zusätzlich zur OVA-IT ein Antikörper gegen den IL-10R oder IgG aus der Ratte i.p. an Tag 57 und 64 verabreicht. An Tag 70 erfolgte die Analyse der AHR, Entnahme von Blut, BAL, Lunge und trachealer Lymphknoten.

s.c. = subkutan, i.p. = intraperitoneal, i.t. = intratracheal

Intratracheale Provokation der Atemwege unter Narkose mit Ketamin/Rompun-Gemisch

Für die intratracheale (i.t.) Behandlung wurden die Mäuse mit einer Gebrauchslösung aus 1 mL Ketamin, 0,4 mL Rompun® (2 % Xylazin, Bayer Animal Health) und 0,5 mL sterilem PBS anästhesiert. Dazu wurden von dieser Lösung 100 µL pro 20 g Körpergewicht i.p. injiziert. Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurde jeweils eine Maus in einer Apparatur fixiert, der Kopf leicht überstreckt und mit einer Kaltlichtlampe unterhalb des Unterkiefers beleuchtet. Das Kaltlicht ermöglichte das Intubieren der Maus mit einer Kristallpipettenspitze, durch die 20 µL einer 2 mg/mL-konzentrierten OVA-Lösung oder PBS verabreicht wurden. Anschließend wurde die Spitze vorsichtig entnommen und die Maus aus der Fixierung befreit. Die Atmung wurde für einige Minuten überwacht und das Aufwachen kontrolliert.

2.2.1.2 Modell des akuten allergischen Asthmas und der allergenspezifischen Immuntherapie in T-bet-Knockout-Mäusen

T-bet-defiziente Mäuse besitzen einen Gen-Knockout für *t-box 21*, dieses Gen enthält die Codierung für den Th1-Transkriptionsfaktor T-bet, welcher für die Differenzierung und IFN- γ -Produktion der Th1-Zellen essentiell ist (151). In T-bet^{-/-} Mäusen wurde ein Modell des allergischen Asthmas mit einer prophylaktischen SIT durchgeführt. Die Sensibilisierung von weiblichen BALB/c (Wildtyp)-Mäusen oder T-bet-defizienten (T-bet^{-/-}) Mäusen erfolgte mit OVA (Calbiochem, Darmstadt), welches mit Alum komplexiert wurde. Der Kontrollgruppe wurde PBS intraperitoneal (i.p.) verabreicht. An den Tagen 19, 21 und 23 wurde jeder Maus der OVA-IT Gruppe 200 μ l OVA-Lösung (5 mg/mL) s.c. in das Nackenfell als Immuntherapie injiziert, während die Kontrollgruppe stattdessen PBS-Lösung erhielt. Um anschließend eine Entzündungsreaktion in den Atemwegen hervorzurufen, wurden OVA-sensibilisierte und PBS-behandelte Tiere mit aerosolisierte OVA-Lösung 30 min. lang behandelt. 48 h nach der letzten Provokation wurde die Lungenfunktionsmessung durchgeführt und BAL, Lunge und Lymphknoten entnommen (Abbildung 4, A S.32).

2.2.1.3 Durchführung eines Mausmodells des akuten allergischen Asthmas und der allergenspezifischen Immuntherapie in DEREK Mäusen

Das oben beschriebene Protokoll des akuten Asthmas und SIT wurde in dieser Arbeit auch mit DEREK Mäusen (*Depletion of regulatory T cells*) durchgeführt. Diese Mäuse tragen ein BAC¹⁹, auf welchem sie unter der Kontrolle eines FoxP3-Promotors einen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und ein *green fluorescent protein* (GFP) exprimieren. Durch die Expression des GFP werden die FoxP3⁺ Zellen auch ohne intrazelluläre Färbung durch grüne Fluoreszenz sichtbar. Infolge der systemischen Gabe von Diphtherietoxin (DT) kann eine Depletion der FoxP3⁺ Tregs erfolgen (152). Das DT ist ein Exotoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, der Erreger der Diphtherie. DT besteht aus einer A- und einer B-Untereinheit. Die B-Kette bindet an den DTR auf der Zelloberfläche, dadurch wird der A-Teil in die Zelle transloziert und entfaltet dort seine hemmende Aktivität auf die Proteinsynthese, so dass die betroffenen Zelle abstirbt. Da die Spezies Maus den DTR

¹⁹ **BAC:** *Bacterial artificial chromosome* ist ein DNA-Konstrukt, das aus einem Plasmid des *Escherichia coli* besteht und als Vektor für größere Genabschnitte genutzt wird.

nicht exprimiert, kommt es in Wildtyp-Mäusen zu keinem Effekt. Die Depletion in DTR-transgenen Mäusen erfolgt deshalb spezifisch (Abbildung 3).

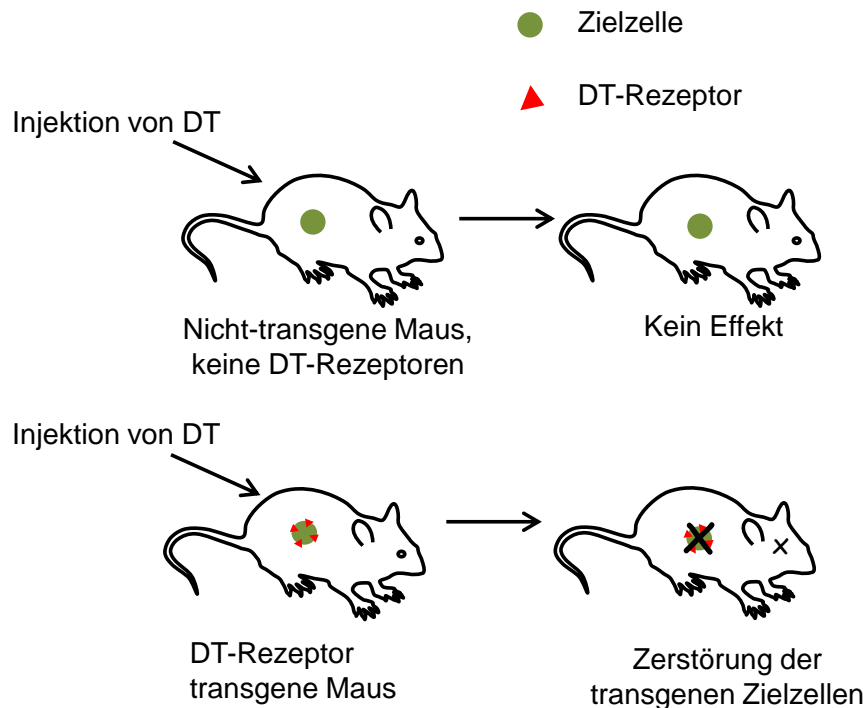


Abbildung 3: Prinzip der gezielten Depletion von Zellen in DT-Rezeptor-transgenen Mäusen

DT = Diphtherie-Toxin

Das DT wurde am Tag vor Verabreichen der ersten OVA-IT i.p. injiziert (0,5 µg/ 20 g Körpergewicht). Vor und nach der ersten DT-Injektion sowie nach der dritten DT-Gabe wurde den Mäusen durch Anritzen der Schwanzvene Blut entnommen. In den Blutproben wurde der Depletionserfolg untersucht. Vor der Verabreichung von DT exprimieren alle CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen auch das GFP, welches im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann.

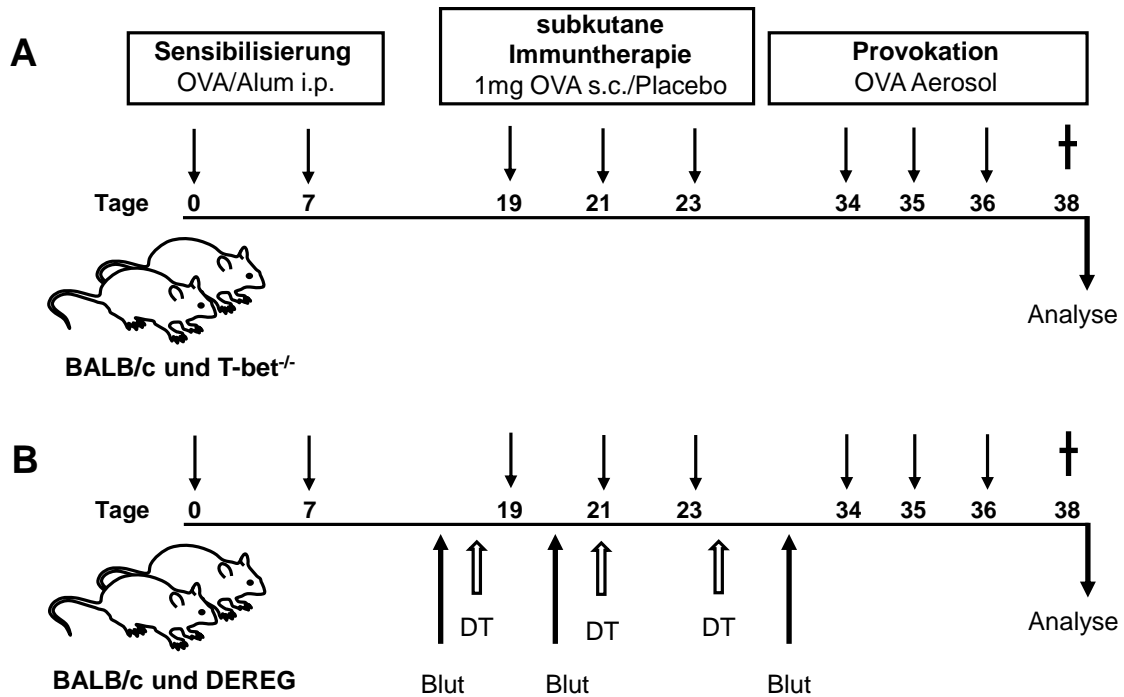


Abbildung 4: Versuchsdurchführung eines prophylaktischen Modells einer allergenspezifischen Immuntherapie.

A, An Tag 0 und 7 wurden BALB/c oder T-bet^{-/-} Mäuse mit OVA/Alum-Komplex oder PBS i.p. behandelt. Anschließend wurde die OVA-spezifische Immuntherapie (OVA-IT) durch dreimalige Gabe von 1 mg OVA oder Placebo (PBS-Lösung) s.c. durchgeführt. An den Tagen 34-36 erfolgte die Provokation der Atemwege mit nebulisierter OVA-Lösung. 48 h nach der letzten Provokation erfolgt die Messung der Lungenfunktion, die Entnahme von BAL, Lunge, tLN und Blut. **B**, Der in A beschriebene Versuchsablauf wurde ebenfalls in DEREK Mäusen durchgeführt. Vor Durchführung der OVA-IT wurde den Mäusen Blut entnommen und zusätzlich DT i.p. verabreicht. 48 h nach der ersten DT Gabe und nach der ersten OVA-IT wurde erneut Blut entnommen. Mit der zweiten s.c. Injektion der OVA-Lösung wurde die DT-Gabe wiederholt. An Tag 24, nach der dritten s.c. Injektion wurde die dritte DT-Injektion durchgeführt. Vor der Provokation wurde Blut entnommen und die Provokation erfolgte an den Tagen 34, 35 und 36. Die Analyse der AHR und Entnahme der Organe erfolgte wie in A.

DT = Diphtherie-Toxin, s.c. = subkutan, tLN = tracheale Lymphknoten

2.2.1.4 Versuchsdurchführung eines Mausmodells der akuten allergischen Atemwegsentzündung mit allergenspezifischer Immuntherapie in DO11.10-transgenen Mäusen

In einem weiteren Mausmodell wurden DO11.10-transgene Mäuse verwendet. DO11.10 Mäuse tragen homozygot ein Transgen für einen T-Zell-Rezeptor (TZR), der spezifisch für ein MHC-II-präsentiertes Peptid des OVA-Proteins (OVA₃₂₃₋₃₃₉) ist (153). Dieser transgene α/β -TZR wurde erstmalig von Kappler et al. für eine OVA-spezifische T-Zell-Hybridom-Linie (DO11.10) generiert (154). Naive DO11.10 Mäuse haben ca. 90 – 95 % DO11.10-TZR-transgene T-Zellen. Diese T-Zellen können mit dem monoklonalen Antikörper KJ1-26 mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (153).

In DO11.10 Mäusen führt eine Provokation der Atemwege mit OVA zu einer neutrophilen Atemwegsentzündung und einer Erhöhung des Atemwegswiderstandes (155). In dieser Arbeit wurden DO11.10 Mäuse zur Untersuchung der spezifischen T-Zellantwort nach subkutaner Verabreichung von OVA (OVA-IT) in einem Modell der Atemwegsentzündung verwendet.

Des Weiteren wurden DO11.10-transgene Mäuse mit einem zusätzlichen RAG-2 Knockout (DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse) verwendet. Diese Mäuse tragen neben dem OVA-spezifischen TZR-Transgen ein defektes *recombination activating gene 2* (*Rag-2*), das normalerweise für das Enzym RAG-2 codiert. RAG-Enzyme spielen eine wichtige Rolle für die V(D)J-Rekombination, die für die hohe Variabilität der Antikörper und der TZR sorgt. RAG-2-defiziente Mäuse können demzufolge keine funktionsfähigen B- und T-Zellen ausbilden. Deshalb tragen alle CD4⁺ T-Zellen in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen den transgenen TZR. Weiterhin können diese Tiere keine natürlichen Tregs (nTregs) im Thymus entwickeln. In DO11.10 Mäusen ohne den *rag2*-Knockout entstehen nTreg in gleichem Ausmaß wie in Wildtyp-Tieren, da diese einen dualen TZR bilden können, indem sie eine endogene TZR- α -Kette mit der transgenen β -Kette verknüpfen können. Dieser zweite TZR wird neben dem transgenen α/β -TZR exprimiert. Durch die Variabilität der α -Kette können diese T-Zellen auch mit Selbst-Antigen/MHCII-Komplexen im Thymus interagieren und sich zu nTregs entwickeln. Durch das Fehlen der V(D)J-Rekombination in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen entfällt die Möglichkeit einen zweiten TZR mit der endogenen α -Kette zu bilden. T-Zellen mit dem TZR aus transgener α - und β -Kette können diesen Selektionsprozess zu CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs im Thymus nicht durchlaufen (156). Naive DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse weisen daher keine CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs auf.

Für DO11.10 und DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet. Die Mäuse wurden mit 200 μ l OVA-Lösung oder PBS s.c. behandelt. Nach 8 Tagen

erfolgte die dreimalige Provokation mit OVA-Aerosol und 48 h später die Messung der AHR und Entnahme der Organe sowie der BAL (Abbildung 5). Dieses Modell ermöglicht es die OVA-spezifische T-Zellantwort nach SIT zu analysieren.

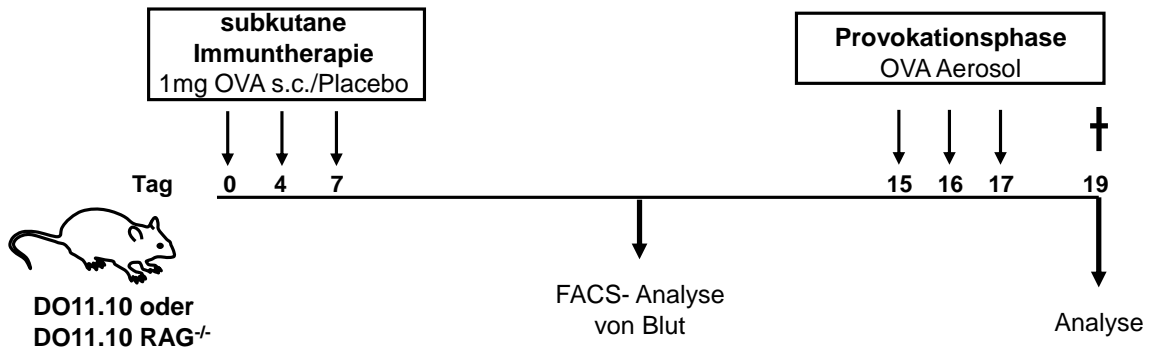


Abbildung 5: Ablauf des Immuntherapiemodells mit OVA-T-Zell-Rezeptor transgenen DO11.10 Mäusen oder DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen.

DO11.10 Mäuse oder DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse wurden an den Tagen 0, 4 und 7 mit 1 mg OVA oder Placebo s.c. behandelt. Vor der inhalativen Provokation wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. An den Tagen 15, 16 und 17 wurden die Mäuse mit vernebelter OVA-Lösung oder PBS provoziert. 48 h nach der letzten Provokation erfolgte die Lungenfunktionsmessung, Durchführung der BAL und Entnahme der Organe.

s.c. = subkutan

2.2.2 Intubieren der Mäuse unter Anästhesie mit Pentobarbital

Am finalen Versuchstag eines Tierexperiments, 48 Stunden nach der letzten OVA- bzw. PBS-Provokation wurde die Lungenfunktion gemessen, die BAL und die Organe entnommen. Dazu ist es nötig, die Mäuse zu intubieren. Es wurden vier Mäuse gleichzeitig durch eine intraperitoneale Gabe Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 75 mg/kg) anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere unter einer Rotlichtlampe warm gehalten und das Eintreten der chirurgischen Toleranz wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes kontrolliert. War kein Reflex mehr sichtbar, wurde das Fell mit Ethanol 70 % benetzt. Danach wurde mit einer chirurgischen Schere die Haut oberhalb Trachea cranial geöffnet, wodurch die Speicheldrüsen (*Glandula sublingualis* und *Gl. submandibularis*) sichtbar wurden. Diese wurden durch stumpfes Präparieren mittels Pinzetten so zur Seite gezogen, so dass die Trachea zu sehen war. Die Trachea wurde anschließend vom Bindegewebe frei präpariert und auf einem Mikrospatel gehalten. Ein chirurgischer Faden wurde unter der Luftröhre durchgezogen und ein schmaler Einschnitt zwischen zwei Knorpelspannen durchgeführt. In diesen Schnitt wurde danach ein Trachealtubus (18 g) appliziert und mit dem chirurgischen Faden befestigt. Über diesen Tubus wurde die noch atmende Maus im Lungenfunktionsmessgerät ventiliert. Weiterhin diente er im späteren Versuchsablauf zur Entnahme der BAL und zur Durchspülung des Lungengewebes bei der Fixierung.

2.2.3 Lungenfunktionsmessung

Die AHR ist ein charakteristisches Merkmal des Asthmas und kann durch eine Lungenfunktionsmessung untersucht werden. Bei Asthmatikern wird neben der Spirometrie auch eine Ganzkörperplethysmographie durchgeführt, welche als wichtiges Diagnoseverfahren in der Pneumologie dient. Hierbei werden die Atemwege des Patienten durch ansteigende Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin (MCh) provoziert. MCh ist ein nichtselektiver Muskarinrezeptor-Agonist im parasympathischen Nervensystem und führt dosisabhängig zur Bronchokonstriktion. Im Tiermodell kann eine Lungenfunktionsmessung nach ähnlichen Prinzipien durchgeführt werden. Die aus der Verengung resultierenden Veränderungen des Drucks und der Atemströmung werden durch einen Ganzkörperplethysmographen gemessen. Es gibt die Möglichkeit, eine invasive oder eine nichtinvasive Messung durchzuführen. Bei einem nichtinvasiven Messsystem werden die Mäuse in abgeschlossene Kammern eines Ganzkörper-Plethysmographen gesetzt. Die Kammern sind durch Schläuche mit einem Vernebler

verbunden, wodurch das aerolisierte Methacholin hineingeleitet wird. Durch Inspiration und Expiration der Tiere wird der Innendruck der Kammer verändert. Auch der Atemstrom der Tiere wird durch einen Transducer ermittelt und die Werte an einen Computer weitergeleitet. Aus den ermittelten Daten wird der sogenannte *enhanced Pause*-(Penh)-Wert ermittelt. Er drückt aus, wie stark sich die Ausatmung der Mäuse bei MCh-induzierter Konstriktion verlängert. Bei dem nichtinvasiven Messverfahren ist eine mehrmalige Analyse eines Tieres möglich. Es kann daher als Verlaufskontrolle bei Langzeitexperimenten eingesetzt werden. Vorteilhaft ist, dass die Mäuse selbstständig atmen, nicht betäubt sind und eine schnelle Durchführung der Messung möglich ist. Jedoch reagiert eine nichtinvasive Apparatur auf Zugluft sehr empfindlich. Durch Bewegung oder Temperaturschwankungen wird die Messung stark beeinflusst. Im Gegensatz zum invasiven Verfahren erfolgt keine direkte Messung der Lungenmechanik, da auch die oberen Bereiche der Atemwege, wie Kehlkopf und Nasenraum den Widerstand beeinflussen (157). Die Invasive Lungenfunktionsmessung ist sensitiver als das nichtinvasive Verfahren. Sie basiert auf physiologischen Prinzipien und gilt als Goldstandard für Lungenfunktionstests in Nagern (158). Durch das Intubieren ist es möglich die Mechanik tieferer Lungenabschnitte zu messen und im Anschluss an die Messung die BAL zu entnehmen. Für dieses Verfahren ist daher eine Anästhesie und Beatmung der Mäuse nötig. Das Messverfahren der invasiven Ganzkörperplethysmographie erfordert bei der Präparation Geschick und ist daher aufwendiger.

2.2.3.1 Durchführung der invasiven Lungenfunktionsmessung

In der vorliegenden Arbeit wurden invasive Lungenfunktionsmessungen mit einem Messgerät der Firma Buxco Electronics durchgeführt. Vor einer Messung wurden die anästhesierten und spontan atmenden Tiere intubiert und über den Trachealtubus mit einer Beatmungspumpe verbunden. Anschließend wurde eine Ösophagusdrucksonde eingeführt, die mit einem Druck-Transducer gekoppelt ist. Im System wurde so die Druckdifferenz zwischen Oesophagus und Trachea im Vergleich zu einer Wassersäule bestimmt. Während der Messung, wurden jeweils 10 µl einer Methacholinlösung (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/ml) mit Hilfe von Verneblern gleichmäßig über die Atemluft pro Tier appliziert. Verschiedene Parameter wie Atemfrequenz, -zugvolumen, -minutenvolumen und transpulmonale Druckdifferenz wurden gemessen und aufgezeichnet. Mit Hilfe der Software (BioSystem XA) wurden aus diesen Werten der Atemmechanik/des Atemzugs

die Dynamische Compliance²⁰ und der Atemwegswiderstand (*Resistance*, R)²¹ berechnet. Der Atemwegswiderstand wurde in cm H₂O x sek/ml angegeben. Dieser Berechnung liegt eine isovolumetrische Methode zugrunde, bei der Veränderung des Ein- und Ausatemdrucks auf ein bestimmtes Volumen bezogen werden. Dazu ist es wichtig, dass das Gerät vor einer Messung auf dieses Volumen (1 mL) kalibriert ist. Die Luftströmung (*Flow*) wurde analog bestimmt und wurde mit Hilfe einer Amplitude von Expirations- und Inspirationsphase berechnet. Die so gewonnenen Daten wurden durch das Programm Biosystem XA berechnet und angegeben. Zur Auswertung der Lungenfunktion wurden die Werte des Atemwegswiderstands (*Resistance*) verwendet und als Mittelwerte pro Gruppe zusammengefasst.

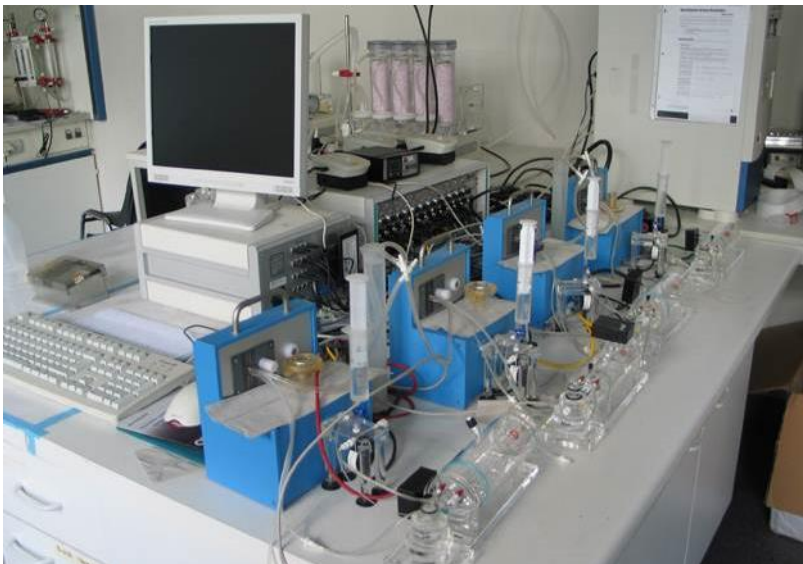


Abbildung 6: Invasives Messgerät zur Messung der Lungenfunktion

2.2.4 Mauspräparation

Im Anschluss an die Messung des Atemwegswiderstandes werden die intubierten Mäuse präpariert. Es wird eine Durchspülung der Atemwege (BAL) durchgeführt und die Lunge und Lymphknoten entnommen.

²⁰ **Dynamische Compliance:** Maß für die Dehnbarkeit der Lunge

²¹ **Atemwegswiderstand:** Der Atemwegswiderstand ist der Widerstand, der durch den Bronchialtrakt auf den Atemstrom bei der Inspiration und Expiration wirkt.

2.2.4.1 Gewinnung und Aufarbeitung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Entnahme der BAL erfolgte nach dem Absterben der Mäuse. Zunächst wurde der Bauchraum geöffnet und mit einer Schere das Zwerchfell perforiert, so dass die Lunge kollabierte. Durch den bereits für die Messung der AHR gelegten Tubus wurde 1 mL kaltes PBS mit einer 1 mL-Spritze über einen Adapter appliziert und ohne Verzögerung langsam wieder aufgezogen. Das Volumen konnte dabei nicht vollständig zurückgewonnen werden, so erhielt man pro Tier 800-900 µL BAL. Diese Flüssigkeit wurde bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt, welches bei -20 °C gelagert wurde. Das restliche Zellsediment wurde in 200 µL PBS aufgenommen, die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.5) und bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Zellen auf Objektträger in einer Cytospin-Zentrifuge. Auf diesen Objektträgern wurden die BAL-Zellen angefärbt, differenziert und gezählt.

2.2.4.2 Gewinnung und Aufarbeitung des Blutes

Nach der Entnahme der BAL erfolgte die Blutung der Maus infolge der Durchtrennung der *Vena cava caudalis*. Das Blut wurde mit einer Spritze aufgezogen, in ein Reaktionsgefäß überführt und zu Serum oder zur Zellsuspension für FACS-Analysen weiterverarbeitet.

Serumgewinnung: Das Blut wurde bei Raumtemperatur eine Stunde stehen gelassen. Es erfolgte die Koagulation, bei sich ein gallertartiges Sediment aus Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin bildete. Das Blutserum wurde dabei abgeschieden. Das Sediment wurde mit einer Pinzette vorsichtig entnommen und verworfen. Anschließend wurde der Überrest bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert und nach Abnehmen des Serums (hellgelber klarer Überstand) bei -20 °C eingefroren.

Aufbereitung des Blutes zur durchflusszytometrischen Analyse: Bei der Entnahme des Blutes wurden 4-5 Tropfen des Blutes in 1 mL EDTA-Puffer überführt und aufgeschüttelt. Die Proben wurden während der Präparation auf Eis gekühlt und anschließend bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit ACK-Puffer in ein 15 mL Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit 10 mL ACK-Puffer aufgefüllt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit PBS gewaschen. Nach einem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in Waschpuffer aufgenommen und bis zur Färbung kühl und dunkel gelagert.

2.2.4.3 Entnahme und Aufarbeitung der Lymphknoten

Nach Entnahme der BAL und des Blutes wurde der Brustkorb vorsichtig mit einer Schere geöffnet und der obere Teil wurde entfernt. Mit einer Pinzette wurden die Lungenflügel zur Seite geschoben und die zervikalen Lymphknoten an der Trachea herauspräpariert. Die entnommenen Lymphknoten wurden in einem Reaktionsgefäß mit HBSS aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Lymphknoten wurden im weiteren Verlauf steril mit Glasobjektträgern zerrieben und über ein Zellsieb gegeben. Nach einem Waschschrift mit HBSS wurden die Zellen gezählt und in Testmedium aufgenommen.

2.2.4.4 Entnahme und Bearbeitung der Lunge

Nach der Entnahme der Lymphknoten wurde durch Injektion von ca. 5 mL PBS in den rechten Ventrikel (Herzkammer) die Lunge über den Lungenkreislauf gespült. Anschließend wurde der linke Lungenflügel der Maus mit einem chirurgischen Faden vom Rest der Lunge abgebunden, entfernt und in einem Reaktionsgefäß mit PBS auf Eis gelagert. Der übrige Teil der Lunge wurde mit Histofix über den Trachealtubus aufgebläht, entnommen und in ein Röhrchen mit Histofix überführt. Der linke Lungenflügel wurde im weiteren Verlauf mit Skalpell oder Schere zerkleinert. Die zerkleinerten Lungenteile wurden in ein Röhrchen mit 5 mL Kollagenase-Lösung gegeben und bei 37 °C für 1 h im Wasserbad oder Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Lungenproben mit einer großen Kanüle in eine 10-mL-Spritze aufgezogen, resuspendiert und über ein Zellsieb (80 µm) gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1400 rpm für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Darauf folgte die Lyse der Erythrozyten mit Gey'schem Lysepuffer. Nach zwei Waschschriften mit PBS wurden die Lungenzellen gezählt und in Testmedium aufgenommen.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen in Zellsuspensionen wurde entweder durch Zählung in einer Neubauer-Kammer an einem Mikroskop durchgeführt oder es wurde das Casy® Zellzählgerät verwendet.

Für die Zählung mit der Neubauer-Kammer wurden die Zellen aus einer Suspension mit bekanntem Volumen mit Trypanblau-Lösung in einem bestimmten Verhältnis gemischt.

10 µL des Gemisches wurde unter das Deckblatt einer Neubauer-Kammer überführt und die Anzahl der Zellen in den vier Quadranten ermittelt.

Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Summe der Zellen in 4 Quadranten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}(10^4)$$

Für die Messung der Zellzahl mit dem Zellzählgerät wurden 10 µL der Zellsuspension in ein Röhrchen pipettiert und mit 10 mL Casyton-Flüssigkeit aufgefüllt. Nach mehrfachem Umschütteln wurde das Röhrchen in die Apparatur gestellt. Es erfolgte eine dreimalige Messung der Anzahl der lebenden Zellen in einem definierten Zellgrößenbereich. Der Mittelwert der Messungen wurde angezeigt.

2.2.6 Differenzierung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die morphologische Differenzierung der BAL-Zellen wurde auf H&E gefärbten Zytospins durchgeführt. Diese wurden angefertigt, indem man 100 µL der Zellsuspension in trichterförmige Zentrifugeneinsätze gab. In diese Zentrifugeneinsätze wurden Filterpapiere mit ausgestanztem Loch und Objektträger eingespannt. Durch die Zentrifugation wurden die Zellen kreisförmig auf die Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet und anschließend mit einem Färbeset zunächst fixiert und anschließend mit Eosinlösung und Hämatoxylin gefärbt und mit A. dest abgespült. Nach dem Trocknen wurden die Zytospins mit Deckgläsern und Entelan® eingedeckt.

Die Differenzierung der BAL-Zellen erfolgte durch Betrachtung der Zytospins am Lichtmikroskop. Pro Objektträger wurden 300 Zellen gezählt. Dabei wurden die Zellen in Alveolar-Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten unterschieden und deren absolute Anteile anschließend mit Microsoft Office Excel® berechnet.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels ELISA

Die Konzentrationen der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum und der Zytokine in der BAL oder Kulturüberständen wurden mittels spezifischer ELISA (*Enzyme-linked immuno sorbent assay*) bestimmt. Die eingesetzten ELISA wurden nach dem

„Sandwichprinzip“ durchgeführt. Dabei erfolgte im ersten Schritt die Beschichtung von 96-well-Mikrotiterplatten mit dem Antigen der nachzuweisenden Antikörper (OVA) oder einem Primärantikörper gegen das gesuchte Zytokin. Nach dem Inkubieren über Nacht bei 4 °C wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen, ausgeklopft und durch Zugabe von Blockpuffer wurden freie Bindungsstellen gesättigt. Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Platte gewaschen und die Proben sowie ein bekannter Standard in einer Verdünnungsreihe nach einem Belegungsplan in die Vertiefungen pipettiert. Nach 2 h wurde die Platte geleert, gewaschen und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgte das Auftragen einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase, die an den biotinylierten Antikörper bindet. Nach 30 min Inkubationszeit und Waschen wurde die Substratlösung, bestehend aus TMB (Tetramethylbenzidin) und H₂O₂ in Citratpuffer, zugegeben. Es entstand nach Inkubation im Dunkeln eine blaue Färbung. Bei Eintreten einer bestimmten Farbintensität wurde die Enzymreaktion mit 2N-Schwefelsäure abgestoppt und es erfolgte ein Farbumschlag nach gelb. Die Absorption der gelben Färbung korreliert mit der Konzentration des Proteins. Aus der photometrischen Messung wurde durch Einstellen einer Eichgeraden die Konzentration der Zytokine mit Hilfe von Tabellenkalkulation berechnet. Die Titer der OVA-spezifischen Serumimmunglobuline wurden durch lineare Regression berechnet. Dabei wurde basierend auf einer Verdünnungsreihe der Probe der theoretische Verdünnungsgrad zu einer optischen Dichte von 0,2 ermittelt.

2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS®)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen oder Partikel anhand ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenz detektiert und differenziert werden. Die Durchflusszytometrie bedient sich monochromatischer Lasertechnik und misst parallel die Streuung und Emission einzelner Zellen oder Partikel im laminaren Flüssigkeitsstrom. Dieser durch eine Trägerflüssigkeit erzeugte Flüssigkeitsstrom trifft in hohem Tempo in der Durchflusszelle auf gebündelte Licht- bzw. Laserstrahlen. Zur Detektion der Streuung und Emission der einzeln durchfließenden Zellen ist ein optisches System bestehend aus Spiegeln und Filtern nachgeschaltet, das die einzelnen Signale einer Zelle auftrennt, weiterleitet oder spiegelt und den spezifischen Detektoren zuführt. Das emittierte Licht wird durch die Detektoren verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt und anschließend in digitale Daten konvertiert. Durch einen Computer, der mit dem Durchflusszytometer verbunden ist, werden die Daten mit Hilfe einer Software aufgenommen und ausgewertet.

Das Streulicht einer Zelle unterteilt sich in Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward scatter*) und wird nach Passieren des blauen Laserlichts gemessen. Vorwärtsstreulicht ist das Licht, das in einem flachen Winkel ($<10^\circ$) aus der Zelle austritt (Beugung). Es ist abhängig von der Größe der Zelle. Das Licht, das in der Zelle gebrochen wird und im rechten Winkel aus der Zelle austritt, ist das Seitwärtsstreulicht, welches als Maß für die Granularität der Zelle gilt. Die Gegenüberstellung von Seitwärtsstreulicht und Vorwärtsstreulicht ermöglicht die grobe Einteilung der Zellen anhand ihrer Größe und Granularität. Um weitere Parameter zu untersuchen, können die Zellen mit fluoreszierenden Stoffen behandelt oder mit Antikörpern markiert werden, an die Fluoreszenzmoleküle (Fluorochrome) gekoppelt sind. Die Fluorochrome werden durch das monochromatische Laserlicht angeregt, absorbieren und emittieren Licht. Je mehr Fluorochrommoleküle an eine Zelle gebunden haben, desto stärker ist die Intensität des emittierten Lichts. Verschiedene Fluorochrome mit unterschiedlicher Stärke und Stabilität können für durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt werden. Die Auswahl der Fluorochrome ist abhängig vom Gerätetyp und der Probenvorbereitung. Bei der Markierung (Färbung) mit Antikörpern ist dabei auch das Epitop entscheidend.

In dieser Arbeit wurde das Gerät FACS LSRII® (BD Biosciences, Heidelberg) zur Analyse von Zellsuspensionen benutzt. Dieses Gerät verfügt über vier Laser mit den Wellenlängen 355 nm (UV Laser), 405 nm (violetter Laser), 488 nm (blauer Laser) und 633 nm (roter Laser). Dies ermöglicht die Untersuchung von bis zu 18 Parametern während einer Messung. Wird eine Probe parallel mit unterschiedlich fluoreszierenden Stoffen behandelt, muss dabei beachtet werden, dass die jeweiligen Emissionsspektren dieser Stoffe sich gegenseitig überlagern können. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, kann eine Kompensation dieser Überlappung erfolgen. Die gewonnenen Daten lassen sich in Histogrammen oder *Dot blots* darstellen. Zur Messung, Kompensation und Auswertung wurde die Software DIVA® (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Die weitere Auswertung und Erstellung der *Dot blots* erfolgte mit dem Programm Flowjo (Tree Star, Inc. Ashland, USA).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die präparierten Zellsuspensionen aus Blut, Lunge, Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurden die Zellproben eines Tiers auf eine Konzentration von 1×10^7 /mL mit Testmedium eingestellt. 1×10^6 Zellen (50 μ L) wurden für eine Färbung benutzt und in 5 mL Rundbodenröhrchen, 96-well-Spitzbodenplatten oder in 96-well-Rundbodenplatten überführt.

2.2.8.1 Stimulation für Färbungen intrazellulärer Zytokine

Um die Zellsuspensionen für eine intrazelluläre FACS-Analyse auf Zytokine vorzubereiten, wurden diese in einer 96-well-Rundbodenplatten (50 µL/well) stimuliert. Dazu wurden sie mit 50 µL eines doppelkonzentrierten Stimulationsmediums versetzt, das Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)²² (100ng/mL), Ionomycin²³ (0,5 µM) und Monensin²⁴ (4 µM) in Testmedium mit 10 % FCS-Anteil enthielt. Die Stimulation erfolgte für 4,5 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde zunächst die Oberflächenfärbung der Zellen durchgeführt.

2.2.8.2 Oberflächenfärbung

Durch eine extrazelluläre durchflusszytometrische Analyse lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenmoleküle unterscheiden. Nach dem Waschen der Zellen mit Waschpuffer erfolgte eine Zentrifugation von 2 min bei 1800 rpm und 4 °C. Die Überstände wurden verworfen und zur Blockade freier Fc-Rezeptoren mit dem verdünnten Antikörper gegen CD16/CD32 (1:100) versetzt. Anschließend wurden die Proben vorsichtig mit einem Vortexer resuspendiert und 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde auf die Zellpellets 100 µL eines Gemisches aus verdünnten Antikörpern in der jeweiligen Konzentration (Mastermix) gegeben, resuspendiert und 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die optimale Verdünnung der Antikörper wurde in Vorversuchen ermittelt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln verwahrt. Anschließend erfolgte die Messung oder nach Fixierung die intrazelluläre Färbung.

²² **PMA** ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC), die für die Aktivität von Enzymen und Faktoren der Signalweiterleitung von Bedeutung ist (159). Dadurch beeinflusst die PKC das Zellwachstum und die Zellteilung.

²³ **Ionomycin** ist ein Ionophor aus dem Bakterium *Streptomyces globatus*. Es steigert den intrazellulären Spiegel von Ca²⁺ und erhöht die Produktion von Zytokinen.

²⁴ **Monensin A** ist ein Ionophor aus *Streptomyces cinnamonensis* mit antibiotischen Eigenschaften. Es blockiert den intrazellulären Proteintransport und transportiert monovalente Kationen.

2.2.8.3 Intrazelluläre Färbung auf FoxP3 oder intrazelluläre Zytokine

Durch FACS-Analyse können nicht nur Oberflächenmoleküle der Zellen sondern auch intrazelluläre Proteine und Strukturen erfasst werden. Dazu ist die Permeabilisierung der Zellmembran nötig, so dass die verdünnten Antikörper ins Zellinnere eindringen können. Die Oberflächenfärbung erfolgte wie unter 2.2.8.2 beschrieben. Nach Auswaschen der Oberflächenantikörper erfolgte eine 25-minütige Einwirkzeit mit frisch angesetztem Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer bei 4°C im Dunkeln. Nach zwei Waschsritten mit Permeabilisierungswaschpuffer wurden die verdünnten Antikörper gegen FoxP3 oder Zytokine auf die Zellpellets gegeben und resuspendiert. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurden die Vertiefungen zweimal gewaschen und in Waschpuffer aufgenommen und bis zur Messung im Durchflusszytometer bei 4°C dunkel gelagert.

2.2.9 Histologische Methoden

Mittels histologischer Färbetechniken können mikroskopische Gewebsschnitte auf ihre pathologische Veränderungen und den Grad der Erkrankung hin untersucht werden. In dieser Arbeit wurden histologische Untersuchungen an Lungengeweben durchgeführt, um das Ausmaß der Atemwegsentzündung sowie der strukturellen Gewebsveränderung infolge einer chronischen Entzündung zu untersuchen.

2.2.9.1 Fixierung mit Formalin

Nach Entnahme eines Organs oder Gewebeproben setzen autolytische oder heterolytische Prozesse ein. Deshalb muss das Gewebe unverzüglich frisch verarbeitet oder fixiert werden. Am häufigsten verbreitet ist die Fixation mit Formalin (Histofix[®], physiologische Formaldehyd-Lösung). Formalin macht Gewebe dauerhaft haltbar, da es eine Vernetzung der Proteine bewirkt und somit den enzymatischen Abbau verhindert. Es werden dabei Methylenbrücken oder Brücken per Schiff'sche Basen gebildet, die allerdings auch die Epitope für eine spätere Antikörperbehandlung maskieren können. Eine alternative Fixiermöglichkeit bietet daher die Gefriertechnik.

Die Fixierung der Lungengewebe während der Durchführung dieser Arbeit erfolgte mit Formalin. Vor der Entnahme der Lunge für die histologische Verarbeitung wurde diese durch eine mit Histofix[®] gefüllte 10-mL-Spritze über den in der Trachea eingeführten Tubus gespült, wobei sich das Lungengewebe idealerweise aufblähte. Durch das Aufblähen wird erreicht, dass die Lunge aus dem kollabierten Zustand wieder eine homogene und gespannte Gewebestruktur erhält. Nach dem Spülen wurde die Trachea unterhalb des Tubus mit der Pinzette zusammengedrückt, damit die Flüssigkeit nicht entweichen kann, und die Lunge mit der Schere aus dem Brustkorb gelöst. Die Lungen wurden in Röhrchen mit Histofix gegeben und darin bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2.9.2 Einbetten in Paraffin

Für das Einbetten der Gewebe in lipophilem Paraffin muss vorher das Gewebe entwässert werden. Die Lungengewebe wurden dafür in Eindeckkapseln verbracht und über Nacht in einem Entwässerungsautomaten mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt. Anschließend wurde mit Xylol der Alkohol entfernt. Um gleichmäßige Umhüllung und die Verdrängung des Xylols zu erreichen, wurde das Gewebe mit heißem

Paraffin durchtränkt. In einer Einbettstation wurden die Gewebestücke in ein Gießschälchen verbracht und mit flüssigem Paraffin überschichtet. Die Einbettkassette bildete mit dem Gießschälchen den Paraffinblock. Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke von den Gießschälchen entfernt und im weiteren Verlauf davon Gewebsschnitte angefertigt.

2.2.9.3 Herstellung von Schnittpräparaten

Damit das Paraffinwachs zum Schneiden eine gewisse Festigkeit erreicht, wurden die Blöcke auf der Kühlplatte bei -15 °C gekühlt. Von den Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Der Paraffinblock wurde dazu in eine Haltevorrichtung gespannt und an einem fest eingeschraubten Präzisionsmesser mit Hilfe der Rotationsmechanik vorbeigeführt. Um eine geeignete Schnitttiefe zu erreichen, wurden zunächst 20 µm dicke Schnitte vom Block entfernt. Danach wurde das Mikrotom auf eine Schnittdicke von 3 µm eingestellt. Die Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels aufgefangen und in ein 45 °C warmes Streckbad überführt. Dort wurden sie faltenfrei auf Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden anschließend zur besseren Haftung bei 50 °C für 30 min und anschließend bei 60 °C für 20 min in einem Trockenschrank inkubiert.

2.2.9.4 Entparaffinierung

Nach der Trocknung wurden die Paraffinschnitte mit Xylol entparaffiniert. Durch eine anschließende Alkoholreihe (von 100 %-, 96 %-, 70 %- bis 50 %-igem Ethanol für jeweils 3 Minuten) wurden sie mit Aqua dest. rehydratisiert, damit sie mit wässrigen Färbelösungen bearbeitet werden können.

2.2.9.5 Histologische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Prinzip: Die H&E-Färbung ist die gebräuchlichste Färbung und dient meist als Übersichtsfärbung. Sie beruht auf dem Prinzip der Elektroadsorption. Zellkerne werden durch das Hämatoxylin angefärbt, das sich zum basischen Hämalaun dunkelblau umwandelt. Das Eosin dagegen färbt acidophile Strukturen rot an. In dieser Doktorarbeit wurde diese Färbung zur Einschätzung des inflammatorischen Influx von Immunzellen genutzt.

Durchführung: Nach Entparaffinierung wurde 10 min mit Meyers Hämalaun-Lösung gefärbt und anschließend 10 min in Leitungswasser differenziert. Nach einem Spülvorgang mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 5 min in die angesäuerte Eosin-Färbelösung getaucht. Nach einem weiteren Spülvorgang mit einer aufsteigenden Isopropylalkoholreihe und anschließendem Ethanol wurden die Schnitte mit Xylol behandelt und anschließend eingedeckt.

Analyse: Die Auswertung der H&E-gefärbten Schnitte erfolgte durch eine semiquantitative Einstufung am Mikroskop zunächst bei kleiner Vergrößerung. Wie in Abbildung 7 dargestellt, entspricht die Einstufung (Score) 0 dem Zustand ohne Entzündung. Sehr stark entzündete Lungenschnitte wurden mit Score 4 bewertet.

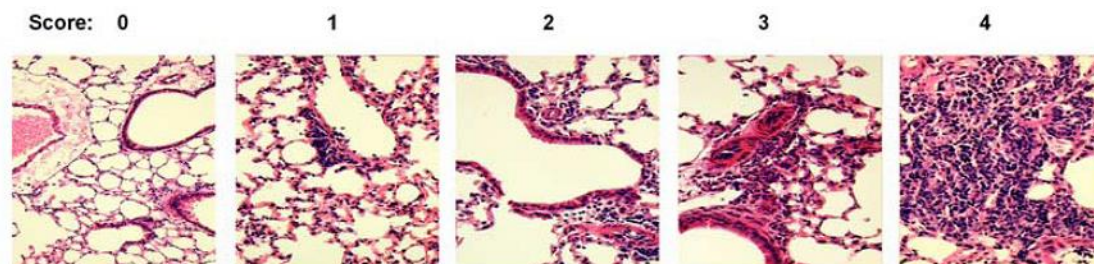


Abbildung 7: Scoring System nach Prof. H. Lehr, Lausanne

Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Prinzip: Die PAS-Reaktion beruht auf dem Nachweis von zwei dichtgelagerten Aldehydgruppen mit Hilfe der farblosen fuchsinschwefligen Säure (Schiffsches Reagenz). Perjodsäure oxidiert zuvor die Diolgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen. Durch Anlagerung des Schiffschen Reagenzes erfolgt eine chromogene Umlagerung und eine magenta- bis pinkfarbene Färbung entsteht. Auch Mucopolysaccharide (Glykosaminoglykane) geben eine positive Reaktion. In der vorliegenden Arbeit diente die PAS-Färbung zur Darstellung von mukusproduzierenden Schleimdrüsen in der Epithelschicht der Atemwege. Diese sogenannten Becherzellen sekretieren Mucopolysaccharid-haltigen Schleim und lagern ihn auf der Oberfläche ab.

Durchführung: Entparaffinierte Schnitte wurden für 10 min mit 2 %iger Perjodsäure versetzt und anschließend kurz mit Aqua dest. gespült. Danach erfolgte die Reaktion mit dem Schiffschen Reagenz für 20 min. Anschließend wurden sie zweimal 1 min lang in SO₂-Wasser getaucht, nach kurzem Spülen wurden eine Färbung mit Hämalaun und das Bläuen in Leitungswasser für 5 min durchgeführt. Zum Entwässern erfolgte die Behandlung mit 100 % Ethanol und Xylol, um danach die Schnitte mit Deckglas und Entellan einzudecken.

Analyse: Die Bewertung der PAS-behandelten Paraffinschnitte erfolgte unter Betrachtung am Mikroskop. Mit Hilfe des Gelbfilters war es möglich, einen besseren Kontrast der PAS-Färbung zu erhalten. Bei einer 400-fachen Vergrößerung wurde durch die Software Olympus Imaging® pro Lungenschnitt an drei zufällig ausgewählten Bronchien die Zahl der in der PAS-Reaktion positiv reagierenden Zellen pro mm der Basalmembran gezählt und anschließend der Mittelwert gebildet.

Sirius-Red-Färbung

Prinzip: *Sirius Red* ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Kollagenfasern werden rot-violett angefärbt, der Hintergrund gelb-orange. Diese Färbung ermöglichte es in dieser Arbeit, die Kollageneinlagerung im Lungengewebe zu evaluieren.

Durchführung: Nach dem Entparaffinieren durch Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurde 5 min mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde 60 min *Sirius-Red*-Lösung gefärbt und danach wurden die Objektträger kurz in Salzsäure eingetaucht. Zum Entwässern erfolgte wieder eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Abschließend wurden die Schnitte luftfrei eingedeckt.

Analyse: Mit Hilfe der *Sirius-Red*-Färbung erfolgte die Analyse der Kollageneinlagerung infolge der chronischen Atemwegsentzündung in den Lungengeweben. Die stark rote Schicht unterhalb der Bronchialmuskulatur hebt die Kollagenfasern hervor. Das umliegende Gewebe wurde dabei nur schwach gefärbt und erscheint orange-gelblich oder rosafarben. Die Kollagenschicht wurde mit Hilfe einer Software (BZ Analyzer, Biozero) ausgemessen. Ausgenommen wurden Bereiche, in denen Blutgefäße angrenzen. Es wurden pro Bronchus zehn Messungen durchgeführt, indem die Kollagenschicht im rechten Winkel zur Tangente an Bronchien mit einem Durchmesser von 150 bis 250 μm mittels Software ermittelt wurde.

2.2.9.6 Immunhistologie

Mit immunhistochemischen Verfahren lassen sich Epitope, die auf definierten Zellen oder Proteinen liegen, spezifisch mit Hilfe von Antikörpern sichtbar machen. In dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Färbung zur Detektion des Aktins der glatten Bronchialmuskulatur, dem α -smooth muscle actin (α -SMA), durchgeführt.

Prinzip und Durchführung: Die entparaffinierten Schnitte wurden im Dampfgarer mit Citratpuffer zur Antigendemaskierung behandelt. Nach dem Abkühlen wurden sie in TRIS-Puffer getaucht und mit Blockpuffer behandelt. Im Anschluss erfolgte das Auftragen des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (abcam 5694) gegen das α -SMA in einer Verdünnung von 1:300. Nach der Inkubation über Nacht und einem Waschschriff wurde die Behandlung mit einem biotinylierter Sekundärantikörper durchgeführt, der nach dem ABC-Verfahren mit einem Enzymkomplex gekoppelt wurde. Als Enzym wurde entweder die Alkalische Phosphatase (AP) oder die *Horseradish peroxidase* (HRP) verwendet.

Diese Enzyme setzten verschiedene Substrate in farbige Substanzen um. In der vorliegenden Arbeit wurde für eine braune Färbung die HRP mit dem Substrat DAB (Diaminobenzidin) verwendet. Die Magentafärbung dagegen wurde durch die Verwendung des Substrates *Fast Red* erreicht. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte mit Hämalaun gefärbt und unter Wasser gebläut. Zum Entwässern erfolgte eine zweimalige Behandlung mit Isopropylalkohol und Xylol.

Analyse: Es wurden pro Bronchus zehn Messungen durchgeführt. Die braun- bzw. magentagefärbte Muskelschicht wurde im rechten Winkel zur Tangente an Bronchien mit einem Durchmesser von 150 bis 250 μm mittels Software (BZ Analyzer, Biozero) gemessen.

2.2.10 Statistische Analyse

Die erhaltenen experimentellen Daten wurden durch Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) statistisch ausgewertet. Signifikanzen wurden durch den studentischen t-Test ermittelt. Die Signifikanz wurde auf p-Werte unter 0,05 festgelegt. Dabei wurde unterteilt in *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$. Für alle Messungen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines chronischen Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung, mit dessen Hilfe die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) analysiert werden kann. Um ein Modell zu schaffen, das die Situation im Patienten widerspiegelt, wurde zunächst ein chronisches Modell der allergischen Atemwegsentzündung durchgeführt und analysiert. Hierzu wurden Mäuse gegenüber dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und anschließend über einen Zeitraum von sieben Wochen zweimal wöchentlich (chronisch) inhalativ mit dem Allergen provoziert. Nach der Entstehung einer chronischen Atemwegsentzündung wurde in einem Teil der Mäuse eine SIT während der chronischen Provokation durchgeführt. Abschließend wurde die allergische Atemwegsentzündung analysiert. Im Gegensatz zu bereits publizierten Arbeiten, in denen eine prophylaktische subkutane, intranasale oder sublinguale Behandlung mit Allergen vor der ersten inhalativen Provokation durchgeführt wurde (116, 117, 160–163), spiegelt dieses Modell die therapeutische Behandlung der SIT wider, wie sie auch im Patienten durchgeführt wird.

3.1 Etablierung einer allergenspezifischen Immuntherapie in einem Modell des chronischen allergischen Asthmas.

3.1.1 Status vor Verabreichung der allergenspezifischen Immuntherapie im Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung

Zur Etablierung eines chronischen Modells des allergischen Asthmas mit SIT wurden weibliche BALB/c Mäuse mit OVA/Alum oder PBS i.p. sensibilisiert und anschließend zweimal wöchentlich mit OVA-Lösung oder PBS i.t. provoziert (Abbildung 2). Um das Ausmaß der Entzündung in der Lunge vor dem Beginn der SIT zu ermitteln, wurden verschiedene Parameter an Tag 49 analysiert. Neben der Lungenfunktionsmessung, mit der die Atemwegshyperreagibilität (AHR) gemessen wird, wurden auch die bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Zellsuspensionen entnommener Organe untersucht. Die AHR ist ein charakteristisches Merkmal für die Erkrankung Asthma. Sie wird nach der Provokation bestimmt und als Anstieg des Atemwegswiderstandes bei inhalativer Provokation mit dem Bronchokonstriktor Methacholin (MCh) ausgedrückt. Der Atemwegswiderstand ist der Strömungswiderstand, den das Lungengewebe auf die Atemluft ausübt. Bei nicht behandelten Mäusen ist der Anstieg des Atemwegswiderstandes nach inhalativer Provokation mit MCh gering. Bei Tieren mit einer

allergischen Atemwegsentzündung ist ein stärkerer Anstieg des Atemwegswiderstandes zu erwarten.

Die BAL ist ein Verfahren, bei dem die Lungen mit physiologischer Lösung gespült werden. Das gewonnene Material kann sowohl auf die zellulären (BAL-Zellen) als auch auf die flüssigen Bestandteile (BALF) hin untersucht werden. Durch Entnahme der Lunge und Lymphknoten kann die Entzündung auch im Gewebe untersucht werden. In einem etablierten Verfahren wurden Zellsuspensionen hergestellt und durchflusszytometrisch untersucht. Ein Teil der Lunge wurde fixiert, in Paraffin eingebettet und histologische Färbungen davon angefertigt.

Als Negativkontrolle wurden PBS-sensibilisierte (d.h. mit PBS i.p. injizierte) und PBS- (PBS/PBS) oder OVA-provozierte (PBS/OVA) Tiere in separaten Gruppen untersucht. Sie wurden mit OVA/Alum-sensibilisierten und OVA-provozierten (OVA/OVA) Mäusen verglichen. Die Messung der AHR an Tag 49 zeigte, dass eine Sensibilisierung und mehrmalige Provokation mit OVA (OVA/OVA) einen erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu den PBS-sensibilisierten, PBS-provozierten (PBS/PBS) oder OVA-provozierten (PBS/OVA) Tieren hervorruft.

Anhand der auf Zytospins übertragenen BAL-Zellen konnte die Zellkomposition im bronchoalveolären Raum eines Versuchstieres durch Differentialzählung bestimmt werden. Die BAL-Zellen OVA-sensibilisierter und -provozierter Tiere enthielten, verglichen mit PBS-sensibilisierten Tieren, erhöhte Zellzahlen an eosinophilen Granulozyten (Abbildung 8). Es herrscht also eine eosinophile Entzündung der Bronchialschleimhaut in diesem Modell vor.

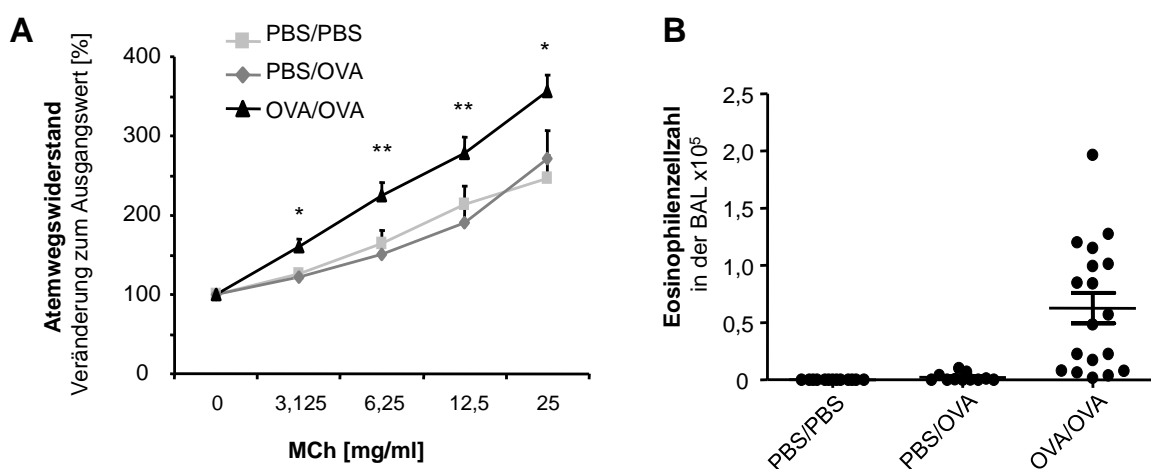


Abbildung 8: Sensibilisierung und mehrfache Provokation der Atemwege mit OVA verstärkt die Atemwegshyperreagibilität und die Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL.

Weibliche BALB/c Mäuse wurden mit OVA/Alum oder PBS sensibilisiert und anschließend mit OVA oder PBS über die Atemwege provoziert. Nach der Provokationsphase zeigte sich eine erhöhte AHR in OVA-sensibilisierten und -provozierten (OVA/OVA) Mäusen im Vergleich zu PBS-sensibilisierten Mäusen (PBS/PBS, PBS/OVA) (**A**). Die Analyse der BAL von OVA/OVA-behandelten Tieren ergab eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten verglichen mit der BAL PBS-sensibilisierter Tiere (**B**). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=11-18). PBS/OVA und OVA/OVA wurden auf signifikante Unterschiede überprüft. *, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

MCh = Methacholin, AHR = Atemwegshyperreagibilität

Um zu überprüfen, ob die chronisch behandelten Wildtypiere systemische Immunantworten nach der Sensibilisierung mit OVA/Alum entwickeln, wurden die Titer der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum durch spezifische ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) bestimmt. Die Untersuchung der Seren der Tiere auf die OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a zeigte, dass die i.p.-Applikation von OVA/Alum und Provokation über vier Wochen zu einer spezifischen humoralen Immunantwort in den Tieren führte. Das OVA-spezifische IgE war erwartungsgemäß nur im Serum von OVA/OVA behandelten Mäusen erhöht, jedoch nicht im Serum von PBS-sensibilisierten Tieren. Des Weiteren waren nach Sensibilisierung auch OVA-spezifisches IgG1 und IgG2a erhöht, während im Serum PBS-sensibilisierter Tiere keine bzw. kaum OVA-spezifische Immunglobuline detektiert wurden.

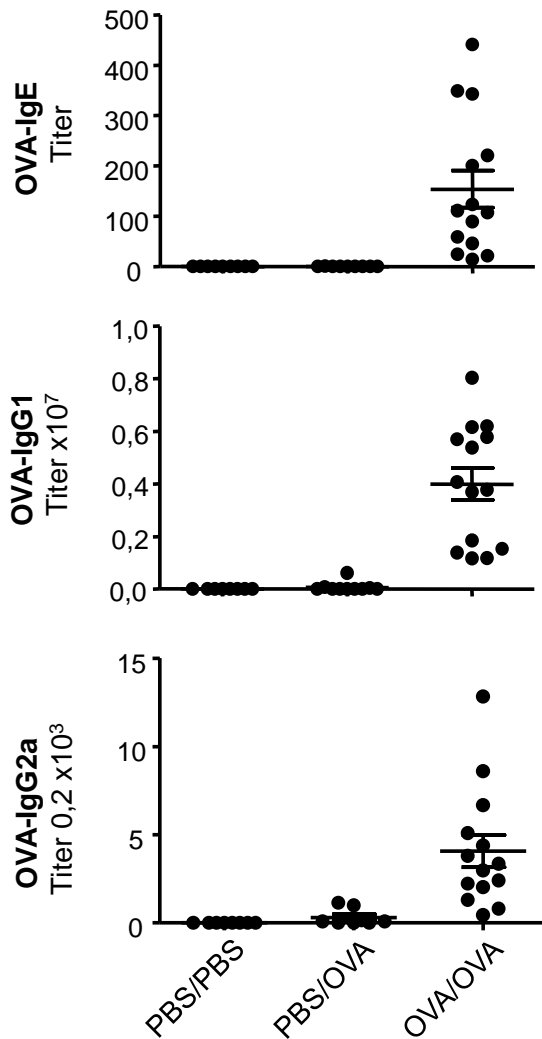


Abbildung 9: Induktion der humoralen Immunantwort gegen das Allergen OVA vor Verabreichung der Immuntherapie. In den Seren der sensibilisierten und provozierten Mäuse ist ein Anstieg der Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a detektierbar.

Aus dem Serum der Mäuse wurden nach dem Abtöten an Tag 49 mittels ELISA die OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a bestimmt. PBS-sensibilisierte Tiere (PBS/PBS, PBS/OVA) wiesen keine wesentliche Erhöhung der Titer auf. Im Serum OVA-sensibilisierter Tiere war ein Anstieg der OVA-spezifischen Immunglobuline zu verzeichnen. Ein Punkt im dargestellten Diagramm entspricht dem Titer aus der Serumprobe eines Tieres. Daten aus drei verschiedenen unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind dargestellt, (n=11-18).

Für die allergische Reaktion sind Th2-Zellen verantwortlich (34). Zum Nachweis der Th2-Zellen in dem Modell wurden Lymphknoten- und Lungenzellen *ex vivo* mittels intrazellulärer FACS-Färbung auf das Th2-Zytokin IL-5 hin untersucht. Mit Antikörpern gegen die T-Zellmarker CD3 und CD4 wurde die Population der T-Helferzellen

eingegrenzt. Das Th2-Zytokin IL-5 wurde intrazellulär markiert. Anhand der Dreifachmarkierung wurde innerhalb der T-Helferzellen die Th2-Population bestimmt. In OVA-sensibilisierten und -provozierten Mäusen konnten erhöhte Frequenzen von CD4⁺ CD3⁺ T-Zellen erfasst werden, die IL-5 produzieren. Diese Ergebnisse wurden durch Analyse der durchflusszytometrischen Daten erhalten, die in Abbildung 10 dargestellt ist.

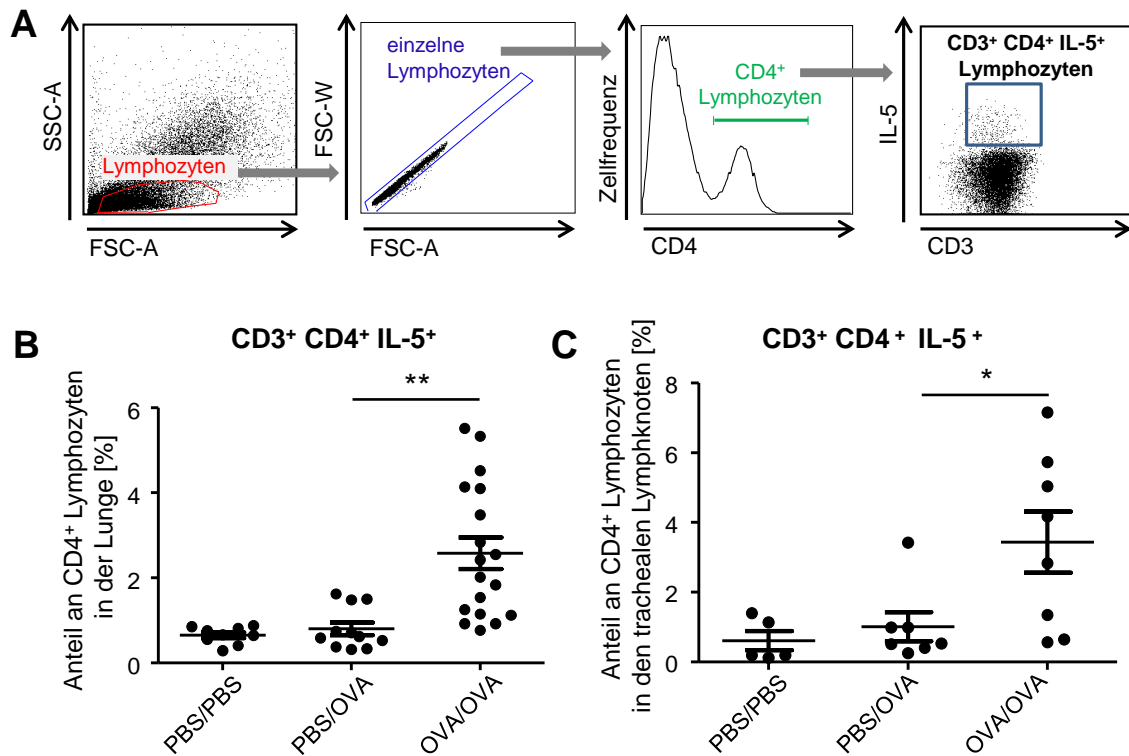


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse von Lungen- und Lymphknotenzellen. Die Frequenz der IL-5-produzierenden T-Zellen vor Verabreichung der OVA-Immuntherapie war nach Sensibilisierung und Provokation erhöht.

An Tag 49 des chronischen Versuchsablaufs wurden Lungen und tLN entnommen und daraus Zellsuspensionen gewonnen. Diese wurden stimuliert und anschließend mit anti-CD4- und anti-CD3-Antikörpern markiert. Nach Permeabilisierung erfolgte die intrazelluläre Markierung der Zellen mit dem anti-IL-5-Antikörper. In **A** ist die Gating-Strategie exemplarisch anhand einer Lungenzellfärbung dargestellt, wie sie zur Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt wurde. Die Gesamtheit der Zellen ist im FSC/SSC-Diagramm dargestellt. Aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität wurden daraus die Lymphozyten eingegrenzt. Innerhalb der Lymphozytenpopulation wurden in einer weiteren Histogramm-Darstellung die T-Helferzellen anhand der CD4-Expression ermittelt. Diese Population wurde mit einem Dotplot anhand der Markierung mit dem Lymphozytenmarker CD3 bestätigt und auf die intrazelluläre Markierung mit IL-5 untersucht. Dazu sind die Fluoreszenzintensitäten der CD3-Markierung auf der X-Achse den Fluoreszenzintensitäten der IL-5-Markierung auf der Y-Achse gegenübergestellt. Die

Gesamtheit der Daten wurde nach Strategie in A ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm SEM der Frequenzen der CD3⁺ CD4⁺ IL-5⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation aus Lunge (B) und tLN (C) dargestellt. Daten aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen sind gezeigt (n=5-18). PBS/OVA und OVA/OVA wurden auf signifikante Unterschiede überprüft. *, p < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. **, p < 0,01 und ***, p < 0,001.

tLN = trachealer Lymphknoten

3.1.2 Suppressive Effekte der allergenspezifischen Immuntherapie im Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung

Im weiteren Versuchsablauf sollten die Effekte einer SIT auf die entstandene Entzündung analysiert werden. Dazu wurde während des Verlaufs des chronischen Modells zusätzlich zur Provokation dreimal wöchentlich die subkutane (s.c.) OVA-spezifische Immuntherapie (OVA-IT) oder PBS-Behandlung (Placebo) durchgeführt. PBS-sensibilisierte Tiere dienten als Negativkontrolle (PBS/PBS, PBS/OVA). Am finalen Versuchstag (Tag 70) wurden die charakteristischen Merkmale des allergischen Asthmas wie zuvor an Tag 49 analysiert. Bei der Messung der AHR zeigten Tiere nach OVA-IT im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren (OVA/OVA Placebo) eine signifikante Reduktion des Atemwegswiderstandes (Abbildung 11, A). Des Weiteren wurden die zellulären Bestandteile der BAL analysiert. Die Untersuchung der zellulären Bestandteile der BAL verdeutlichte, dass die Zahl der eosinophilen Granulozyten nach OVA-IT im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe reduziert war (Abbildung 11, B). Somit senkt die OVA-IT die AHR und die eosinophile Entzündung im chronischen Modell des allergischen Asthmas.

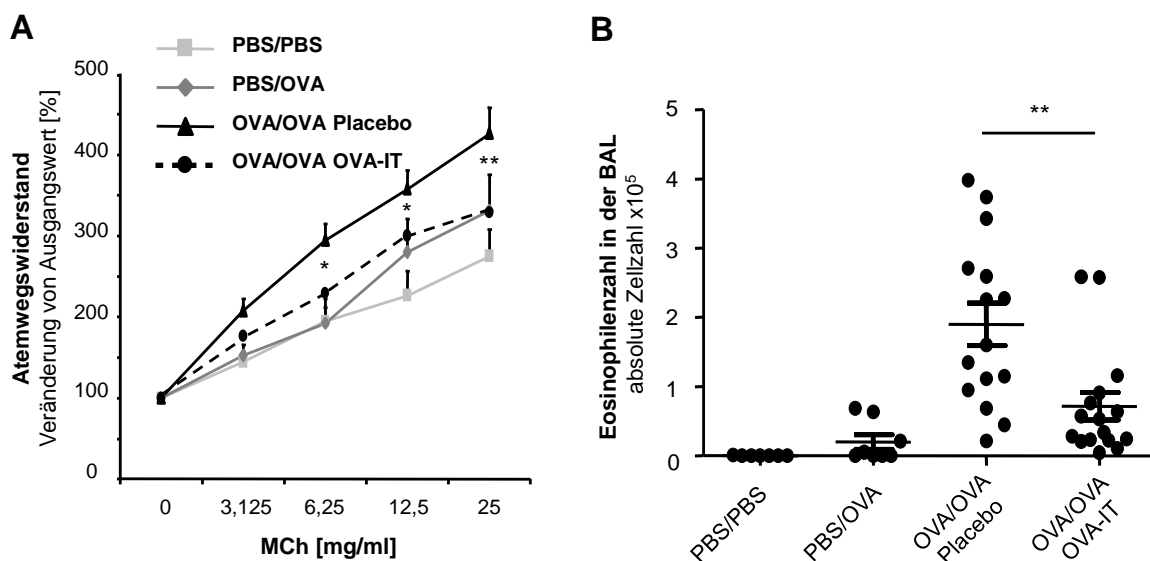


Abbildung 11: Die OVA-Immuntherapie (OVA-IT) reduziert die AHR und die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL im Mausmodell des chronischen allergischen Asthmas.

OVA-sensibilisierte weibliche BALB/c Mäuse wurden mit OVA-Lösung oder PBS i.t. provoziert. Nach der vierten Woche dieser Provokationsphase wurden OVA-sensibilisierte und -provozierte Mäuse mit OVA-IT-Lösung (OVA/OVA OVA-IT) oder PBS (OVA/OVA Placebo) s.c. behandelt. PBS-sensibilisierte und PBS- (PBS/PBS) oder OVA-provozierte (PBS/OVA) Tiere wurden als Negativkontrolle mitgeführt. **A**, 48 h nach der letzten Provokation wurde die Messung der AHR durchgeführt. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe wiesen Tiere der OVA-IT-Gruppe einen niedrigeren Anstieg des Atemwegswiderstandes auf. **B**, Nach der Lungenfunktionsmessung wurde die BAL entnommen und die Zellzahl der eosinophilen Granulozyten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=6-15). OVA/OVA OVA-IT und OVA/OVA-Placebo wurden auf signifikante Unterschiede überprüft. *, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

i.t. = intratracheal, s.c. = subkutan, AHR = Atemwegshyperreagibilität, BAL= Bronchoalveoläre Lavage

Um den Einfluss der OVA-IT auf die systemische Sensibilisierung zu untersuchen, wurden auch nach Gabe der OVA-IT in dem chronischen Modell der allergischen Atemwegsentzündung die OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a analysiert. Dabei zeigte sich, dass die OVA-IT eine signifikante Reduktion des OVA-spezifischen IgEs im Vergleich zur Placebo-Kontrolle hervorruft. Das OVA-spezifische IgG1 dagegen war im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant erhöht. Die Messung des OVA-spezifischen IgG2a zeigte im Vergleich zur Placebo-Behandlung keinen Unterschied.

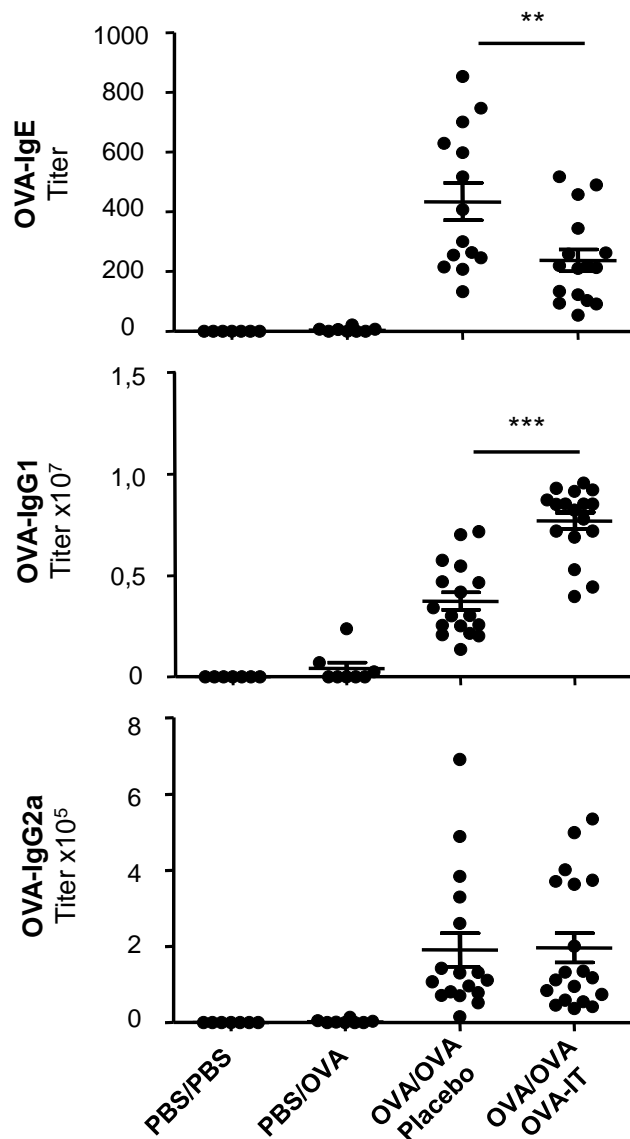


Abbildung 12: Messung der OVA-spezifischen Immunantwort im Serum. Nach OVA-IT wurden geringere Titer des OVA-spezifischen IgE und höhere Titer des OVA-spezifischen IgG1 im Vergleich zur Placebo-Behandlung detektiert.

48 Stunden nach der letzten Provokation der Mäuse wurde das Serum aufbereitet und mit Hilfe eines ELISA die Titer der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2b in den Seren bestimmt. In den Seren der PBS-sensibilisierten Tiere war keine wesentliche Erhöhung der OVA-spezifischen Immunglobuline zu verzeichnen. Durch Verabreichung der OVA-IT waren die Titer des OVA-spezifischen IgE im Vergleich zu den Titern Placebo-behandelter Tieren reduziert. Im Gegensatz dazu war das IgG1 nach OVA-IT höher als in Seren der Placebo-Gruppe. Das OVA-spezifische IgG2a dagegen war im Vergleich zur Placebo-Gruppe nicht verändert. Dargestellt sind Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=8-17). OVA/OVA OVA-IT und OVA/OVA Placebo wurden auf signifikante Unterschiede überprüft. *, p<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001.

3.1.3 Immuntherapie führt zur Reduktion der Th2-vermittelten Immunantwort im chronischen Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Um den Einfluss der allergenspezifischen Immuntherapie auf die Th2-Antwort zu untersuchen, wurde am finalen Versuchstag die intrazelluläre Färbung gegen das Th2-Zytokin IL-5 durchgeführt. Die Frequenz der IL-5-produzierenden CD4⁺ T-Zellen war nach Gabe von OVA-IT im regionalen Lymphknoten (tLN) reduziert. Die Frequenzen der IL-5⁺ T-Zellen in der Lunge waren tendenziell jedoch nicht signifikant vermindert. Somit führt die Immuntherapie zu einer Reduktion der Th2-Antwort im regionalen Lymphknoten (Abbildung 13).

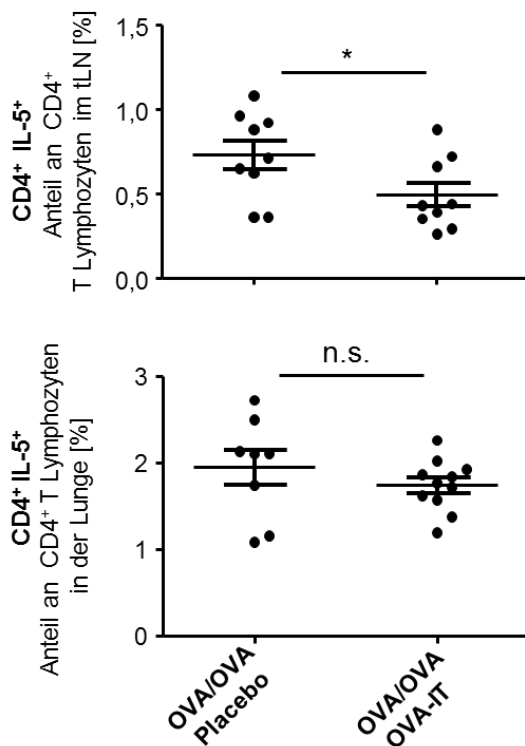


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der IL-5-produzierenden CD4⁺ T-Zellen in Lunge und tLN. Die OVA-IT schwächt die IL-5-Produktion der CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten ab.

An Tag 70 wurden isolierte Lungen- und Lymphknotenzellen stimuliert und anschließend durch eine intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse mit den Antikörpern anti-CD4, anti-IL-5 markiert. Die so markierten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die Frequenzen der CD4⁺ T-Zellen ermittelt, die positiv für das Th2-Zytokin IL-5 waren. Die Frequenz der IL-5⁺ CD4⁺ T-Zellen war in den tLN der OVA-IT-behandelten Tiere im Vergleich zur OVA/OVA Placebo-Gruppe verringert, (n=8-11) *, p<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001. (n.s. nicht signifikant, tLN trachealer Lymphknoten)

3.2 Beurteilung der intrapulmonalen pathohistologischen Veränderungen durch Analyse gefärbter Lungenpräparate

Um die Auswirkungen einer OVA-IT auf das Lungengewebe zu analysieren, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Lungenschnitte jeweils mit H&E (Hämatoxylin und Eosin), PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion), einem Antikörper gegen das Aktin der glatten Muskelzellen (*alpha-Smooth muscle actin*) und mit *Sirius Red* angefärbt. Die Untersuchung des inflammatorischen perivaskulären und peribronchialen Influx erfolgte in den H&E-gefärbten Schnitten. Hierzu wurde eine semi-quantitative Auswertung durchgeführt. Der stärkste inflammatorische Influx zeigte sich in den Lungenschnitten der OVA-sensibilisierten und OVA-provozierten Gruppe, während in den Kontrollgruppen PBS/PBS und PBS/OVA kaum Infiltrate zu erkennen waren. Dieses Resultat zeigte sich sowohl am Tag 49 als auch am Tag 70. In den Sektionen der OVA-IT-Gruppe wurden nach Auswertung von zwei unabhängigen Experimentatoren weniger Infiltrate detektiert als in der Placebo-behandelten Gruppe (Abbildung 14, A links).

Ein weiteres Charakteristikum der Atemwegsentzündung ist die Becherzellmetaplasie. Anhand von PAS-behandelten Lungenschnitten erfolgte die Zählung der mukusproduzierenden Becherzellen in der Epithelschicht der Bronchien. Die Auswertung ergab, dass die Zahl der PAS-positiven Zellen in den Atemwegen der OVA-sensibilisierten und -provozierten Mäuse im Vergleich zu den Negativkontrollen am Tag 49 am höchsten war. Nach Durchführung der OVA-IT am Tag 70 hingegen war in den Placebo-behandelten Tieren die Zahl der mukusproduzierenden Zellen gleich hoch. Im Vergleich dazu war nach OVA-IT hingegen die Zahl der PAS⁺ Zellen signifikant reduziert.

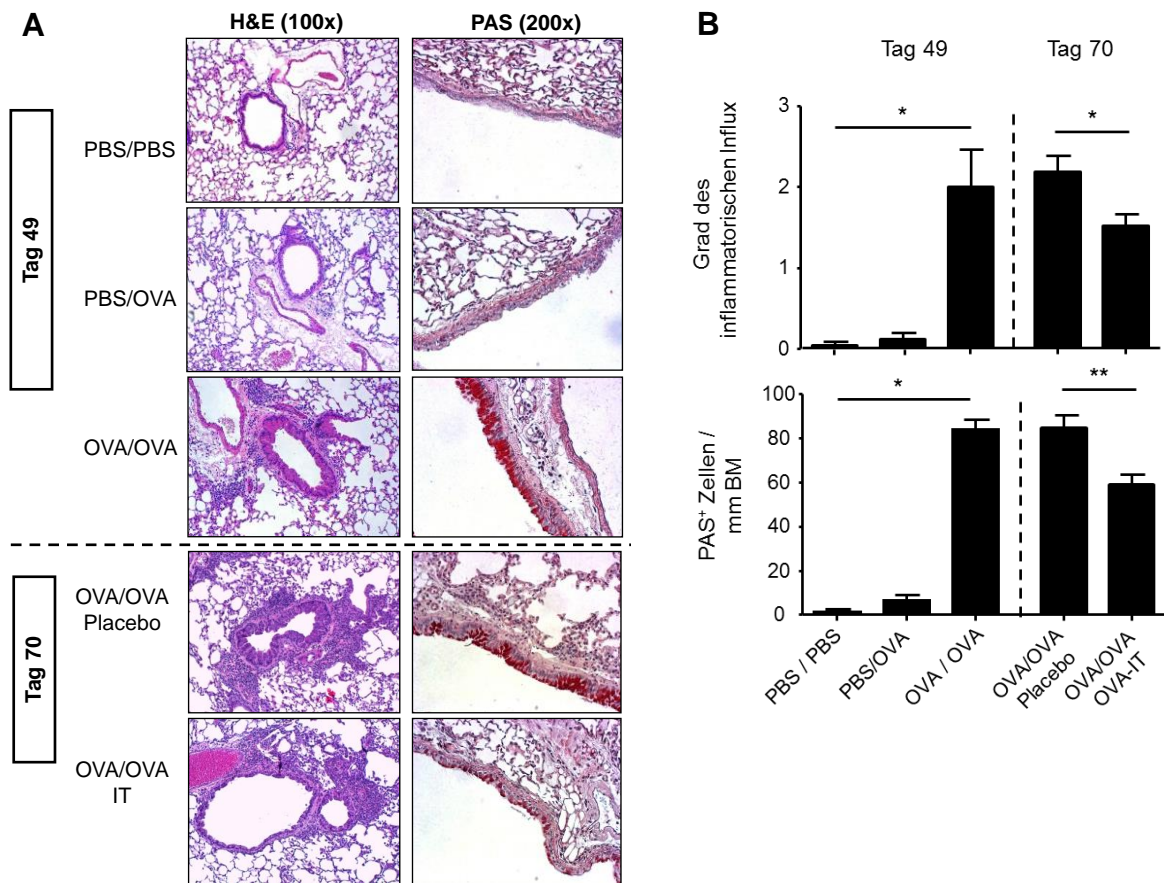


Abbildung 14: Nach SIT kommt es in der Lunge zu einer signifikanten Verminderung inflammatorischer Infiltrate sowie mukusproduzierender Becherzellen.

An den Tagen 49 und 70 wurden die Lungen der behandelten Tiere zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet und von den gefertigten Schnitten H&E- und PAS-Färbungen durchgeführt. **A**, Zu jeder Färbung sind fünf Bilder auf der linken Seite repräsentativ dargestellt und zeigen jeweils einen Lungenschnitt einer Maus aus der entsprechenden Gruppe. **B**, Die statistische Auswertung ist jeweils rechts dargestellt. Die H&E-Färbung verdeutlicht die Akkumulation von Entzündungszellen in OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren im Gegensatz zu Kontrolltieren (PBS/PBS, PBS/OVA), die kaum Infiltrate enthalten. Die semi-quantitative Einstufung zeigte in OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren am Tag 49 einen erhöhten Grad der Inflammation. Nach Durchführung der OVA-IT bzw. Placebo-Behandlung war die Einstufung in Placebo-behandelten Tieren auf dem gleichen Niveau wie am Tag 49, während die OVA-IT-Gruppe eine gemilderte Inflammation aufwies. Die PAS-Reaktion macht mukusproduzierende Becherzellen durch Rotfärbung von Mukopolysacchariden sichtbar. Die Zählung der PAS⁺ Zellen in der Epithelschicht von Lungenschnitten der OVA/OVA-Gruppe am Tag 49 war im Vergleich zur Kontrolle am höchsten. Am Tag 70 war die Zahl/mm BM nach Placebo-Behandlung vergleichbar hoch. Die OVA-IT-Gruppe wies im Vergleich dazu geringere Zahlen der PAS⁺ Zellen in der Epithelschicht auf. In Klammern ist die Vergrößerung angegeben (n=4-13). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM. p<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001. PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion; BM = Basalmembran

Weitere Färbungen wurden angefertigt, um den Grad der pathologischen strukturellen Veränderungen der Bronchien zu beurteilen. Die Bronchialmuskulatur kann durch Anfärben mit einem Antikörper gegen das Aktin der glatten Atemwegsmuskulatur (*α -smooth muscle actin*) spezifisch sichtbar gemacht und quantifiziert werden (siehe 2.2.9.6, Material und Methode).

Die mittlere Schichtdicke der Bronchialmuskulatur in Lungen von OVA-sensibilisierten und -provozierten Mäusen (OVA/OVA) war vor Durchführung der OVA-IT (Tag 49) im Vergleich zu den PBS-sensibilisierten Kontrollgruppen (PBS/PBS, PBS/OVA) erhöht. Nach OVA-IT wurde eine Senkung dieser Verdickung verglichen mit der Placebo-Gruppe festgestellt (Abbildung 15, B).

Die *Sirius Red*-Färbung dient u.a. zur Darstellung von Kollagenfasern. Das ermöglicht die Analyse der Kollageneinlagerung infolge der chronischen Atemwegsentzündung in den Lungengewebe. Die stark rote Schicht unterhalb der Bronchialmuskulatur hebt die Kollagenfasern hervor. Nach statistischer Auswertung der randomisierten Analyse der Lungenschnitte vor Verabreichung der OVA-IT ergab die Messung der Kollagenschicht in OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren im Vergleich zu PBS-sensibilisierten Tieren höhere Werte. Aus Lungenschnitten vom finalen Versuchstag, Tag 70, resultierte aus der Messung der Kollagenschichten der therapierten Gruppe im Vergleich zu der Placebo-Gruppe eine signifikante Reduktion der Kollageneinlagerung nach OVA-IT.

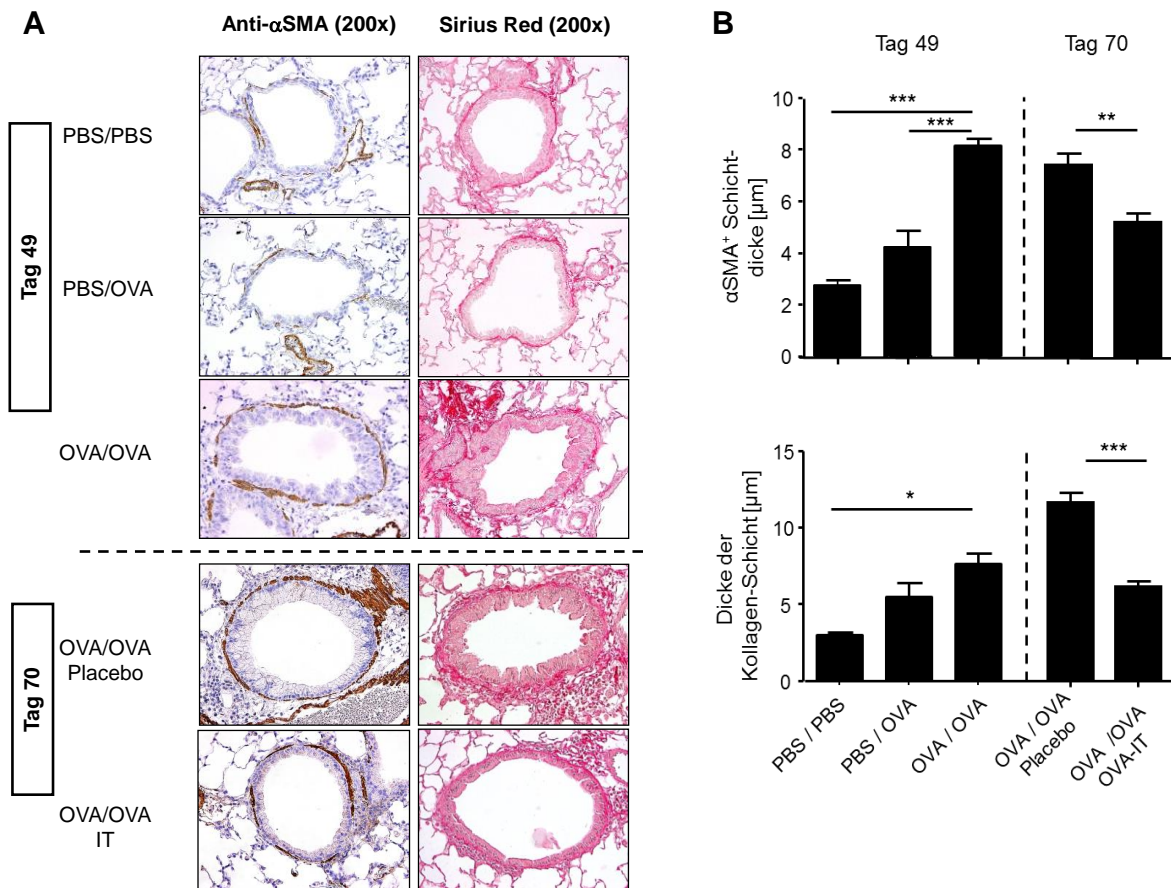


Abbildung 15: Beurteilung der Umbauprozesse im Lungengewebe durch Analyse von histologischen Paraffinschnitten. Nach Behandlung mit OVA-IT war eine Verringerung der Dicke der Bronchialmuskelschicht und der Kollagenschicht detektierbar.

Von den fixierten und eingebetteten Lungen wurden Schnitte erstellt, die jeweils mit einem Antikörper gegen das α SMA oder mittels *Sirius Red*-Farbstoff gefärbt wurden. **A**, Zu jeder Färbung sind fünf Bilder auf der linken Seite repräsentativ dargestellt und zeigen jeweils einen Lungenschnitt einer Maus aus der entsprechenden Gruppe. Ganz links ist die immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen α SMA dargestellt. Sie verdeutlicht die Dicke der glatten Muskelschicht um die Atemwege. Rechts davon sind repräsentative Bilder der *Sirius Red*-Färbung gezeigt. Mit Hilfe der *Sirius Red*-Färbung lässt sich die Kollagenschicht um die Atemwege durch eine starke Rotfärbung detektieren. **B**, Die statistische Auswertung der gemessenen Schichtdicken ist rechts neben den repräsentativen Bildern angegeben. Die Stärke der Bronchialmuskulatur in der OVA/OVA-Gruppe war vor der Durchführung der OVA-IT, Tag 49, im Vergleich zu PBS-sensibilisierten Mäusen erhöht. Nach OVA-IT ergab die Messung Bronchialmuskulaturstärke geringere Werte als in Placebo-behandelten Tieren. Die Kollageneinlagerung war in OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren vor OVA-IT geringfügig erhöht. An Tag 70 war die Kollagenschicht in Placebo-behandelten Tieren am stärksten. OVA-IT-Tiere hatten im Vergleich dazu eine signifikant geringere Kollageneinlagerung. In Klammern angegeben ist die jeweilige Vergrößerung. Die Daten wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gewonnen, (n=4-13).

$p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.
 α -SMA, (*α -smooth muscle actin*) α -Aktin der glatten Muskelzellen

3.3 Nachweis möglicher toleranzinduzierender Zellen nach einer allergenspezifischen Immuntherapie

Wie vorangehend dargestellt, spiegelt das Modell der SIT für chronisches Asthma einige Aspekte der entsprechenden Therapie im Menschen wider. Um die potentiellen toleranzinduzierenden Mechanismen in diesem Zusammenhang aufzudecken, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Lungen- und Lymphknotenzellen untersucht. In der Literatur wurden vor allem Th1-Zellen (138) und regulatorische T-Zellen (142, 146) als mögliche Schlüsselzellen der suppressiven Wirkung der SIT beschrieben, deshalb wurden diese T-Zellpopulation im chronischen Modell nach OVA-IT oder Placebo-Behandlung analysiert.

3.3.1 Induktion einer Th1-Antwort nach Immuntherapie

Um die Th1-Subpopulation in den Zellen *ex vivo* nachzuweisen, wurde eine intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse auf das Th1-Schlüsselzytokin IFN- γ durchgeführt. Dabei wurden mit Antikörpern gegen die Lymphozytenmarker CD3 und CD4 die T-Helferzellen eingegrenzt. Nach Permeabilisierung der Zellen wurde das IFN- γ intrazellulär markiert. Die Dreifachmarkierung identifiziert die Th1-Population. Wie erwartet, war die Frequenz der CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen in Lunge und tLN nach der OVA-IT im Vergleich zur Placebo-Behandlung erhöht (Abbildung 16).

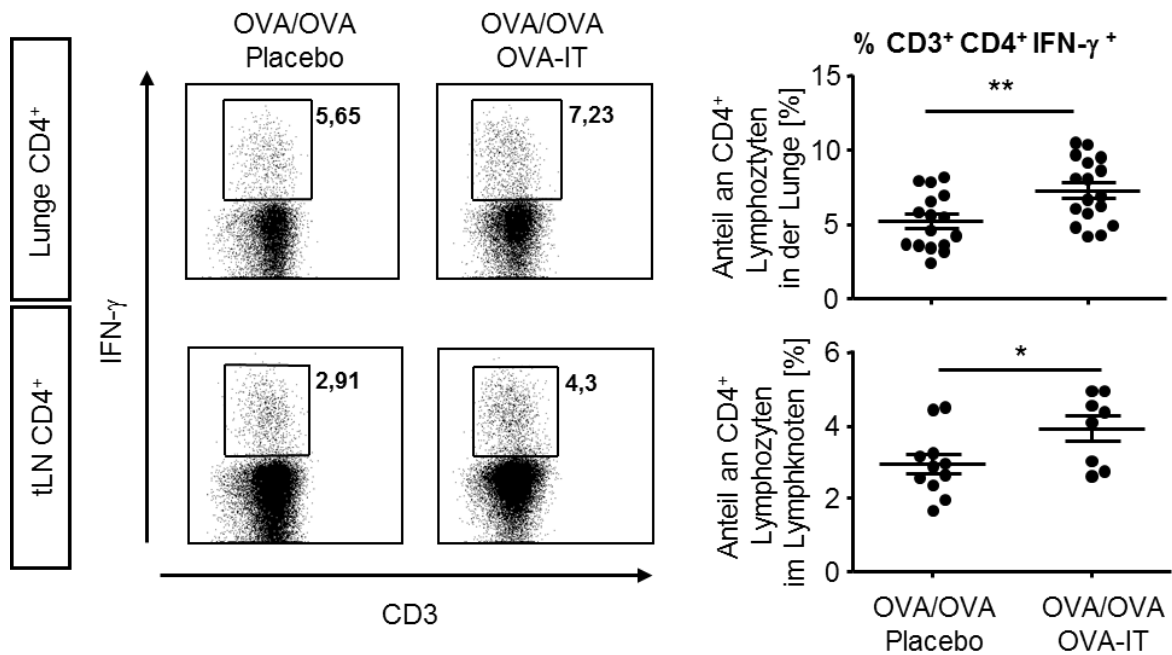


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Untersuchung von Lungen- und Lymphknotenzellen. Die Frequenz der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten nimmt nach Gabe der OVA-IT in Lungenzellen und tLN-Zellen zu.

Die am Tag 70 isolierten Zellsuspensionen von Lungen und tLN wurden unter Stimulation kultiviert und anschließend mit den Antikörpern gegen CD4, CD3 und IFN- γ markiert. Durch durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Die vier Dotplot-Diagramme auf der linken Seite zeigen beispielhaft die CD4⁺ Population im jeweiligen Organ. Auf der X-Achse ist dabei die Fluoreszenzintensität des CD3-Signals dargestellt, die der Fluoreszenzintensität der IFN- γ -Markierung auf der Y-Achse gegenübersteht. Die umrahmte Population markiert CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ -produzierende T-Zellen. Die beiden Punktdiagramme auf der rechten Seite geben einen Überblick über die Frequenzen der CD3⁺CD4⁺ IFN- γ -produzierenden T-Zellen mehrerer Tiere. Ein Datenpunkt im Diagramm steht dabei für die ermittelte Frequenz der Zellen in einem Tier. Daten von 2-3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt (n=8-17). $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

tLN = trachealer Lymphknoten

3.3.2 Die Immuntherapie führt zu einer Erhöhung der IL-10-Produktion und zu einem Anstieg von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen im drainierenden Lymphknoten

Die Wirksamkeit der SIT wird auf die Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Tregs) zurückgeführt (142, 146, 164). In der Literatur werden verschiedene Zellpopulationen als Tregs beschrieben (siehe 1.1.3). In der vorliegenden Arbeit wurden Tregs anhand ihrer FoxP3-Expression unterschieden. FoxP3⁺ Tregs wurden als CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Zellen analysiert, während FoxP3⁻ Tregs als IL-10-produzierende CD4⁺ T-Zellen, sogenannte Tr1-Zellen, identifiziert wurden. Diese zwei Populationen wurden durch Analyse mit dem Durchflusszytometer in Lungenzellen und tLN-Zellen *ex vivo* untersucht. Während in der Lunge nach OVA-IT keine Veränderung in der Frequenz der FoxP3⁺ Tregs detektierbar war, waren im regionalen Lymphknoten erhöhte Frequenzen von CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs im Vergleich zur Placebo-Gruppe nachweisbar.

Der Anteil der IL-10-produzierenden T-Zellen wurde ebenfalls durch intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse bestimmt. Die CD4⁺ T-Zellen sind die Hauptproduzenten des Zytokins IL-10 in Lunge und tLN in diesem Modell, da eine IL-10-Produktion durch andere Zellpopulationen kaum detektiert werden konnte. Im Vergleich zum Placebo wurde in Lunge und Lymphknoten der OVA-IT-Gruppe ein signifikant höherer prozentualer Anteil der CD4⁺ IL-10⁺ Zellen gemessen (Abbildung 17).

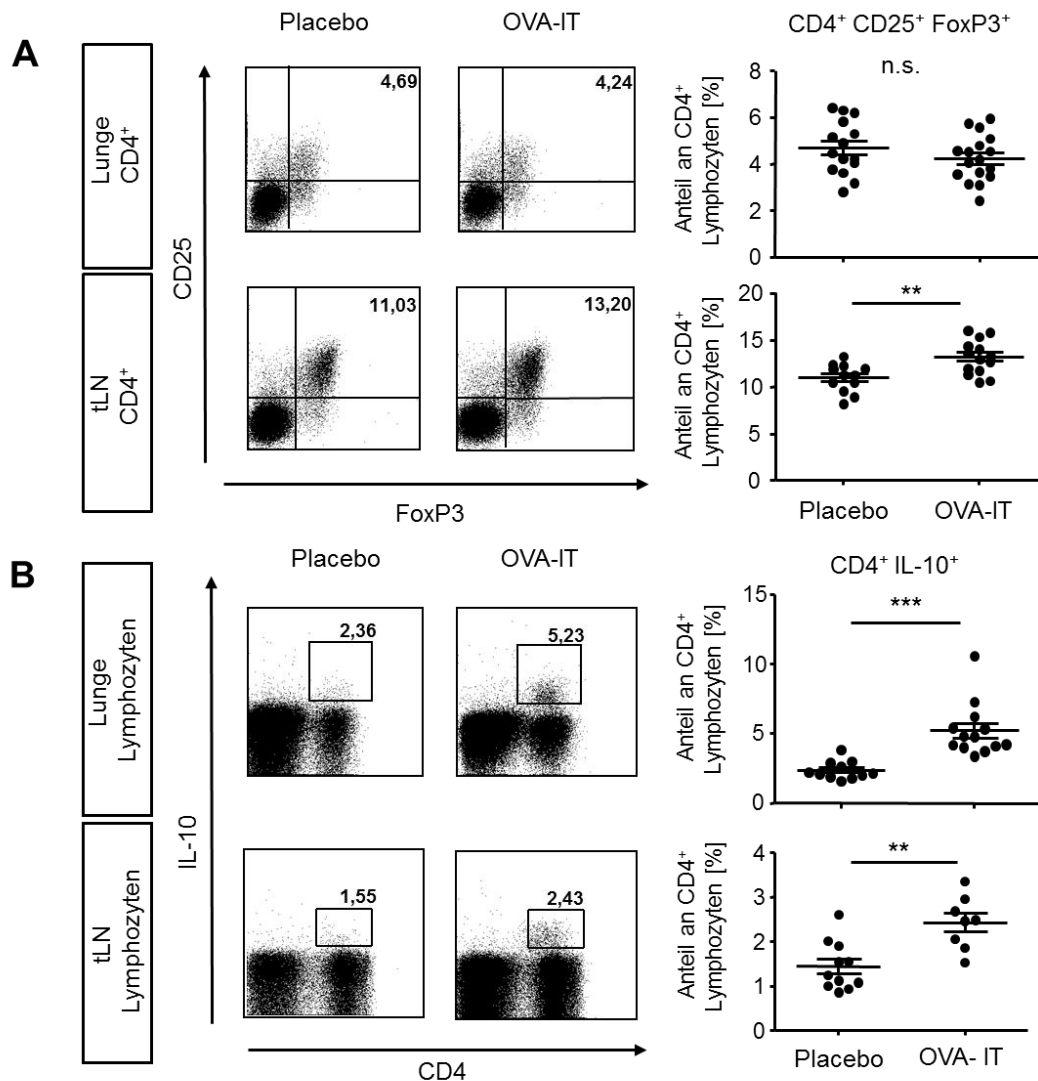


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von Lungen- und tLN-Zellen. In OVA-IT behandelten Tieren waren höhere Frequenzen an CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs und IL-10⁺ CD4⁺ detektierbar.

Aus Lungen und tLN von OVA-sensibilisierten und -provozierten, therapierten oder Placebo-behandelten Mäusen wurden am Tag 70 Zellsuspensionen isoliert. Auf der linken Seite ist exemplarisch die intrazelluläre Analyse von Lungen- oder tLN-Zellen eines Tieres dargestellt. Die Punktdiagramme auf der rechten Seite zeigen zusammenfassend die FACS-Analysen mehrerer Mäuse. Ein Datenpunkt im Diagramm steht für die ermittelte Frequenz der Zellen eines Tieres. **A**, Die Zellen wurden mit den Antikörpern anti-CD4, anti-CD25 und anti-FoxP3 markiert. Durch die durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Es sind die CD4⁺ Zellen dargestellt, die auf ihre Fluoreszenzintensität der CD25-Markierung (Y-Achse) und der FoxP3-Markierung (X-Achse) analysiert wurden. Die Frequenzen waren nach OVA-IT in den tLN signifikant erhöht. **B**, Zusätzlich wurden die Zellen unter Stimulation kultiviert und mit den Antikörpern gegen den Marker für T-Helfer-Zellen CD4 und

gegen IL-10 markiert. Die Frequenzen der IL-10⁺ CD4⁺ Lymphozyten waren nach OVA-IT im Vergleich zur Placebo-Behandlung signifikant erhöht.

Daten von 2-3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet, $n=8-13$. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

tLN = trachealer Lymphknoten

3.4 T-bet-defiziente Mäuse profitieren von den suppressiven Effekten der Immuntherapie in einem Modell des akuten allergischen Asthmas

Um zu klären, ob die SIT-induzierte IFN- γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen für die Effektivität dieser Therapie von Bedeutung ist, wurden T-bet Knockout-Mäuse (T-bet^{-/-}) mit einem Gen-Knock-out für *t-box 21* verwendet. Das Gen *t-box 21* codiert für T-bet, den Haupttranskriptionsfaktor der Th1-Zellen. Durch diesen Defekt können diese Mäuse keine IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen (Th1-Zellen) bilden (151). T-bet^{-/-} Mäuse wurden in einem akuten Modell des allergischen Asthmas mit SIT behandelt (siehe Abbildung 4), welches die Untersuchung der SIT in Abwesenheit einer funktionellen Th1-Antwort ermöglicht.

3.4.1 Immuntherapie reduziert die AHR und Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL von T-bet^{-/-} Mäusen

48 h nach der letzten Provokation der T-bet^{-/-} und BALB/c (Wildtyp) Mäuse wurde der Atemwegswiderstand gemessen und die BAL entnommen. Der Anstieg des gemessenen Atemwegswiderstandes der Placebo-behandelten T-bet^{-/-} ist im Vergleich zur BALB/c Placebo-Gruppe etwas, jedoch nicht signifikant, erhöht. Der Anstieg des Atemwegswiderstandes der T-bet^{-/-} Tiere nach OVA-IT ist auf ein vergleichbares Niveau wie bei der BALB/c OVA-IT-Gruppe gesenkt. Durch Differenzierung der BAL-Zellen wurde die Gesamtzellzahl, die Zellzahl der eosinophilen Granulozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten bestimmt. Nach OVA-IT hatten die Tiere des BALB/c-Stammes, aber auch des T-bet^{-/-} Stammes, im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine verringerte Gesamtzellzahl in der BAL und eine geringere Anzahl an eosinophilen Granulozyten (Abbildung 18).

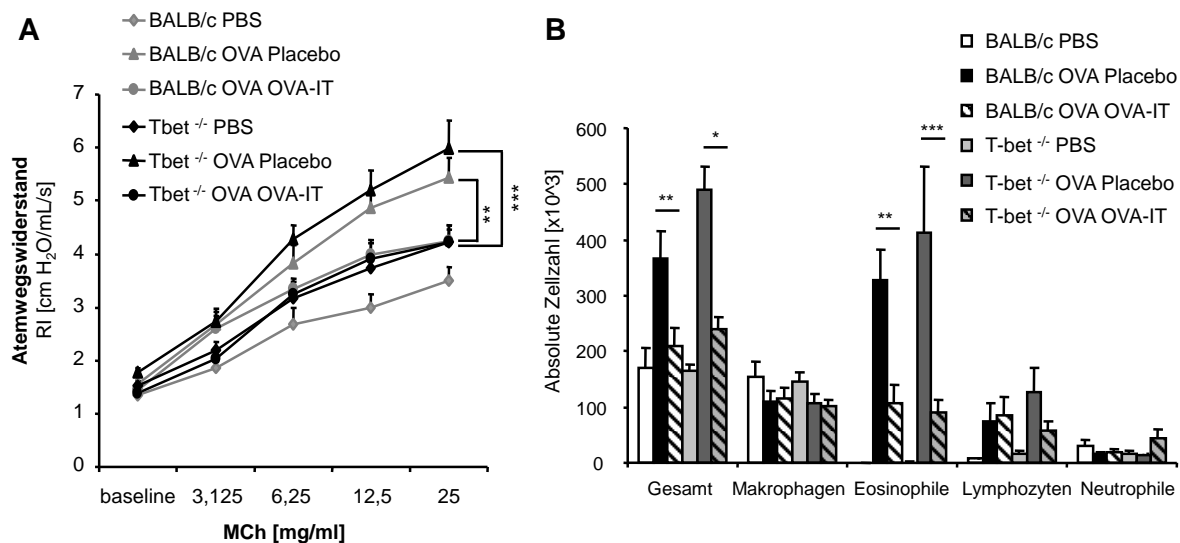


Abbildung 18: Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholinkonzentration und Differentialzählung der Zellen aus der BAL. Die Verabreichung von OVA-Immuntherapie in Tbet^{-/-} Mäusen reduziert die AHR und Anzahl der Eosinophilen in der BAL.

Weibliche BALB/c Mäuse und Tbet-defiziente Mäuse wurden mit OVA/Alum oder PBS sensibilisiert. Alle Tiere wurden mit aerosolisierte OVA-Lösung inhalativ provoziert. Zusätzlich wurden OVA-sensibilisierte und -provozierte Mäuse mit OVA-Lösung (OVA OVA-IT) oder PBS s.c. (OVA Placebo) dreimal zwischen Sensibilisierung und Provokation behandelt. **A**, Die Messung der Lungenfunktion verdeutlicht, dass der Atemwegswiderstand nach OVA-IT sowohl in BALB/c als auch in Tbet-defizienten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Geschwistertieren niedriger war. **B**, Zelluläre Zusammensetzung der BAL ist rechts als Balkendiagramm dargestellt. Sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zahl eosinophiler Granulozyten ist in OVA-sensibilisierten, -provozierten BALB/c und Tbet-defizienten Tieren im Vergleich zu PBS-sensibilisierten Tieren erhöht. Nach OVA-IT wurde, verglichen mit Placebo-Behandlung, eine geringere Gesamtzellzahl und Zahl der Eosinophilen in beiden Mausstämmen detektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt (n=11-17). $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

AHR = Atemwegsüberempfindlichkeit, BAL = Bronchoalveoläre Lavage, s.c. = subkutan

3.4.2 Immuntherapie mildert die Atemwegsentzündung und reduziert Th2-Zytokine in der Lunge in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors T-bet

Eine Analyse der OVA-spezifischen Immunglobuline in den Seren der T-bet^{-/-} und der BALB/c Mäuse zeigte nach OVA-IT im akuten Modell niedrigere Titer des OVA-spezifischen IgE und gleichzeitig eine höhere Titer des OVA-spezifischen IgG1 im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe (nicht gezeigt).

Eine histologische Untersuchung der Atemwegsentzündung wurde auf H&E- und PAS-gefärbten Lungenschnitten durchgeführt. Der Influx von entzündungsfördernden Zellen wurde auf H&E-gefärbten Schnitten evaluiert und war sowohl in Lungengewebe der Placebo-behandelten BALB/c Tiere als auch der T-bet^{-/-} Mäuse in gleichem Maße erhöht. Dagegen war in beiden OVA-IT-behandelten Gruppen das Ausmaß des inflammatorischen Influx geringer.

Auf den PAS-behandelten Lungenschnitten wurde die Becherzellmetaplasie untersucht. Lungen von Placebo-behandelten BALB/c und T-bet^{-/-} Tieren wiesen eine erhöhte Anzahl an PAS-positiven Zellen in der Epithelschicht auf, wohingegen die Zahl in beiden OVA-IT-Gruppen signifikant erniedrigt war. Lungenschnitte von PBS-sensibilisierten und OVA-provozierten BALB/c oder T-bet^{-/-} waren annähernd frei von Zellinfiltraten und PAS-positiven Becherzellen.

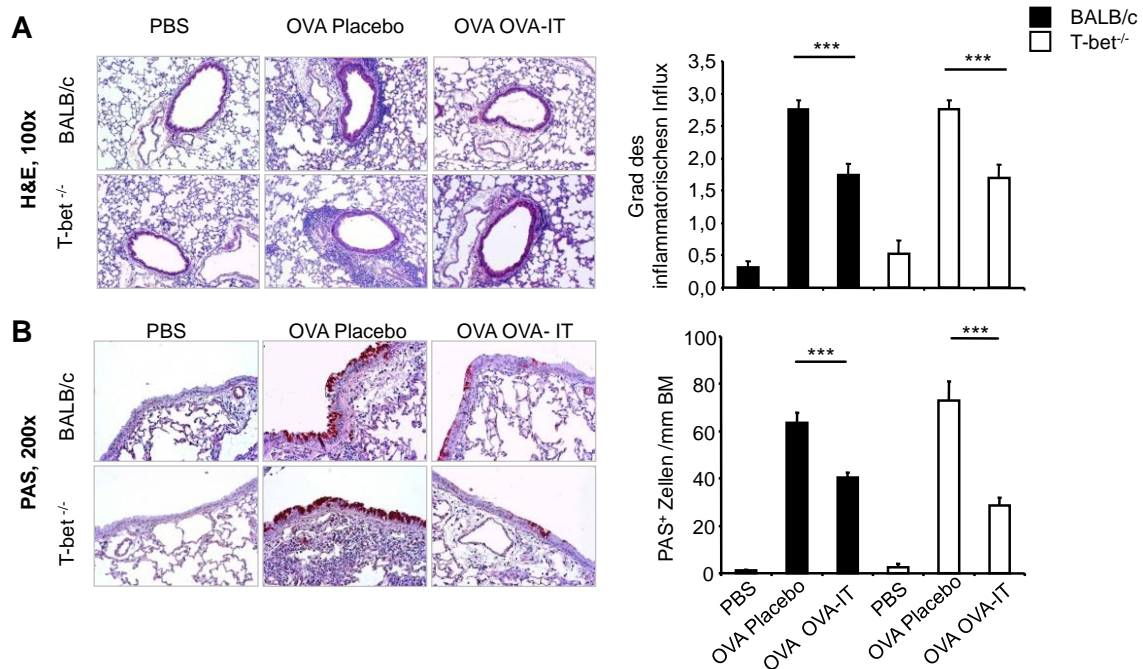


Abbildung 19: Histologische Evaluation von Lungenschnitten. OVA-Immuntherapie unterdrückt effizient die allergische Atemwegsentzündung und Mukusproduktion durch Becherzellen.

48 h nach der letzten OVA-Provokation wurden die Tiere abgetötet und Lungengewebe entnommen. Nach Fixierung und Einbetten in Paraffin wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese mit H&E und PAS gefärbt. **A**, Die Atemwegsinflammation wurde mit einer semiquantitativen Einstufung der inflammatorischen Infiltration beurteilt. In Lungenschnitten von Tieren der OVA-IT-Gruppe waren im Vergleich zu Placebo-behandelten Gruppe weniger Infiltrate sichtbar. Vergrößerung x100. **B**, Auf PAS-gefärbten Lungenschnitten wurde die Zahl der mukusproduzierenden Becherzellen pro mm Basalmembran gezählt. T-bet-defiziente und BALB/c Mäuse wiesen nach OVA-Sensibilisierung, –Provokation und Placebo-Behandlung hohe Zahlen der PAS⁺ Becherzellen in der Epithelschicht auf. Die Zahl der PAS⁺ Zellen war nach OVA-IT in beiden Mausstämmen geringer. Originalvergrößerung der exemplarischen Bilder x200. Während auf der linken Seite repräsentativ ein Lungenschnitt aus jeweils einer Maus gezeigt ist, geben die Balkendiagramme auf der rechten Seite einen Überblick über die Gesamtauswertung. n=8-12 pro Gruppe. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$. PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Die gewonnenen Zellsuspensionen aus den Lungen wurden kultiviert und die Zellkulturüberstände entnommen. Die Zytokine in den Überständen wurden mit Hilfe von ELISA untersucht. Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 waren sowohl in Placebo-behandelten BALB/c als auch in T-bet^{-/-} Mäusen im Vergleich zu PBS-sensibilisierten Tieren erhöht. OVA-IT bewirkte eine verminderte Produktion dieser Th2-Zytokine in

beiden Mausstämmen. Des Weiteren wurden die Auswirkung der OVA-IT auf Th17-Zytokine IL-17A und IL-22 analysiert. Beide Zytokine waren in den Placebo-Gruppen nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA erhöht. In Lungenzellen nach OVA-IT waren die Konzentrationen nur bei BALB/c Mäusen, jedoch nicht bei T-bet^{-/-} Mäusen verringert.

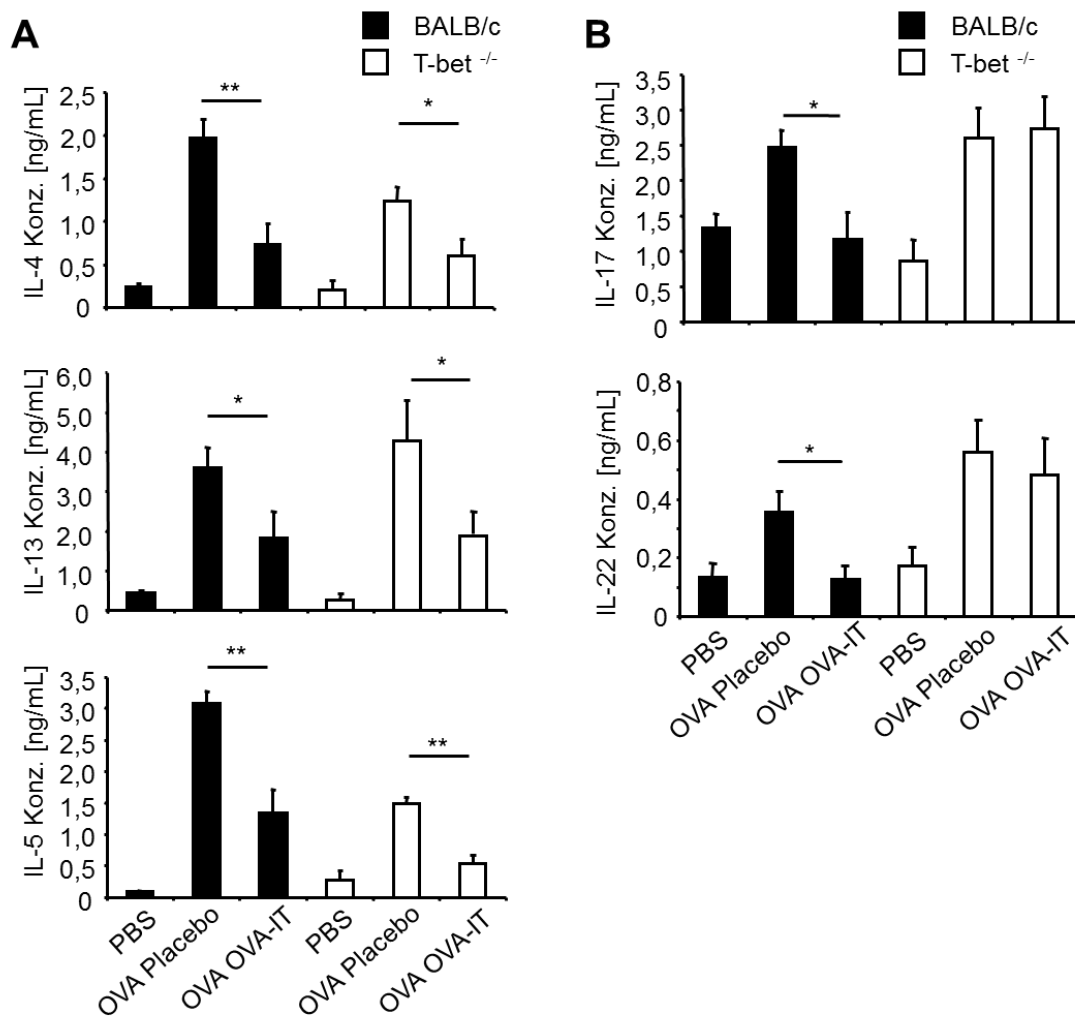


Abbildung 20: Messung der Th2- und Th17-Zytokine in Überständen von ex vivo kultivierten Lungenzellen. Die OVA-IT reduziert die Produktion der Th2- jedoch nicht der Th17-Zytokine in Lungenzellen von T-bet^{-/-} Mäusen.

Isolierte Lungenzellen von behandelten BALB/c und T-bet^{-/-} Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 für 48h stimuliert. Die Konzentration der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (A) und der Th17-Zytokine IL-17A und IL-22 (B) wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA im Überstand der Lungenzellen bestimmt. Die gemessenen Th2- und Th17-Zytokine in den Überständen waren nach Placebo-Behandlung im Vergleich zu unsensibilisierten Kontrollen in beiden Mausstämmen erhöht. Lungenzellen von BALB/c- und T-bet^{-/-} Mäusen nach OVA-IT produzierten weniger Th2-Zytokine. Die Th17-Zytokine in Lungenzellüberständen der BALB/c Mäuse waren nach OVA-IT signifikant verringert. In den Überständen der T-bet^{-/-} Mäuse war jedoch keine Senkung zu detektieren. Die

Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

Das Ergebnis dieser Untersuchung wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse auf Th2- und Th17-Zellen bestätigt. Durch die Analyse von $CD4^+$ IL-5⁺ Zellen wurden die Frequenzen der Th2-Zellen untersucht. Entsprechend der durch ELISA gewonnenen Daten war die Frequenz der $CD4^+$ IL-5⁺ T-Zellen in Tieren nach OVA-IT verglichen mit der Placebo-Kontrolle gesenkt. Die Th17-Zellen wurden als $CD4^+$ IL-17A⁺ Zellen charakterisiert. Die Th17-Frequenzen waren in Lungenzellen von T-bet-defizienten Mäusen im Gegensatz zu BALB/c Mäusen nach OVA-IT nicht verringert (Abbildung 21).

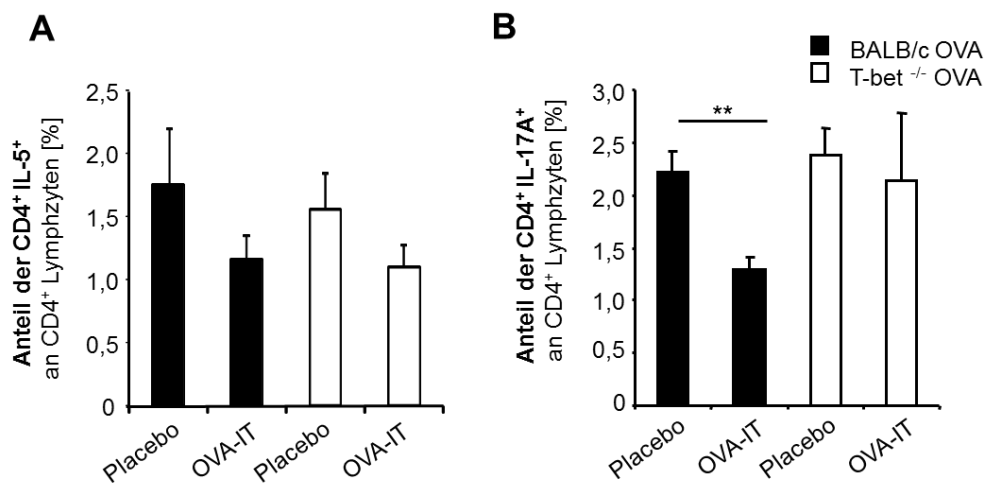


Abbildung 21: Die Frequenz IL-5- (Th2-Zellen) und IL-17A-produzierender $CD4^+$ T-Zellen (Th17-Zellen) ist in Lungen von BALB/c Mäusen nach OVA-IT-Behandlung im Vergleich zu Lungenzellen von OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren geringer. In den Lungen von T-bet^{-/-}-Mäusen ist die Frequenz von Th2-Zellen nach OVA-IT niedriger. Die Frequenz der Th17-Zellen bleibt hingegen unverändert.

Nach der letzten Provokation, wurden Lungenzellen aus OVA- sensibilisierten, -provozierten und therapierten bzw. Placebo-behandelten BALB/c und T-bet^{-/-} Mäusen isoliert und stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4 und intrazellulär mit anti-IL-5 oder anti-IL-17A markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Balkendiagramme verschaffen einen Überblick über die Gesamtauswertung der prozentualen Anteile der $CD4^+$ IL-5⁺ T-Zellen (**A**) und der $CD4^+$ IL-17A⁺ T-Zellen (**B**). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind als prozentuale Anteile der $CD4^+$ Population angegeben und als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt (n=4-14).

$p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

3.5 Effekte der Immuntherapie in DO11.10 Mäusen in einem akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

In Folgeexperimenten sollte die Rolle der Tregs bei der SIT näher beleuchtet werden. Dafür wurden DO11.10-TZR-transgene Mäuse (DO11.10 Mäuse) genutzt. Dieser Mausstamm trägt ein für MHCII-Präsentation bestimmtes TZR-Transgen, das spezifisch das OVA-Epitop 323-339 bindet (153). Dadurch war es möglich, OVA-spezifische T-Zellantworten nach Durchführung der OVA-IT zu untersuchen. Die DO11.10 Mäuse wurden in einem akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung untersucht, welches eine prophylaktische Gabe der Immuntherapie beinhaltet (Abbildung 5). Durch das Vorhandensein von OVA-spezifischen T-Zellen ist eine Sensibilisierung in diesem Modell nicht notwendig. DO11.10 Mäuse reagieren bei Inhalation von OVA mit einer neutrophilen Atemwegsentzündung (155). In DO11.10 Weibchen wurde eine OVA-IT oder Placebo-Behandlung durchgeführt und anschließend erfolgte die Provokation mit OVA oder PBS.

3.5.1 Immuntherapie führt zur Reduktion des Atemwegswiderstandes und zur Verringerung der Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL

Nach Provokation der DO11.10 Mäuse erfolgten die Messung der AHR und die Analyse der BAL. Die Inhalation von OVA durch DO11.10 Mäuse resultiert in einem Einstrom neutrophiler Granulozyten in den bronchoalveolären Raum und eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes im Vergleich zur Inhalation von PBS. Nach Durchführung der OVA-IT war der Atemwegswiderstand im Vergleich zu Placebo-Behandlung signifikant geringer und die Anzahl der Neutrophilen in der BAL reduziert (Abbildung 22).

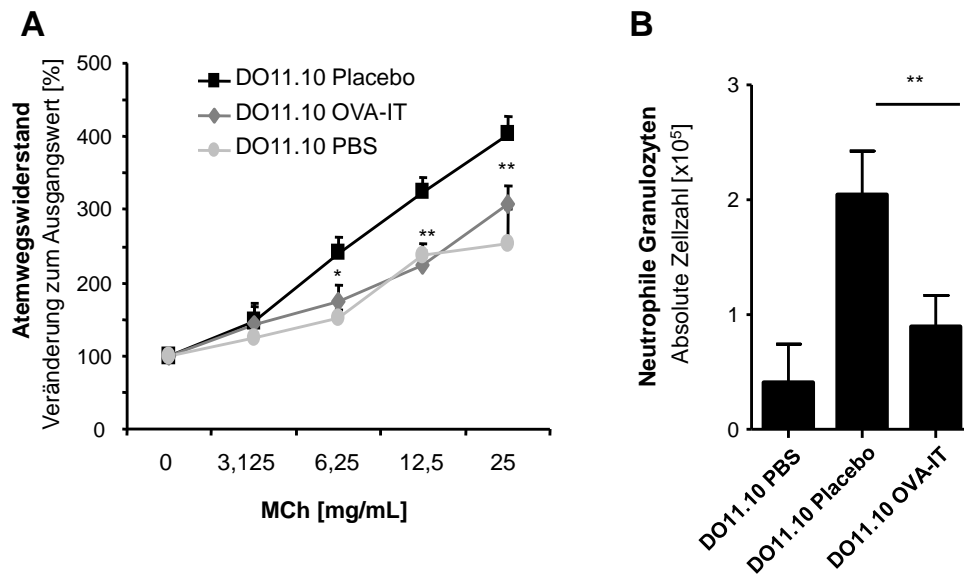


Abbildung 22: Messung der Lungenfunktion unter steigenden Dosen von Methacholin und absolute Anteile der neutrophilen Granulozyten in der BAL. Die OVA-IT reduziert AHR und den Einstrom von Neutrophilen in den bronchoalveolären Raum in DO11.10 Mäusen.

In DO11.10-TZR-transgenen Mäusen (DO11.10) wurde eine OVA-IT oder Placebo-Behandlung durchgeführt. Anschließend wurden die Mäuse mit OVA provoziert. Als Negativkontrolle dienten PBS-provozierte DO11.10 Mäuse. Nach der letzten Provokation wurde der Atemwegswiderstand gemessen. **A**, Provokation mit OVA in der Placebo-Gruppe erhöhte den Atemwegswiderstand mit steigenden Dosen von Methacholin im Vergleich zur PBS-Provokation. Die OVA-IT-Gruppe wies hingegen einen geringeren Anstieg des Atemwegswiderstandes als die Placebo-behandelte Gruppe auf. **B**, Die OVA-Provokation führte in der Placebo-Gruppe zu einer erhöhten absoluten Anzahl an neutrophilen Granulozyten im bronchoalveolären Raum, während die Behandlung mit OVA-IT geringere Zellzahlen der Neutrophilen in der BAL bewirkte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Experimenten Mittelwert \pm SEM; $n=4-10$. $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$ und ***, $p<0,001$.

3.5.2 Die Immuntherapie führt zur Induktion OVA-spezifischer regulatorischer T-Zellen

Auch in diesem Modell wurden Lungen und Lymphknoten durch intrazelluläre Analyse mittels Durchflusszytometrie untersucht, um den Einfluss von FoxP3⁺ Tregs und Tr1-Zellen zu beurteilen. Die Färbung von FoxP3⁺ Tregs wurde mit einem Antikörper gegen den DO11.10 T-Zell-Rezeptor durchgeführt. Dadurch ist es möglich, die T-Zellen zu identifizieren, die das OVA-spezifische TZR-Transgen tragen. Ein erhöhter Anteil der OVA-spezifischen FoxP3⁺ Population zeigte sich nach Verabreichung der OVA-IT im

Vergleich zur Placebo-Behandlung im Blut, in der Lunge und im regionalen Lymphknoten (Abbildung 23)

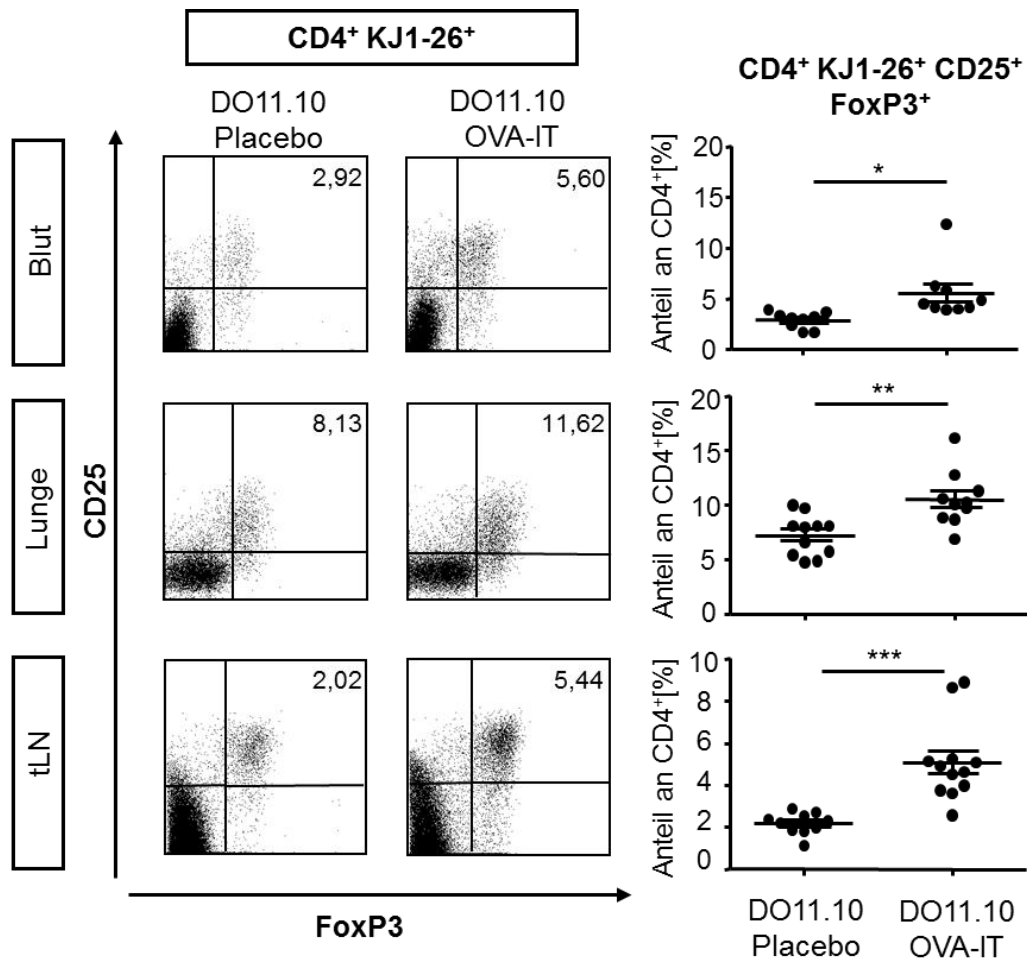


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse von Blut-, Lungen- und Lymphknoten-Zellen. Die Durchführung von OVA-IT in DO11.10 Mäusen führt zum Anstieg der OVA-spezifischen CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺Tregs.

Aus den DO11.10 Mäusen wurden nach OVA-IT oder Placebo-Behandlung und anschließender Provokation Blut, Lungen und tracheale Lymphknoten entnommen und daraus Zellsuspensionen gewonnen. Diese wurden anschließend mit einem Antikörper gegen den OVA-spezifischen TZR (KJ1-26) und mit anti-CD4, anti-CD25 und anti-FoxP3 markiert. Durch durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der KJ1-26⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Auf der linken Seite ist exemplarisch die durchflusszytometrische Messung der Lungenzellen einer Maus als Dotplot angegeben. Im Dotplot sind die OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen dargestellt, die auf ihre CD25- (Y-Achse) und FoxP3-Markierung (X-Achse) untersucht wurden, dabei grenzt der Quadrant rechts oben die KJ1-26⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen ein. Das Punktdiagramm rechts verschafft einen Überblick über die Gesamtauswertung mehrerer Tiere. Ein Datenpunkt im Diagramm steht für die ermittelte Frequenz OVA-spezifischer Tregs eines Tieres. Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt (n=9-12).

$p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$. tLN = trachealer Lymphknoten.

Die IL-10-produzierenden Tr1-Zellen wurden ebenfalls mit dem Durchflusszytometer untersucht. Es konnte nach OVA-IT eine Erhöhung der Frequenz von $CD4^+ IL-10^+$ im Vergleich zur Placebo-Behandlung detektiert werden. Die gleichzeitige Färbung mit IFN- γ und FoxP3 in Abbildung 24 verdeutlicht, dass die induzierten $IL-10^+$ T-Zellen nicht FoxP3 $^+$ sind, aber überwiegend IFN- γ produzieren.

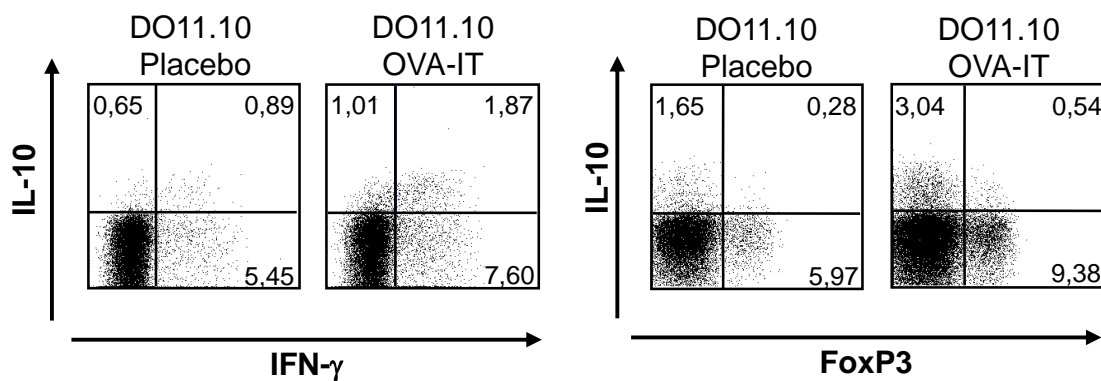


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse von Lungenzellen. Die Durchführung der OVA-IT von DO11.10 Mäusen führte zum Anstieg der $CD4^+ IL-10^+$ und $CD4^+ IFN-\gamma^+$ T-Zellen. Die induzierten $IL-10^+ CD4^+$ T-Zellen exprimieren kein FoxP3, sondern produzieren überwiegend IFN- γ .

48 h nach der letzten Provokation wurden aus den behandelten DO11.10 Mäusen Lungenzellen isoliert und diese nach Stimulation mit den Antikörpern anti-CD4, anti-IL-10, anti-IFN- γ und anti-FoxP3 markiert. Durch durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zellpopulationen ermittelt. In den Abbildungen sind $CD4^+$ T-Zellen gezeigt. Durch die Gegenüberstellung der IL-10- und IFN- γ -Markierung in den linken Dotplots und die IL-10 und FoxP3 im rechten Dotplot können doppelpositive Populationen detektiert werden. Exemplarisch sind jeweils repräsentative Grafiken eines Tieres der jeweiligen Gruppe dargestellt.

3.6 Immuntherapie ist teilweise effektiv in Abwesenheit von natürlichen regulatorischen T-Zellen

3.6.1 Eine Induktion von regulatorischen T-Zellen ist direkt nach Gabe der Immuntherapie sichtbar

Im weiteren Verlauf der Experimente sollte die Rolle der natürlichen Tregs (nTregs) überprüft werden. Dazu wurden DO11.10-TZR-transgene Mäuse mit einem zusätzlichen RAG-Knockout (DO11.10 RAG^{-/-}) verwendet und im gleichen Modell wie DO11.10 Mäuse untersucht. Durch diesen Stamm war es möglich, die Effekte der OVA-IT in Abwesenheit von im Thymus gereiften nTregs zu untersuchen (156). Durch die Einführung des spezifischen TZR-Transgens und dem Fehlen der somatischen Rekombination durch Ausschaltung des *rag 2*-Gens ist die Entwicklung der FoxP3-exprimierender nTregs nicht möglich (siehe 2.2.1.4, Material und Methode). Nach der Durchführung der OVA-IT oder Placebo-Behandlung wurde eine Analyse der Blutzellen auf FoxP3⁺ Tregs durchgeführt. Wie erwartet, war in Placebo-behandelten Tieren keine Treg-Population detektierbar. In der OVA-IT-Gruppe konnten OVA-spezifische CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Durchführung der OVA-IT eine *de-novo*-Induktion spezifischer regulatorischer T-Zellen (iTregs) gegen das Allergen hervorruft.

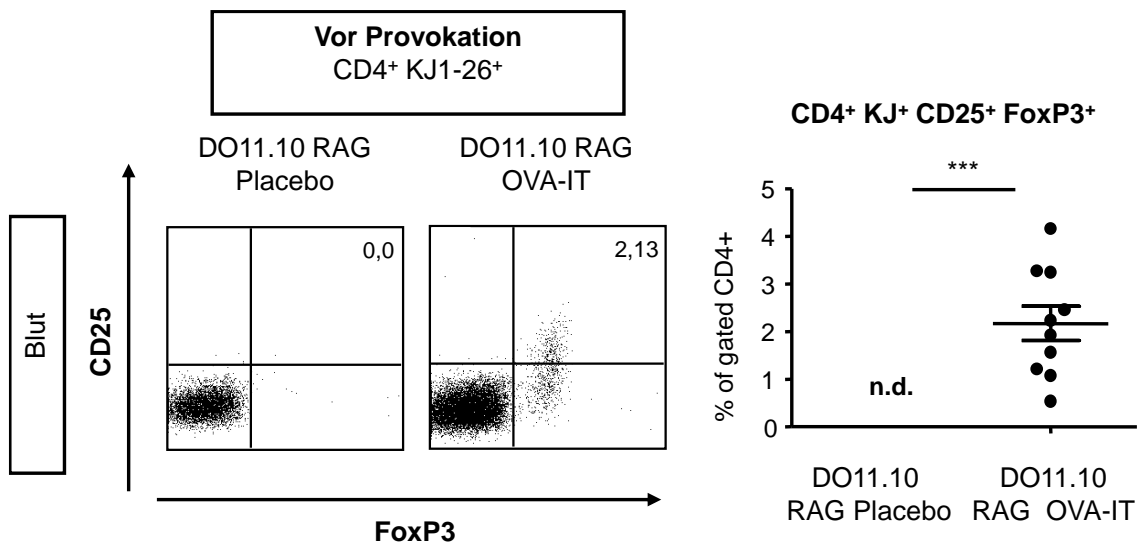


Abbildung 25: Die Durchführung der OVA-IT von DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen, die keine natürlichen Tregs (nTregs) besitzen, führt zum Anstieg der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺Tregs im Blut.

Nach der OVA-IT oder Placebo-Behandlung, noch vor der inhalativen Provokation, wurde den DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen Blut entnommen und die zellulären Bestandteile daraus isoliert. Diese

wurden anschließend mit den Antikörpern KJ1-26, anti-CD4, anti-CD25 und anti-FoxP3 markiert. Durch eine durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der KJ1-26⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Bereits vor der Provokation mit OVA stieg die Frequenz der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs im Blut der OVA-IT behandelten Tiere im Vergleich zur Placebo-Kontrolle an. Links dargestellt sind repräsentative Dotplots eines Tieres aus der jeweiligen Gruppe. Das Punktdiagramm rechts davon veranschaulicht die Gesamtauswertung. Ein Datenpunkt im Diagramm steht für die ermittelte Frequenz eines Tieres. Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt, n=9-12. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

KJ1-26 = Antikörper gegen den OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptor DO11.10-transgener Mäuse

3.6.2 Immuntherapie reduziert die Atemwegsüberempfindlichkeit effektiv in Abwesenheit von nTregs

Die Messung der AHR erfolgte 48 h nach der letzten Provokation. Sie zeigte einen starken Anstieg des Atemwegswiderstandes in der Placebo-Gruppe. In Tieren nach Durchführung der OVA-IT konnte dagegen nur ein geringer Anstieg des Atemwegswiderstandes, vergleichbar mit dem der PBS-provozierten Gruppe, verzeichnet werden. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten konnte durch die IT zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert werden. Demnach ist die Effektivität der verabreichten Immuntherapie nur teilweise durch die Abwesenheit der nTregs beeinträchtigt.

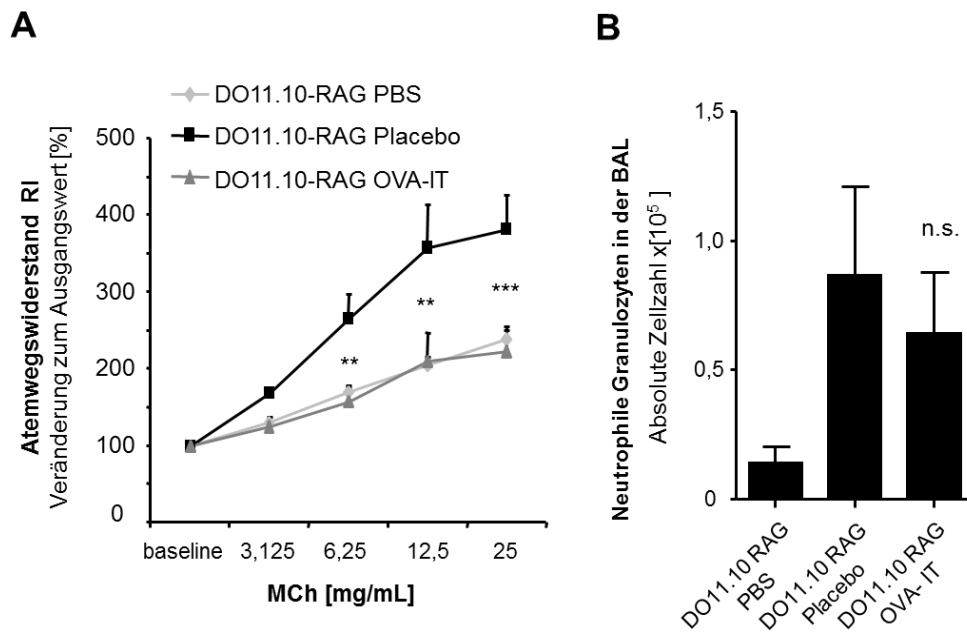


Abbildung 26: Messung der Lungenfunktion unter steigenden Dosen von Methacholin und absolute Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL von DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen. Behandlung mit OVA-IT führt zur Verringerung des Atemwegswiderstandes, jedoch nicht zu signifikant geringeren Zellzahlen von Neutrophilen in der BAL.

DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse wurden mit OVA-IT oder Placebo behandelt (DO11.10 RAG OVA-IT bzw. Placebo) und danach mit OVA provoziert. Als Negativ-Kontrolle wurden DO11.10 RAG^{-/-} mit PBS (DO11.10 RAG PBS) provoziert. Nach der letzten Provokation wurde der Atemwegswiderstand gemessen. **A**, Provokation mit OVA erhöhte den Atemwegswiderstand in Placebo-behandelten Tieren, wohingegen die OVA-IT-Gruppe eine niedrigere AHR aufwies. **B**, In der Placebo-Gruppe führte die OVA-Provokation zu einer erhöhten absoluten Anzahl an neutrophilen Granulozyten im bronchoalveolären Raum, nach OVA-IT war die Zahl der Neutrophilen nicht signifikant niedriger. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei separaten Experimenten \pm SEM, n=4-10 pro Gruppe. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$.

BAL = Bronchoalveoläre Lavage

Um die iTreg-Antwort nach OVA-IT weiter zu untersuchen, wurde die OVA-spezifischen iTregs nach Provokation analysiert. Wie in Abbildung 27 dargestellt, führte die Provokation der Atemwege mit OVA zu einem geringen Anstieg der iTregs in Lunge, Lymphknoten und im Blut der Placebo-behandelten Tiere. Die Mäuse, die eine OVA-IT erhalten hatten, zeigten vergleichsweise höhere Frequenzen an OVA-spezifischen FoxP3⁺ Tregs.

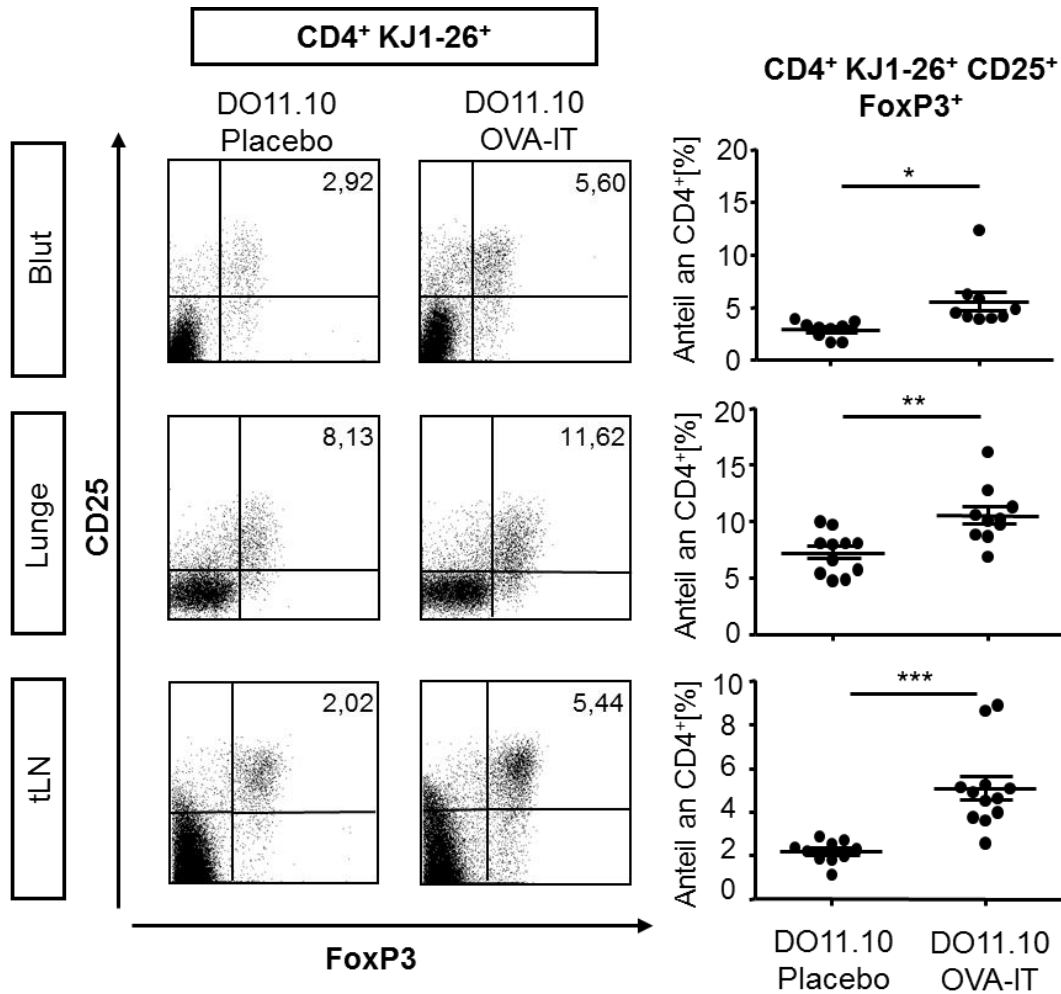


Abbildung 27: Die prophylaktische Behandlung mit OVA-IT führt in DO11.10 RAG Mäusen zum Anstieg der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs in der Peripherie.

DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse wurden OVA-IT oder Placebo behandelt und mit OVA (DO11.10 RAG OVA-IT bzw. Placebo) provoziert. Zur Kontrolle wurden DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse mit PBS provoziert (DO11.10 RAG PBS). Am finalen Versuchstag wurden aus den DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen Blut, Lungen und tracheale Lymphknoten entnommen und davon Zellsuspensionen gewonnen. Diese wurden anschließend mit den Antikörpern anti-CD4, anti-CD25 und anti-FoxP3 markiert. Durch eine durchflusszytometrische Analyse wurden die prozentualen Anteile der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Nach OVA-IT waren die FoxP3⁺ Zellen in den überprüften Organen nachweisbar. Links sind exemplarisch repräsentative Dotplots eines Tieres der jeweiligen Gruppe dargestellt. Rechts davon zeigen Punktdiagramme die Gesamtauswertung. Ein Datenpunkt im Diagramm steht für die ermittelte Frequenz eines Tieres (n=8-11). Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt. p < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001.

tLN = trachealer Lymphknoten

3.6.3 Die durch Immuntherapie induzierten IL-10-produzierenden T-Zellen weisen überwiegend eine Produktion von IFN- γ auf

Um zu klären, ob das Vorhandensein von nTregs für die Induktion von IL-10-produzierenden T-Zellen von Bedeutung ist, wurde eine intrazelluläre Zytokin-Färbung von Lungenzellen der DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse durchgeführt. Der prozentuale Anteil der CD4⁺ IL-10⁺ war nach OVA-IT im Vergleich zur Placebo-Behandlung erhöht. Eine gleichzeitige Markierung mit anti-IFN- γ und anti-FoxP3 verdeutlicht, dass IL-10-produzierende T-Zellen nicht FoxP3⁺ sind, aber überwiegend IFN- γ sezernieren. Auffällig in diesem Modell ist die starke Frequenzerhöhung der CD4⁺ IFN- γ ⁺ nach OVA-IT in der Lunge auf annähernd ca. 28 %.

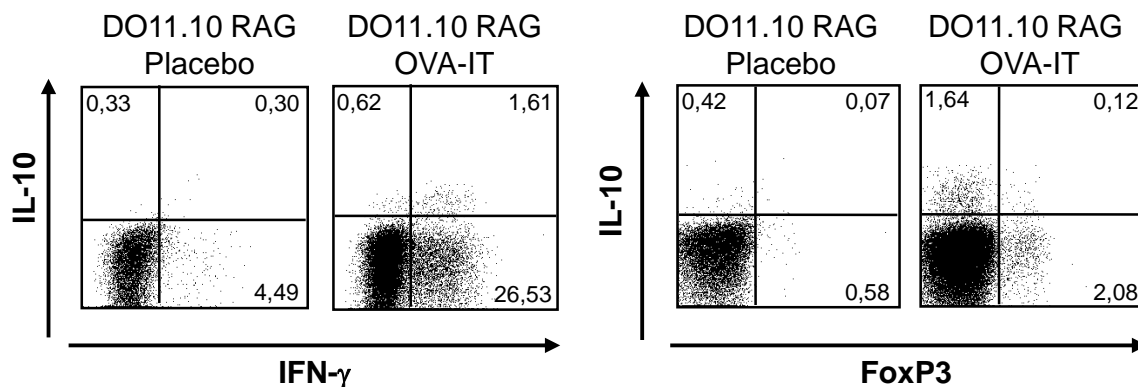


Abbildung 28: FACS-Analyse von Lungenzellen. Die prophylaktische Behandlung mit OVA-IT von DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen ohne nTregs führt zum Anstieg der CD4⁺ IL-10⁺ und CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die induzierten IL-10⁺ T-Zellen sind jedoch nicht FoxP3⁺ sondern produzieren überwiegend IFN- γ .

Nach der letzten Provokation wurden aus den behandelten DO11.10 Mäusen Lungenzellen isoliert und diese nach Stimulation mit den Antikörpern anti-CD4, anti-IL-10, anti-IFN- γ und anti-FoxP3 markiert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zellpopulationen ermittelt. In den Dotplots sind die CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Durch die Gegenüberstellung der IL-10- und IFN- γ -Markierung in den linken Dotplots und IL-10 und FoxP3 in den rechten Dotplots können doppelpositive Populationen detektiert werden. Die IL-10-produzierenden T-Zellen exprimieren kein FoxP3. Sie produzieren jedoch überwiegend IFN- γ ⁺. Es sind jeweils repräsentative Grafiken dargestellt, n=9-11. Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt.

Die Abwesenheit der nTregs in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen beeinflusst die Effektivität der OVA-IT nur teilweise. Die Induktion der FoxP3⁺ T-Zellen und der IL-10-Produktion in CD4⁺ T-Zellen findet in diesem Modell ebenfalls statt. Die Frequenzen der IL-10-produzierenden T-Zellen sind jedoch im Vergleich zu DO11.10 Tieren nach OVA-IT verringert, was auf die Bedeutung der nTregs bei der Induktion von IL-10-produzierender Tregs hinweist. Auffällig ist ebenfalls, dass das Fehlen der nTregs nach OVA-IT durch eine starke Th1-Antwort begleitet ist.

3.7 Die Wirksamkeit der Immuntherapie ist nach Depletion von FoxP3⁺ T-Zellen in DEREg Mäusen nur partiell eingeschränkt

Um die Rolle von FoxP3⁺ Treg insgesamt (nTregs und iTregs) bei der SIT zu beurteilen, wurden DEREg Mäuse (*DEpletion of REGulatory T cells*) in einem Mausmodell des allergischen Asthmas und OVA-IT (beschrieben in 2.2.1.3, S.30) unter Depletion der FoxP3⁺ Tregs behandelt. DEREg Mäuse tragen unter dem FoxP3-Promotor ein Transgen für den Diphterietoxin-Rezeptor sowie für das *green fluorescent protein* (GFP). Damit ist es einerseits möglich, mit Hilfe des Diphterietoxins (DT) einen konditionalen *Knockout* von FoxP3⁺ Zellen durchzuführen und andererseits diesen auch ohne intrazelluläre Färbung der FoxP3⁺ Zellen durch das fluoreszierende GFP nachzuweisen. In diesem Modell benutzte man dieses Verfahren, um zum Zeitpunkt der Immuntherapie gezielt die FoxP3-exprimierenden Zellen dieser Tiere mit DT zu depletieren. 48 h nach der ersten DT-Gabe war die Population der CD4⁺ GFP⁺ FoxP3⁺ um ca. 69 % in DEREg Mäusen verringert (Abbildung 29). In DT-behandelten BALB/c Mäusen blieb die Frequenz dieser Zellen unverändert. Nach der zweiten Gabe des DT war im Blut die Population der CD4⁺ GFP⁺ FoxP3⁺ noch weiter vermindert, jedoch waren CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen nachweisbar, bei denen keine GFP-Expression detektierbar war. Die Rückkehr der FoxP3⁺ Tregs variierte nach der Depletion in den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abbildung 29).

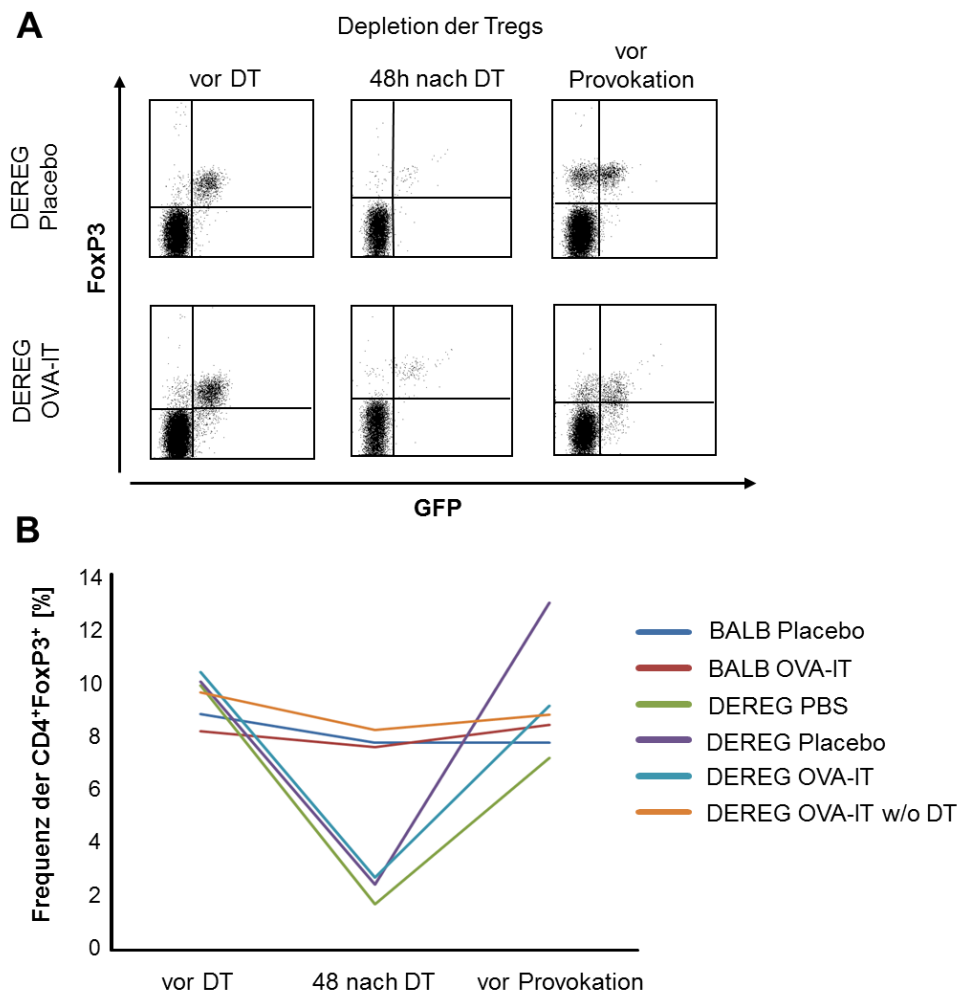


Abbildung 29: Depletion der FoxP3⁺ Zellen im Blut nach Gabe von Diphtherietoxin in DEREK Mäusen. Die einmalige Gabe von Diphtherietoxin verringert die Frequenz der CD4⁺ FoxP3⁺.

DEREG und BALB/c Mäuse wurden mit PBS oder OVA/Alum sensibilisiert und vor Durchführung der OVA-IT mit DT behandelt. Eine weitere DT-Gabe folgte mit der zweiten s.c. Injektion von OVA. Vor der ersten DT-Injektion, 48 h nach der ersten DT-Behandlung und vor der Provokation wurde die Frequenz der Tregs im Blut untersucht. **A** zeigt die durch FACS-Analyse gewonnenen repräsentativen Dotplots von Blutproben aus DT-behandelten DEREK Mäusen. **B**, Verlauf der Frequenzen im Blut von DEREK und BALB/c Mäusen, n=4-6. Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind gezeigt.

DT = Diphtherietoxin; DEREK = *Depletion of regulatory T cells*

Um die Auswirkungen der Depletion der FoxP3⁺ Tregs auf die AHR und die Atemwegsentzündung zu untersuchen, wurde 48 h nach der letzten Provokation die Lungenfunktion gemessen und die BAL durchgeführt. Die Lungenfunktion zeigte, dass durch die DT-Depletion der Atemwegwiderstand von OVA-sensibilisierten, -provozierten und Placebo-behandelten DEREK Mäusen (DEREG Placebo) im Vergleich zur

Wildtypkontrolle (BALB/c Placebo) erhöht war. Nach OVA-IT wiesen DEREK Mäuse (DEREG OVA-IT) bei niedrigeren MCh-Dosen einen nur geringen Anstieg des Atemwegswiderstandes auf. Im Vergleich zu gleich-behandelten Wildtyptieren (BALB/c OVA-IT) lag der Anstieg des Atemwegswiderstandes in DEREK OVA-IT jedoch höher (Abbildung 30, A). Die Einwanderung der eosinophilen Granulozyten infolge der OVA-Provokation war nach Depletion von FoxP3⁺ Tregs begünstigt. So war die Zahl der Eosinophilen in der BAL der Placebo-behandelten DEREK Mäuse nach DT-Gabe verglichen mit der Wildtypkontrolle bei gleicher Behandlung ca. um Faktor drei erhöht. Die Eosinophilen-Anzahl in OVA-IT behandelten DEREK Tieren war jedoch im Vergleich zu Placebo-behandelten DEREK Mäusen signifikant verringert. Verglichen mit nicht Treg-depletierten DEREK Mäusen wiesen DEREK Mäuse nach OVA-IT allerdings höhere Zellzahlen auf (Abbildung 30, B).

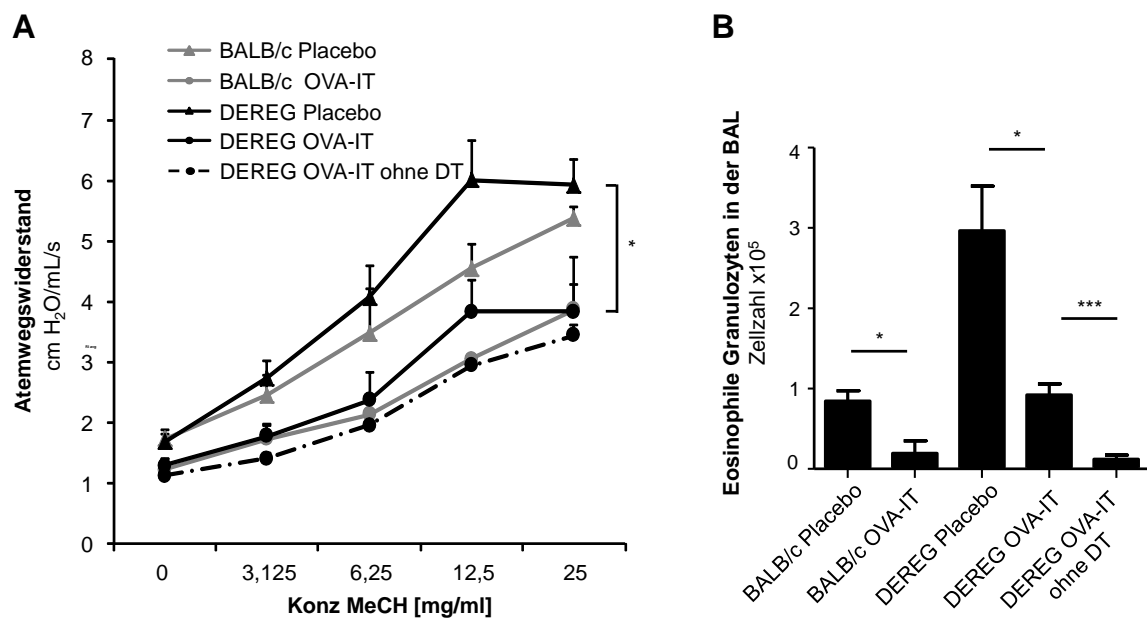


Abbildung 30: Messung der Lungenfunktion und Zellzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL nach Depletion von FoxP3⁺ T-Zellen in DEREK Mäusen. Depletion der FoxP3⁺ Zellen verursacht nur teilweise eine Aufhebung der suppressiven Effekte der IT.

DEREG und BALB/c Mäuse wurden mit PBS oder OVA/Alum sensibilisiert und vor Verabreichung der OVA-IT wurden alle Tiere bis auf eine Kontrollgruppe (DEREG IT ohne DT) mit DT behandelt. Weitere DT-Gaben erfolgten während bzw. nach OVA-IT. Alle Tiere wurden mit aerosolisiertem OVA provoziert. **A**, Die AHR war infolge der Depletion der FoxP3⁺ Tregs in OVA-sensibilisierten und -provozierten, Placebo-behandelten Tieren erhöht. Nach OVA-IT und Depletion war der Atemwegswiderstand bei 25 mg/ml MCh signifikant geringer verglichen mit der DEREK Placebo-Gruppe. **B**, Die Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL stieg nach Depletion mit DT in

Placebo-behandelten DEREГ Mäusen im Vergleich zur gleichbehandelten Wildtyp-Gruppe stark an. Im Vergleich zu DEREГ Placebo-Gruppe war die Anzahl der Eosinophilen nach OVA-IT und Depletion signifikant geringer. Ohne DT-Behandlung wurden im Vergleich zur depletierten DEREГ Mäusen weitaus niedrigere Zellzahlen nach OVA-IT detektiert. n=4-6. p<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001.

DT = Diphtherietoxin, DEREГ = Depletion of regulatory T cells

Aus diesen Resultaten geht hervor, dass FoxP3⁺ Tregs für die Suppression der allergischen Atemwegsentzündung eine entscheidende Rolle spielen. Die Zahl der Eosinophilen ist in Placebo-behandelten DEREГ Mäusen drastisch erhöht. Jedoch kommt es bei Administration von OVA-IT trotzdem zu suppressiven Effekten auf AHR und Eosinophilie. Daraus folgt, dass noch weitere Mechanismen an der toleranzinduzierenden Wirkung der SIT beteiligt sind.

3.8 Die Effekte der Immuntherapie können durch Blockade des IL-10-Signalwegs aufgehoben werden.

Anhand des chronischen Modells des allergischen Asthmas und weiterführenden Modellen zur OVA-IT konnten verschiedene Immunantworten, die bei der SIT von Bedeutung sind, analysiert werden. Die Abwesenheit von Th1-Zellen in T-bet-defizienten Tieren reduziert die Wirksamkeit der OVA-IT nicht. Das Ausschalten von nTregs in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen oder FoxP3⁺ Tregs in DEREK Mäusen, hebt die Effektivität der OVA-IT auch nur teilweise auf. Um die Frage zu klären, welche Rolle das Zytokin IL-10 bei der SIT einnimmt, wurden OVA-sensibilisierte, chronisch-provozierte Tiere zusätzlich zur OVA-IT mit einem Antikörper gegen den Interleukin-10-Rezeptor (anti-IL-10R) oder IgG aus der Ratte (rlgG) behandelt. Die anti-IL-10R-Behandlung verhindert die Wirkung des IL-10 in allen Zellen, die den IL-10R tragen. Zusätzlich wurden OVA-IT und Placebo-Behandlung ohne Antikörpermanipulation im Experiment parallel durchgeführt. Wie in Abbildung 31, A gezeigt, legt die Messung der AHR dar, dass die Blockade des IL-10-Signalwegs die protektiven Effekte der OVA-IT aufhob. Der Anstieg des Atemwegswiderstandes nach der anti-IL-10R-Behandlung war im Vergleich mit der rlgG-behandelten Kontrollgruppe erhöht. Die Gabe des rlgG hatte keinerlei Einfluss auf den Atemwegswiderstand. Zusätzlich war die vermindernde Wirkung der OVA-IT auf die Zellzahl der Eosinophilen in der BAL durch die Blockade des IL-10R in chronisch behandelten BALB/c Mäusen gebrochen (Abbildung 31, B). Die aufhebende Wirkung auf die supprimierenden Effekte der OVA-IT zeigte sich auch in der Analyse der Serumimmunglobuline. Das OVA-spezifische IgE war nach Behandlung mit anti-IL-10R im Vergleich zur rlgG-Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 31, C).

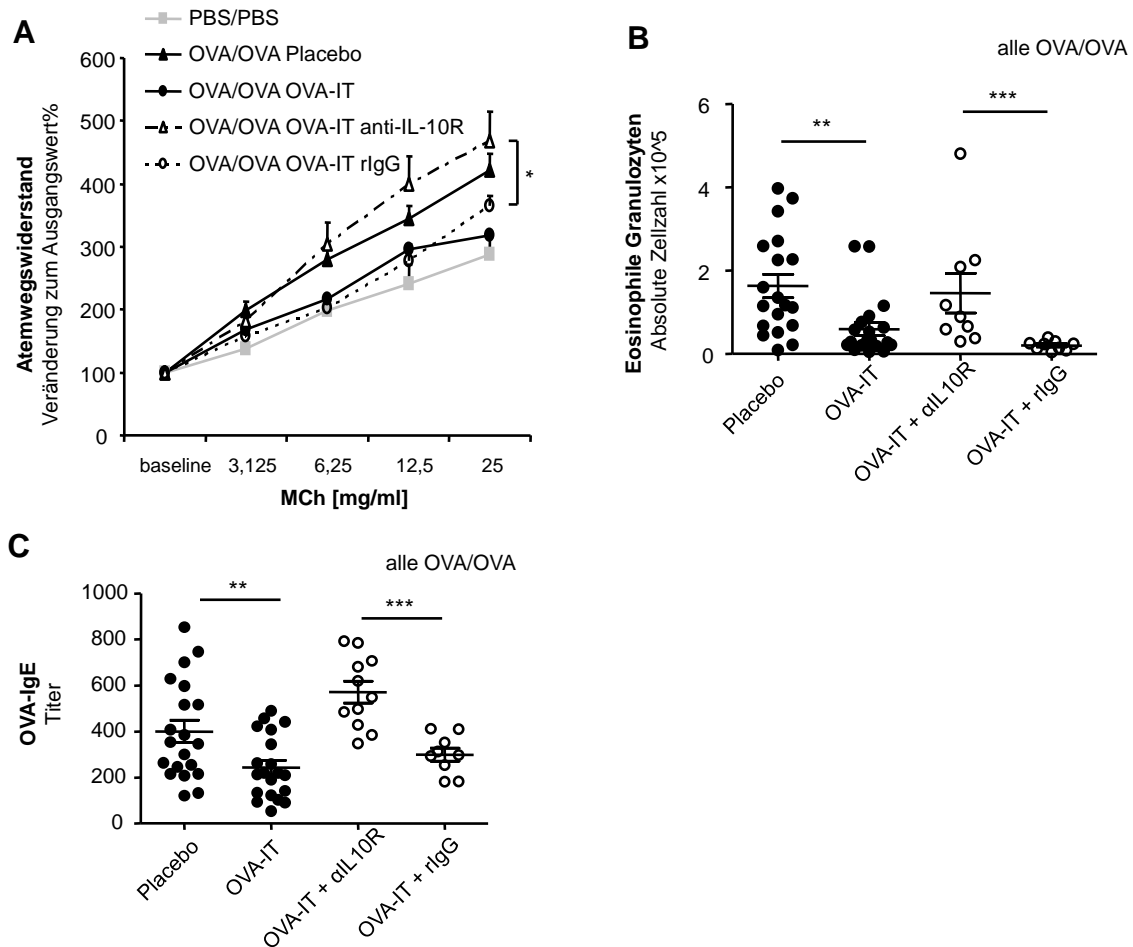


Abbildung 31: Messung der Lungenfunktion unter steigender Methacholinkonzentration, Bestimmung der Eosinophilenzahl aus der BAL und des Titers des OVA-spezifischen IgE im Serum. Die Verabreichung von anti-IL-10R bei gleichzeitiger Durchführung der OVA-IT hebt deren suppressive Wirkung auf.

Weibliche BALB/c Mäuse wurden nach chronischem Versuchsablauf behandelt. Während der Durchführung der OVA-IT wurde zweimal ein blockierender Antikörper gegen den IL-10R oder IgG von der Ratte verabreicht. In **A** ist die Messung der AHR dargestellt. Der Anstieg des Atemwegswiderstandes nach OVA-IT war in anti-IL-10R-behandelten Mäusen im Vergleich zur rIgG-behandelten Kontrolle signifikant erhöht. **B**, Auch die Zahl der Eosinophilen Granulozyten war nach Blockade des IL-10R im Vergleich zur rIgG ebenfalls erhöht. **C**, Die Titer des OVA-IgE im Serum veranschaulichen, dass die Gabe des anti-IL-10R-Antikörpers die suppressive Wirkung der OVA-IT im Vergleich zur rIgG-Behandlung durchbrochen hat. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt, $n = 9-12$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$. i.t. = intratracheal, AHR = Atemwegsüberempfindlichkeit, BAL = Bronchoalveoläre Lavage

Die Blockade des IL-10-Signalweges ermöglicht Rückschlüsse auf die Rolle von IL-10 bei der Verringerung des Atemwegswiderstandes, der Atemwegsentzündung und des Umbaus im Lungengewebe. Deshalb wurde der Einfluss der IL-10R-Blockade auf die Atemwegsentzündung und das *airway remodeling* ebenso untersucht.

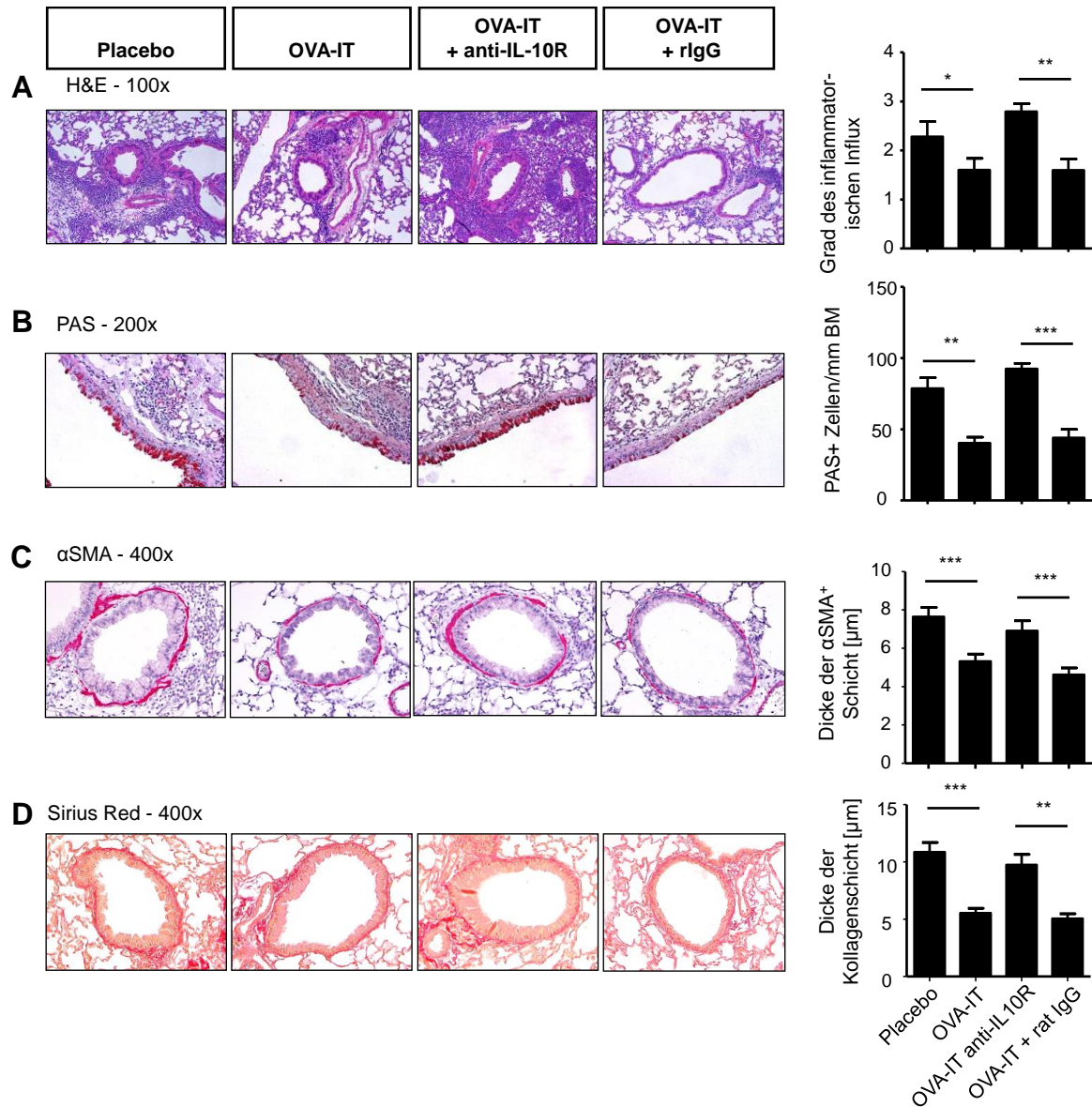


Abbildung 32: Unter Behandlung mit anti-IL-10R wird die protektive Wirkung auf die Atemwegsentzündung der Immuntherapie aufgehoben.

Die Lungenschnitte wurden mittels H&E, PAS-Behandlung, Sirius Red oder mit dem Antikörper gegen α -SMA gefärbt. Die dargestellten Bilder geben exemplarisch die Situation in OVA-sensibilisierten und -provozierten (OVA/OVA) BALB/c Wildtyp-Tieren wieder, die entweder Placebo-Behandlung, OVA-Immuntherapie (OVA-IT), OVA-IT mit Anti-IL-10R oder OVA-IT mit rIgG erhielten. Rechts davon sind Balkendiagramme zu jeder Färbung gezeigt, die die

Gesamtauswertung veranschaulichen. **A**, Zellinfiltrate in Lungenschnitten von anti-10R behandelten Tieren waren im Vergleich zu Lungenschnitten der rIgG-Kontrollgruppe signifikant erhöht. Mittelwerte aus peribronchialer und perivaskulärer Entzündungseinstufung sind dargestellt. **B**, Die Analyse der Becherzellmetaplasie auf PAS-behandelten Lungenschnitten ergab eine erhöhte Zahl der PAS⁺ Zellen nach anti-IL-10R Behandlung im Vergleich zu rIgG behandelten Lungenschnitten. **C**, Anhand der anti- α -SMA-gefärbten Schnitte wurde die Stärke der Atemwegsmuskulatur gemessen. Die glatte Muskelschicht war nach anti-IL-10R-Behandlung im Vergleich zur rIgG Kontrolle deutlich erhöht. **D**, Lungenschnitte mit *Sirius Red*-Färbung dienten zur Analyse der Kollageneinlagerung. Die Kollagenschicht um die Atemwege anti-IL-10R-behandelter Tiere war verglichen mit Atemwegen von IgG-Kontrolltieren deutlich stärker. Mittelwerte +/- SEM, n = 9-12. p < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *, p<0,05; **, p<0,01 und ***, p<0,001.

α -SMA = *alpha-smooth muscle actin*, H&E = Hämatoxylin-Eosin, PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion; rIgG = IgG-Antikörper aus Rattenserum

Die Evaluation der H&E-gefärbten Lungensektionen diente zur Einstufung des peribronchialen und perivaskulären Zellinfluxes. In Lungen von Mäusen nach OVA-IT und anti-IL-10R-Gabe sind im Gegensatz zu Lungenschnitten aus der rIgG-behandelten Kontrollgruppe massive Akkumulationen von Entzündungszellen zu erkennen. Die Becherzellmetaplasie wurde auf PAS-behandelten Gewebesektionen durch Zählung der PAS-positiven Zellen im Bronchialepithel detektiert. Nach Gabe des Antikörpers wurden im Vergleich zur rIgG-Behandlung vermehrt mukusproduzierende Becherzellen detektiert. Anhand von *Sirius Red* gefärbten Schnitten wurde eine Auswertung der Kollageneinlagerung durchgeführt, die nach anti-IL-10R-Behandlung ebenfalls erhöht war. Die immunhistochemische Färbung auf α -SMA erbrachte in Bezug auf die Stärke der Atemwegsmuskulatur übereinstimmende Ergebnisse. Die Atemwegsmuskulatur hatte nach OVA-IT und anti-IL-10R-Behandlung eine vergleichbare Stärke wie die Muskulatur in der Placebo-behandelten Gruppe.

4 Diskussion

In den entwickelten Ländern steigen seit den letzten Jahrzehnten die Prävalenzen von allergischen Erkrankungen drastisch an (16, 165). Schätzungsweise leidet eines von fünf Individuen der Weltbevölkerung unter einer allergischen Erkrankung (166). Als Allergie wird eine Hypersensitivität des Immunsystems bezeichnet, die sich entwickelt, wenn das fehlgesteuerte Immunsystem auf harmlose Substanzen aus der Umwelt (Allergene) reagiert. Dabei kommt es zu einer schnellen Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten durch allergenspezifische IgE-Antikörper. Anschließend werden verschiedene Entzündungszellen wie Th2-Zellen und eosinophile Granulozyten angelockt, so dass letztlich eine Entzündungsreaktion entsteht, die milde Formen, aber auch gravierende Ausmaße annehmen kann. Die Symptome können je nach Exposition stark variieren und medikamentös behandelt werden. Die derzeit zugelassenen Therapien für Allergiker und Asthmapatienten werden meist topisch eingesetzt und lindern nur vorübergehend die Beschwerden. Doch trotz der erheblichen Fortschritte in der Behandlung allergischer Erkrankungen und des Asthmas in den letzten Jahrzehnten sind ca. 5-10 % der Patienten nur unzureichend therapiert (102).

Neben diesen symptomatischen Therapieansätzen kommt auch die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) zum Einsatz. SIT ist eine Behandlung, bei der das sensibilisierende Allergen in Form eines Allergenextraktes oder als modifiziertes Antigen (Allergoid) subkutan oder sublingual zunächst in ansteigenden Dosen verabreicht wird. Sie ist die einzige kausale Therapie und erzielt eine Langzeittoleranz gegenüber dem Allergen (109). Die SIT verringert das Risiko, Asthma zu entwickeln (112, 113) und verhindert Neusensibilisierungen durch andere Allergene (114). Sie verringert den Bedarf an medikamentösen Therapien und kann somit die Kosten für Gesundheitsausgaben senken (110, 111). Die SIT wäre daher eine zu favorisierende Therapieoption. Da sie aber auch mit Risiken verbunden ist, ist die SIT bei Patienten mit schwerem allergischem Asthma oder Allergikern mit vielen Sensibilisierungen umstritten (102, 167, 168). Eine evidenzbasierte Bewertung des aus einer SIT resultierenden Behandlungserfolges ist aufgrund der Komplexität der allergischen Erkrankungen und der Vielzahl der eingesetzten Allergene erschwert. Weiterhin ist die Zahl von immunologischen Markern, die den Therapieerfolg anzeigen, unzureichend. Um den Therapieverlauf zu überwachen, werden verlässliche, robuste und reproduzierbare Marker benötigt, um die Sicherheit und den Erfolg der SIT zu garantieren. Zudem verringert die Variabilität der verschiedenen Studien in Behandlungsablauf, Dosierung und verabreichten Allergenextrakten die Vergleichbarkeit von klinischen Studien zur SIT. Nach den Leitlinien der DGAKI (Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie) wird die subkutane Form der SIT (SCIT) aufgrund der derzeitigen Studienlage bei Patienten mit

allergischer Rhinokonjunktivitis, kontrolliertem intermittierendem bis geringgradigem IgE-vermittelten Asthma als empfehlenswert eingestuft (169).

Da die SIT die Möglichkeit bietet bei allergischen Erkrankungen in die Pathogenese einzugreifen und nicht allein symptomatisch zu behandeln, steht sie im Fokus verschiedener Forschungsarbeiten. Welche Mechanismen der suppressiven Wirksamkeit zugrunde liegen, ist Gegenstand aktueller Studien. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der SIT sowie zugrunde liegende Mechanismen und zelluläre Zusammenhänge anhand von murinen Modellen beleuchtet.

4.1 Evaluation eines chronischen Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung mit allergenspezifischer Immuntherapie

Bisher veröffentlichte Mausmodelle setzten die SIT prophylaktisch in einem Modell der akuten Atemwegsentzündung ein. Dabei wurden subkutane und auch intranasale (i.n.) Allergenapplikationen vor der Sensibilisierung bzw. vor der Provokation untersucht und vermittelten Toleranz gegenüber dem applizierten Allergen (116, 117, 119, 160–162, 170, 171). Jedoch spiegelten diese Modelle nicht die Situation im Menschen wider. Das in dieser Arbeit etablierte Mausmodell ist das erste experimentelle Modell des allergischen Asthmas, bei dem bei gleichzeitiger Provokation und entstandener chronischer Atemwegsentzündung eine subkutane SIT durchgeführt wurde. Im Gegensatz zu Modellen mit prophylaktischer Behandlung kann in diesem Modell die therapeutische Suppression der allergischen Reaktion untersucht werden.

In klinischen Studien konnte eine Unterdrückung der Th2-Zytokine (133) und eine niedrigere Expression vom Th2-Transkriptionsfaktor GATA-3 nach SCIT detektiert werden (139). Durch diese Reduktion der Th2-Antwort wird die allergische Entzündungsreaktion supprimiert und weitere Th2-vermittelte Symptome wie AHR und Akkumulation von eosinophilen Granulozyten verringert. Im Modell der SIT für chronisches Asthma wurde die bereits bestehende Th2-Antwort ebenfalls durch SIT effektiv unterdrückt. Die, als IL-5-produzierende CD4⁺ T-Zellen nachgewiesenen, Th2-Zellen waren nach Durchführung der SIT im etablierten Modell verringert. Auch die AHR und die allergische Atemwegsentzündung waren in therapierten Mäusen reduziert.

Ob Therapien neben der Bekämpfung der Atemwegsentzündung und der AHR auch die strukturellen Veränderungen in den Atemwegen, das sogenannte *airway remodeling*, verringern können, ist eine wichtige Fragestellung in der Asthmaforschung. Der strukturelle Umbau des Lungengewebes resultiert aus der Verdickung der Atemwegswand durch eine

Kollageneinlagerung, der Becherzellmetaplasie und der Ausdehnung der Atemwegsmuskulatur (näher beschrieben in 1.1). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide (172), Allergenkarenz oder Leukotrienantagonisten (173) in der Lage sind, die Verdickung der Basalmembran zu verringern (174, 175). In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die Verdickung der Bronchialmuskulatur und die Kollageneinlagerung im Mausmodell durch SIT zu reduzieren bzw. zu verhindern. Dieses Resultat weist auf ein starkes suppressives Potential der SIT hin. Um dieses Potential der SIT besser nutzen zu können, ist die Aufklärung der zugrunde liegenden Suppressionsmechanismen unerlässlich, deshalb wurde in weiteren Experimenten auf die erwähnten Regulationsmechanismen eingegangen, um deren Bedeutung für die Therapie zu ermitteln.

4.2 Immunglobuline und Th1-Zellen spielen für die Effektivität der Immuntherapie keine Rolle.

4.2.1 Effekte der allergenspezifischen Immunglobuline nach SIT

In Patienten, in denen eine SIT erfolgreich durchgeführt wurde, wurden erhöhte Titer von Antikörpern entdeckt. Diesen „blockierenden Antikörpern“ schrieb man die suppressive Wirkung der SIT zu (123, 176), da mit der Zunahme dieser spezifischen Antikörper die IgE-Spiegel im Blut der Allergiker abnehmen (177). Insbesondere eine Vermehrung der spezifischen IgG4-Antikörper, aber auch der IgG1-Antikörper und eine leichte Erhöhung der IgA-Titer sind nach SIT im Menschen dokumentiert worden (145, 178). Es wurde postuliert, dass besonders IgG4 mit dem IgE um das Allergen konkurriert und somit die Kreuzvernetzung und Degranulation der Mastzellen verhindert (124). Zusätzlich wirkt die Bindung des humanen IgG4 an den niedrig-affinen IgGR (Fc γ RBII) auf Mastzellen und die darauffolgende Signalkaskade direkt inhibierend auf die Mastzellaktivierung (125). In B-Zellen bewirkt die Aktivierung des Fc γ RBII zusätzlich eine Blockade der IgE-Produktion (126).

Nach Durchführung der SIT im Mausmodell wurden geringere Titer des spezifischen IgE festgestellt und erhöhte Titer des OVA-spezifischen IgG1 detektiert. Im Vergleich zu dieser raschen Absenkung der IgE-Titer im Modell ist eine IgE-Senkung in Individuen nach SIT erst nach Monaten, Jahren oder in manchen Fällen gar nicht detektierbar (136, 164, 177). Das IgG1 der Maus entspricht strukturell und funktionell dem humanen IgG4 (179), somit könnten die erhöhten Titer an murinem IgG1, die im Rahmen dieser Dissertation nach einer SIT

nachgewiesen werden konnten, mit der Verminderung der allergischen Symptome in Zusammenhang stehen. Eine inhibierende Aktivität der allergenspezifischen IgG-Antikörper auf das IgE (180) ist bereits in Probanden nach SIT nachgewiesen worden, dennoch wird die Rolle der Immunglobuline in der SIT kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen, dass Immunglobuline und B-Zellantworten nicht ausschlaggebend für die Wirkung der SIT sind. Dabei wird postuliert, dass der Effekt einer Bindung des IgG4 an den Fc γ RIIB für die Wirkung der SIT von marginaler Bedeutung ist (181). Auch im Mausmodell ist die Wirkung von SIT in Abwesenheit von Fc γ RIIB- und Fc γ RI/Fc γ RIII-Signalwegen nicht verhindert. Selbst bei Verlust der spezifischen IgG- und IgA-Antwort und sogar der kompletten B-Zell-Funktion ist eine Suppression durch SIT immer noch möglich (171). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass weitere Regulationsmechanismen an der Wirkung der SIT beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden deshalb die T-Zell-vermittelten Immunantworten nach SIT untersucht.

4.2.2 Eine Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung einer Th1-Antwort ist für die Effektivität der SIT nicht von Bedeutung.

Als weiterer Suppressionsmechanismus der SIT wurde die Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses zugunsten der Th1-Antwort beschrieben (130). Jahrzehntlang galt die Ansicht, dass in gesunden Individuen ein Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-basierten Immunantworten vorherrscht. In Asthmatikern hingegen sei dieses Gleichgewicht in Richtung der Th2-Reaktion verschoben (34). Bekräftigt wurde dieses Paradigma durch die gegenseitige zytokinabhängige Regulation von Th1-Zellen und Th2-Zellen (44, 131). Auch die Aktivitäten der Haupttranskriptionsfaktoren der beiden T-Zell-Populationen bestärkten diese These, da sich der Transkriptionsfaktor T-bet in Th1-Zellen und die Th2-Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3 in einer Balance befinden, welche für die T-Zellpolarisierung entscheidend ist (45). Entsprechend dieser Vorstellung wurde für die SIT postuliert, dass es durch die verstärkte Produktion von IFN- γ durch Th1-Zellen zu einer Unterdrückung der Th2-Antwort kommt (134, 135). Die Detektion von erhöhten IFN- γ -Spiegeln im Blut therapierter Allergiker bekräftigte diese Ansicht (136, 138). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine verstärkte Induktion der Th1-Antwort im chronischen Modell nachgewiesen werden. Nach SIT waren in Lunge und regionalem Lymphknoten der Tiere erhöhte Frequenzen der IFN- γ produzierenden T-Zellen zu erkennen (Abbildung 16).

Dieses sogenannte Th2-Paradigma hat sich mit der näheren Untersuchung der Atemwegsentzündung und der Entdeckung neuer T-Zellpopulationen in den letzten Jahren gewandelt. Th1-Zellen können der allergischen Entzündung nicht nur entgegenwirken,

sondern auch an der Entwicklung einer Atemwegsentzündung im Mausmodell beteiligt sein (46, 47). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Th1-Zellen nicht geeignet sind, Th2-Zellen im Asthma zu kontrollieren (182, 183) und sogar den Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge verursachen können (38). Die neutrophile Atemwegsentzündung kommt meist in Asthmapatienten vor, die unter schwerem Asthma leiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Th1-Antwort für die SIT in T-bet-defizienten Mäusen untersucht, die keine funktionelle Th1-Antwort generieren können (151). Entsprechend des Th2-Paradigmas entwickeln T-bet^{-/-} Tiere zwar spontan eine Atemwegsentzündung (184). Dennoch hatte eine SIT in diesen Mäusen im Asthmodell im gleichen Maße protektive Effekte auf die AHR und die Th2-vermittelte Atemwegsentzündung wie in Wildtypkontrolltieren. So reduzierten sich auch ohne funktionelle Th1-Antwort nach SIT der Atemwegswiderstand in der Lungenfunktion, die eosinophile Atemwegsentzündung, die Spiegel der Th2-Zytokine und der IgE-Spiegel im Serum. Im Vergleich zu Wildtypen war nach SIT in T-bet^{-/-} Tieren eine erhöhte Frequenz von Th17-Zellen in der Lunge detektierbar. Die Ursache hierfür ist jedoch noch nicht bekannt und sollte weiter untersucht werden. Dieser Befund in T-bet^{-/-} Mäusen lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Th1-Antwort durch SIT zwar induziert wird, diese für die Effektivität und Wirksamkeit der SIT jedoch entbehrlich ist.

4.3 Durch Immuntherapie entstehen induzierte regulatorische T-Zell-Antworten.

Die Entstehung allergischer Erkrankungen wird oft durch eine mangelhafte Abwehrreaktion der fehlgeleiteten allergenspezifischen Th2-Antwort erklärt und mit der Dysfunktion wichtiger Toleranzmechanismen des Immunsystems in Verbindung gebracht. Bei der immunologischen Toleranz spielen insbesondere regulatorische T-Zellen (Tregs) eine wichtige Rolle, die nach ihrer Entstehung in adaptive bzw. induzierte (iTregs) und natürliche regulatorischen T-Zellen (nTregs) unterschieden werden. Des Weiteren werden Tregs durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 eingeteilt (siehe Kapitel 1.1.3) (60, 61), der als Haupttranskriptionsfaktor der CD4⁺ CD25⁺ Tregs fungiert und als spezifischer Marker für murine nTregs dient.

iTregs sind heterogene Zellen, die sowohl FoxP3⁺ als auch FoxP3⁻ sein können. Die Expression von FoxP3 und die Treg-vermittelten Regulationsmechanismen sind in Asthmapatienten nachweislich verringert (82). Tregs von Atopikern sind außerdem funktionell beeinträchtigt und können Effektorzellen nicht effizient unterdrücken (83).

Tr1-Zellen gehören zu FoxP3⁻ iTregs, die sich durch die Produktion regulatorischer Zytokine auszeichnen. Sie produzieren vor allem das immunmodulatorische Zytokin IL-10 und sind in Allergikern im Vergleich zu gesunden Individuen vermindert (77). Diese Befunde legen die Forderung nach Therapiestrategien nahe, die diese körpereigenen Toleranzmechanismen positiv beeinflussen. SIT bietet die Möglichkeit, durch verschiedene Mechanismen diese Toleranz gegen ein bestimmtes Allergen wiederherzustellen.

4.3.1 Induktion von FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen

FoxP3⁺ Tregs spielen bei der Regulation von Immunantworten eine wichtige Rolle. Eine Induktion dieser Zellen wird daher als Wirkmechanismus der SIT diskutiert. In vielen klinischen Studien zur SIT stehen FoxP3⁺ Tregs deshalb im Fokus und wurden im Blut der Allergiker untersucht (102, 141, 146, 185). Auch in der Nasenschleimhaut von Allergikern mit einer allergischen Rhinitis konnte nach Graspollenimmuntherapie eine erhöhte Anzahl von CD4⁺, CD25⁺ und FoxP3⁺ Zellen nachgewiesen werden (142). Jedoch sind erhöhte Frequenzen von FoxP3⁺ Tregs im Blut therapierter Allergiker nicht immer und meist erst ein Jahr nach Beginn der SIT nachweisbar (146). Somit können sie nicht als Marker für die Wirksamkeit der SIT dienen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Induktion der FoxP3⁺ Tregs infolge SIT nachgewiesen, indem eine Erhöhung der Frequenzen an FoxP3⁺ Tregs in den regionalen Lymphknoten nach OVA-IT im chronischen Mausmodell detektiert wurde. Das DO11.10 Modell wurde genutzt, um die OVA-spezifische T-Zell-Antwort nach SIT intensiver zu untersuchen. Auch in DO11.10 Mäusen ist eindeutig eine Induktion der OVA-spezifischen FoxP3⁺ Tregs nachweisbar. Des Weiteren wurden die Effekte der SIT auch in Abwesenheit von nTregs in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen untersucht. In unbehandelten DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen war, wie erwartet, keine CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Population nachweisbar. Nach OVA-IT wurden in diesen Tieren jedoch ebenfalls erhöhte Frequenzen von FoxP3⁺ Tregs gefunden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass es infolge der SIT zur Entstehung einer induzierten Antwort von FoxP3⁺ Tregs (iTreg) kommt. nTregs sind bei dieser Therapie dennoch nicht ohne Bedeutung. Durch einen Defekt in der Funktion der nTreg können Immunantworten unkontrolliert ablaufen und sich verstärken. Betrachtet man die Th1-Antwort nach OVA-IT in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen ist ein drastischer Anstieg der CD4⁺ IFN- γ ⁺ Zellen festzustellen. Wie schon beschrieben, können Th1-Zellen ebenfalls eine neutrophile Atemwegsentszündung auslösen. Die massive Th1-Antwort lässt vermuten, dass der Einstrom der neutrophilen Granulozyten nach OVA-IT durch die Abwesenheit der nTregs nicht reduziert werden konnte. Ähnliche Resultate konnten durch Depletion der CD25⁺ Treg

in PBMC von Allergikern nach SIT gezeigt werden (141). Somit könnte ein Defekt in der nTreg-Antwort bei SIT den Misserfolg dieser Therapie bei einigen Patienten erklären.

Welche Rolle die gesamte FoxP3⁺ T-Zellpopulation (FoxP3⁺ nTreg und iTreg) in SIT einnimmt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Dieser Fragestellung wurde bei der Untersuchung von DEREK Mäusen nachgegangen, welche aufgrund ihrer FoxP3-abhängigen Expression von DTR in Treg-Zellen die Möglichkeit bieten, FoxP3⁺ T-Zellen gezielt auszuschalten. Diese FoxP3-spezifische Depletion der Tregs in DEREK Mäusen erbrachte nur eine partielle Aufhebung der suppressiven Effekte der OVA-spezifischen IT. Da durch diesen Eingriff sowohl nTregs als auch iTregs ausgeschaltet werden, kam es zur Verschlimmerung der Atemwegsentzündung in Placebo-behandelten DEREK Tieren im Vergleich zum Wildtyp. In der SIT-behandelten Gruppe waren jedoch trotz Depletion auch protektive Auswirkungen zu verzeichnen. Maazi et al. erzielte ähnliche Resultate nach Depletion von FoxP3 und zusätzlicher Gabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen CD25 (PC61) in einem prophylaktischen Mausmodell der SIT (118). Das bestätigt die Annahme, dass eine Depletion der FoxP3⁺ Tregs bzw. CD4⁺ CD25⁺ Zellen nicht ausreicht, um die Wirksamkeit der SIT vollständig aufzuheben. Schwachpunkt dieses Modells ist die unkontrollierbare Wiederkehr der CD4⁺ FoxP3⁺, die das DTR- und GFP-exprimierende BAC (noch) nicht enthalten (siehe 2.1.7). Diese Zellen sind deshalb für eine weitere Depletion nicht zugänglich.

4.3.2 Induktion von IL-10 und Typ-1 regulatorischen T-Zellen nach SIT

IL-10 ist ein tolerogenes Zytokin, das von vielen verschiedenen Zellpopulationen sezerniert wird (75). Im adaptiven Immunsystem sind Th2-, Treg- aber auch Th1- und Th17-Zellen wichtige Quellen des IL-10. Zellen aus dem angeborenen Immunsystem, die IL-10 produzieren, sind Dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten. IL-10 übt pleiotrope Effekte auf lymphoide und myeloide Zellen aus (186, 187). Obwohl einige dieser Effekte auch von anderen Zytokinen induziert werden können, besitzt IL-10 die einzigartige Funktion, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen zu inhibieren. Darüber hinaus führt es zum Anstieg der IgG4-Produktion in B-Zellen (74, 143). Studien zur SIT konnten zeigen, dass die Effekte der SIT von der Induktion des Zytokins IL-10 abhängig sind (143, 188).

Auch in dieser Arbeit wurde im Mausmodell nach OVA-IT eine gesteigerte Frequenz IL-10-produzierender CD4⁺ T-Zellen in der Lunge und im regionalen Lymphknoten detektiert. Diese T-Zellen werden weiterhin als Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) beschrieben und

können bei Allergikern nach SIT nachgewiesen werden (77, 143, 146, 189). Im SIT-Modell mit OVA-TZR-transgenen DO11.10 Mäusen zeigte die durchflusszytometrische Untersuchung, dass die induzierten Tr1-Zellen nicht FoxP3 koexprimieren. Dieses Ergebnis widerspricht Studien, die eine IL-10⁺ FoxP3⁺ doppelpositive T-Zellpopulation nach subkutaner (SCIT) und sublingualer SIT (SLIT) nachweisen konnten (142, 190).

In Abwesenheit von im Thymus gereiften nTregs in DO11.10 RAG^{-/-} Mäusen sind im Vergleich zu DO11.10 Mäusen, die nTregs generieren können, weniger IL-10-produzierende CD4⁺ T-Zellen detektiert worden (vergleiche Abbildung 28 mit Abbildung 24). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass durch die Anwesenheit der nTregs die Entstehung der Tr1-Zellen nach SIT gefördert wird. Weiterhin konnte durch eine Färbung mit IFN- γ -Antikörper gezeigt werden, dass der überwiegende Teil dieser CD4⁺ IL-10⁺ T-Zellen gleichzeitig IFN- γ produziert. Diese Population wurde auch im humanen Blut detektiert und als regulatorische effektorähnliche T-Zellsubpopulation beschrieben (81, 191).

4.4 Die Wirkung der SIT ist abhängig vom IL-10-Signalweg.

Die immunregulatorischen Funktionen des IL-10 sind abhängig von den zwei Komponenten des IL-10R (IL-10R1 und 2) und deren Aktivierung der Januskinase 1 (Jak1), Tyrosinkinase-2 (Tyk2) und des STAT3 (192). Der IL-10R ist ein Tetramer, das aus jeweils zwei IL-10-bindende Einheiten (IL-10R1) und zwei signalweiterleitenden Untereinheiten besteht. Die Bindung des IL-10 aktiviert die Jak1 und Tyk2, welche konstitutiv mit den intrazellulären Domänen des IL-10R verbunden sind. Daraufhin erfolgt die Bindung von STAT3 an den Rezeptor, dessen Phosphorylierung und die Bildung eines Homodimers, welches in den Nukleus wandert und als Transkriptionsfaktor viele Gene beeinflusst. Die anti-inflammatorischen Effekte des IL-10 werden auch durch das Eingreifen in die Aktivierung der p38-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) verursacht, indem die Translation von TNF- α gehemmt wird. IL-10 induziert darüber hinaus die de-novo-Synthese von SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling-3*), wodurch die LPS-abhängige Produktion proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen inhibiert wird.

Um die Rolle des IL-10-Signalwegs nach SIT im chronischen Modell zu beleuchten, wurde ein blockierender Antikörper gegen den IL-10-Rezeptor (anti-IL-10R) *in vivo* eingesetzt. Dieser Antikörper verhindert das korrekte Andocken des IL-10 an seinen Rezeptor und damit das Ingangsetzen des IL-10-Signalwegs. Ohne den funktionierenden IL-10-Signalweg sind die suppressiven Effekte der SIT im etablierten Modell aufgehoben. Diese Wirkung bezieht sich nicht nur auf die Reduktion der AHR und der eosinophilen Entzündung. Auch die

Linderung der strukturellen Veränderungen durch SIT trat nach Blockade des IL-10R nicht ein. Durch die Vielzahl der Zielzellen des IL-10 lässt sich schwer abschätzen, welche Regulationsmechanismen des IL-10 bei der SIT zum Tragen kommen. So ist durch die Blockade des IL-10-Signalwegs auch die Wirkung von FoxP3⁺ Treg gestört (85). Es liegt nahe, dass auch bei der SIT ein Zusammenspiel von FoxP3⁺ Treg und IL-10 vorherrscht. Dieser Effekt wird jedoch nicht durch eine autokrine IL-10-Produktion der FoxP3⁺ Treg hervorgerufen (85). Die Quelle von IL-10 im chronischen Mausmodell nach OVA-IT sind hauptsächlich CD4⁺ FoxP3⁻ T-Zellen. In anergen²⁵ CD4⁺ CD25⁻ Zellen kann eine IL-10-Produktion durch CD4⁺ CD25⁺ (FoxP3⁺) Zellen induziert werden. Diese „katalytische Funktion“ der CD4⁺ CD25⁺ Tregs, Tr1-ähnliche Zellen zu induzieren, ist womöglich auch an den suppressiven Effekten der SIT beteiligt (193).

4.5 Ausblick

Die SIT stellt eine wichtige Therapieoption für allergische Erkrankungen dar. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SIT im chronischen Asthmodell die AHR und die Atemwegsentzündung unterdrücken kann. Die suppressiven Effekte dieser Therapie wirkten sich aber auch auf die Umstrukturierungen im Lungengewebe positiv aus. Um die Wirkmechanismen der SIT zu beleuchten, wurden die T-Zellantworten im etablierten Tiermodell untersucht. Nach SIT kommt es zu einer Verringerung der Th2-Antwort und zu einer Verstärkung der Th1-Antwort, der FoxP3⁺ Tregs und der Tr1-Antwort. Um die Bedeutung diese verstärkten T-Zellpopulationen auf die Wirkung der SIT zu untersuchen, wurden verschiedene genetische Mausmodelle verwendet. Eine SIT in T-bet-defizienten Tieren, die keine funktionelle Th1-Antwort ausbilden können, war dennoch erfolgreich. Die induzierten Th1-Zellen sind somit für die Effektivität der SIT nicht entscheidend. Durch die Untersuchung der SIT in Mäusen ohne natürliche Tregs (DO11.10 RAG^{-/-} Mäuse) wurde gezeigt, dass SIT zu einer *de-novo*-Induktion von FoxP3⁺ Treg-Zellen führt. In DEREK Mäusen wurden FoxP3⁺ Zellen zum Zeitpunkt der SIT spezifisch ausgeschaltet. Dieser konditionale Knockout verursachte eine stärkere Entzündung in den Placebo-behandelten Tieren im Vergleich zum Wildtyp, welche durch SIT teilweise reduziert werden konnte. Die Blockade des IL-10R mit einem neutralisierenden Antikörper bewirkte die stärkste Aufhebung der SIT-Effekte. Die AHR, die Atemwegsentzündung und das *airway remodeling* waren im Vergleich zur IgG-Kontrolle stark

²⁵ **anerg**: Zustand von Zellen, die unfähig sind trotz einer Stimulation mit dem Antigen eine Immunantwort auszulösen.

erhöht. Zusammenfassend sind für die Wirkung der SIT die Induktion der IL-10-Produktion und der FoxP3⁺ T-Zellen ausschlaggebend und stellen Angriffspunkte für eine gezielte Toleranzinduktion dar. Die Aufgabenteilung zwischen FoxP3⁺ Tregs und den Tr1-Zellen bedarf jedoch weiterer Aufklärung. Auch die zugrunde liegenden Vorgänge in den Tregs, d. h., welche Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Oberflächenmoleküle an der Toleranzentstehung beteiligt sind, könnten von großer Bedeutung sein. Eine Th1-Induktion durch SIT ist verzichtbar und sollte daher vermieden werden.

Das in dieser Arbeit etablierte Modell spiegelt die Situation im Menschen nach SIT wieder und kann ein wichtiges Werkzeug zur Weiterentwicklung der SIT darstellen. Bisher untersuchten viele Forschungsarbeiten neue Applikationsrouten, welche die Wirksamkeit, Sicherheit und Compliance der Patienten verbessern sollen. Neben der subkutanen Applikation (SCIT) hat sich die sublinguale Form (SLIT) insbesondere für Graspollenallergiker etabliert. Eine epikutane Verabreichung des Allergens wird derzeit erforscht (194, 195). Auch die intralymphatische Injektion von Allergenen wird als Alternative untersucht (196). Um den Erfolg der SIT zu beurteilen und die richtige Dosierung des Allergens zu wählen, ist die Identifikation von adäquaten immunologischen Markern unerlässlich. Die Veränderung der spezifischen IgG4-Titer hat sich dafür als nicht geeignet erwiesen, da der IgG4-Spiegel nicht mit dem klinischen Ergebnis assoziiert ist (129). Auch die Reduktion des spezifischen IgE ist aufgrund der langen Latenzzeit ungeeignet. Durch Dokumentation der Symptome und der Medikation kann zwar eine Beurteilung des Behandlungsverlaufs vorgenommen werden, die jedoch auch subjektive Parameter enthält.

Um die Effektivität der SIT zu steigern, wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere Strategien entwickelt. Derzeit werden rekombinante (197, 198) und modifizierte Allergene (Allergoide) eingesetzt, welche die ursprünglichen Allergenextrakte ersetzen (102). In weiterführenden Ansätzen soll mit Fusionsproteinen aus Allergenen mit spezifischen Stimulatoren (199), Allergen-beladenen Lymphozyten (200) oder mit mRNA-Vakzinierung (201) eine spezifische toleranzinduzierende Antwort gegen das Allergen in Gang gesetzt werden. Einige Studien haben das Ziel, die Tr1-Antwort bzw. IL-10-Produktion während der SIT zu stimulieren (202). Ein weiteres Vorgehen ist der Einsatz von IL-10-induzierenden Adjuvantien (203). Die zusätzliche Gabe von Vitamin D₃ zur SIT hat bereits Anwendung in der klinischen Praxis gefunden (204). Dieses vom Körper aus 7-Dehydrocholesterol gebildete Vitamin wird bei UV-B Licht in der Haut produziert. Es erhöht ebenfalls die Anzahl der FoxP3⁺ und FoxP3⁺Tregs und fördert deren suppressive Wirkung auf Effektorzellen (204–206).

Eine weitere therapeutische Option ist die zusätzliche Gabe von Toll-like-Rezeptor-Liganden zur SIT (207). Durch den TLR-4-Liganden 3-Deacyl-Monophosphoryl-Lipid A kann die

Häufigkeit der Injektionen bei gleicher Wirksamkeit verringert werden (208, 209). Auch die begleitende Gabe von dem humanisierten anti-IgE-Antikörper Omalizumab verringerte die systemischen Reaktionen während der SIT (210). Diese Ansätze sollen diese erfolgreiche Therapie noch sicherer und effektiver gestalten und sie letztlich auch einem größeren Kreis von Allergie- und Asthmapatienten zugänglich machen. Für diese Weiterentwicklungen der SIT sind die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen und die Identifikation der toleranzinduzierenden Zielzellen unerlässlich. Weiterführende Experimente zur Erforschung dieser Suppressionsmechanismen der SIT könnten eine gezielte Depletion von Tr1-Zellen beinhalten. Auch das gemeinsame Ausschalten der Foxp3⁺ und FoxP3⁻ Tregs könnte die wichtige Bedeutung dieser Zellen für die SIT unterstreichen. Die Ergebnisse dieser Forschung könnten neue Angriffspunkte aufzeigen, die für die gezielte Induktion von Tregs gegen Allergene eingesetzt werden können, aber auch Marker für einen erfolgreichen Therapieablauf identifizieren.

5 Literaturverzeichnis

1. Pirquet, C. v. 1906. Allergie. *Münchener Medizinische Wochenschrift*(30): 1457.
2. Holgate, S. T. 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402(6760 Suppl): B2-4.
3. Keil, T., Kulig, M., Simpson, A., Custovic, A., Wickman, M., and Kull, I., et al. 2006. European birth cohort studies on asthma and atopic diseases: II. Comparison of outcomes and exposures--a GA²LEN initiative. *Allergy* 61(9): 1104–1111.
4. Cockcroft, D. W., and Davis, B. E. 2006. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 118(3): 551-9; quiz 560-1.
5. Elias, J. A., Zhu, Z., Chupp, G., and Homer, R. J. 1999. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104(8): 1001–1006.
6. James, A. L., Maxwell, P., Elliot, J., and Carroll, N. 2002. The Relationship of Reticular Basement Membrane Thickness to Airway Wall Remodeling in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 166(12): 1590–1595.
7. Roche, W. R., Beasley, R., Williams, J. H., and Holgate, S. T. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1(8637): 520–524.
8. Jeffery, P. K., Godfrey, R. W., Adelroth, E., Nelson, F., Rogers, A., and Johansson, S. A. 1992. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. *Am Rev Respir Dis* 145(4 Pt 1): 890–899.
9. Minshall, E. M., Leung, D. Y., Martin, R. J., Song, Y. L., Cameron, L., and Ernst, P., et al. 1997. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(3): 326–333.
10. Davies, D. E., Wicks, J., Powell, R. M., Puddicombe, S. M., and Holgate, S. T. 2003. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol* 111(2): 215-25; quiz 226.
11. Tang, W., Geba, G. P., Zheng, T., Ray, P., Homer, R. J., and Kuhn, C., et al. 1996. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J Clin Invest* 98(12): 2845–2853.
12. Brewster, C. E., Howarth, P. H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S. T., and Roche, W. R. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(5): 507–511.
13. Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., and Motomiya, M. 1993. Cellular Hypertrophy and Hyperplasia of Airway Smooth Muscles Underlying Bronchial Asthma: A 3-D Morphometric Study. *Am J Respir Crit Care Med* 148(3): 720–726.

14. Salmon, M., Walsh, D. A., Koto, H., Barnes, P. J., and Chung, K. F. 1999. Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodelling. *Eur Respir J* 14(3): 633–641.
15. Weiland, S. K., Mutius, E. von, Hirsch, T., Duhme, H., Fritsch, C., and Werner, B., et al. 1999. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* 14(4): 862–870.
16. Eder, W., Ege, M., and von, M. 2006. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 355(21): 2226–2235.
17. Romagnani, S. 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112(3): 352–363.
18. Strachan, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299(6710): 1259–1260.
19. Von Mutius, Braun-Fahrlander, Schierl, Riedler, Ehlermann, and Maisch, et al. 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 30(9): 1230–1234.
20. Ernst, P., and Cormier, Y. 2000. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 161(5): 1563–1566.
21. Strachan, D. P. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1: S2-10.
22. Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F., and Kjellman, B. 2000. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 161(5): 1501–1507.
23. Krishnamoorthy, N., Khare, A., Oriss, T. B., Raundhal, M., Morse, C., and Yarlagadda, M., et al. 2012. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat Med* 18(10): 1525–1530.
24. D'Amato, G. 2002. Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy* 57(s72): 30–33.
25. Coca, A. F., and Cooke, R. A. On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness. *J Immunol* 1923(8): 163–182.
26. Gell, P., and Coombs, R. 1963. The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Science.
27. Lambrecht, B. N., and Hammad, H. 2012. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 18(5): 684–692.
28. Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M. A., Germain, R. N., and Lambrecht, B. N. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15(4): 410–416.

29. Omori, M., and Ziegler, S. 2007. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 178(3): 1396–1404.
30. Angkasekwinai, P., Park, H., Wang, Y.-H., Wang, Y.-H., Chang, S. H., and Corry, D. B., et al. 2007. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 204(7): 1509–1517.
31. Rank, M. A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K. R., Squillace, D. L., and Kita, H. 2009. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123(5): 1047–1054.
32. Lambrecht, B. N., and Hammad, H. 2012. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30(1): 243–270.
33. Medoff, B. D., Thomas, S. Y., and Luster, A. D. 2008. T Cell Trafficking in Allergic Asthma: The Ins and Outs. *Annu Rev Immunol* 26(1): 205–232.
34. Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., and Bentley, A. M., et al. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326(5): 298–304.
35. Cookson, W. 2002. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev* 190(1): 195–206.
36. Zheng, W.-p., and Flavell, R. A. 1997. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89(4): 587–596.
37. Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J., and Paul, W. E. 2001. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 166(12): 7276–7281.
38. Cohn, L., Homer, R. J., Marinov, A., Rankin, J., and Bottomly, K. 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(10): 1737–1747.
39. Taube, C., Duez, C., Cui, Z.-H., Takeda, K., Rha, Y.-H., and Park, J.-W., et al. 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 169(11): 6482–6489.
40. Foster, P. S., Hogan, S., Ramsay, A., Matthaei, K., and Young, I. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183(1): 195–201.
41. Boom, W. H., Liano, D., and Abbas, A. K. 1988. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J Exp Med* 167(4): 1350–1363.
42. Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K. M. 2006. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8(2): 145–153.

43. Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunol* 7(1): 145–173.
44. Mosmann, T. R., and Moore, K. W. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 12(3): A49-53.
45. Neurath, M. F., Finotto, S., and Glimcher, L. H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8(6): 567–573.
46. Randolph, D. A., Carruthers, C. J. L., Szabo, S. J., Murphy, K. M., and Chaplin, D. D. 1999. Modulation of Airway Inflammation by Passive Transfer of Allergen-Specific Th1 and Th2 Cells in a Mouse Model of Asthma. *J Immunol* 162(4): 2375–2383.
47. Randolph, D. A., Stephens, R., Carruthers, C. J., and Chaplin, D. D. 1999. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 104(8): 1021–1029.
48. Lloyd, C. M., and Hessel, E. M. 2010. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nat Rev Immunol* 10(12): 838–848.
49. Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., and Grebe, N., et al. 2010. Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity* 33(2): 192–202.
50. Kearley, J., Erjefalt, J. S., Andersson, C., Benjamin, E., Jones, C. P., and Robichaud, A., et al. 2011. IL-9 Governs Allergen-induced Mast Cell Numbers in the Lung and Chronic Remodeling of the Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 183(7): 865–875.
51. Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., and Buer, J., et al. 2008. Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat Immunol* 9(12): 1341–1346.
52. Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., and Sobel, R. A., et al. 2008. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+ IL-10+ Foxp3– effector T cells. *Nat Immunol* 9(12): 1347–1355.
53. Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., and Stritesky, G. L., et al. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* 11(6): 527–534.
54. Soroosh, P., and Doherty, T. A. 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology* 127(4): 450–458.
55. Molet, S., Hamid, Q., Davoineb, F., Nutku, E., Tahaa, R., and Pagé, N., et al. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108(3): 430–438.

56. Kerzel, S., Dehne, J., Rogosch, T., Schaub, B., Maier, R. F., and Zemlin, M. 2012. TH17 Cell Frequency in Peripheral Blood from Children with Allergic Asthma Correlates with the Level of Asthma Control. *J Pediatr* 161(6): 1172–1174.
57. Zhao, J., Lloyd, C. M., and Noble, A. 2012. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol* 6(2): 335–346.
58. McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., Dupont, R. B., Kapadia, S., and Logar, A., et al. 2008. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181(6): 4089–4097.
59. Sojka, D. K., Huang, Y.-H., and Fowell, D. J. 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124(1): 13–22.
60. Curotto Lafaille, M. A. de, and Lafaille, J. J. 2009. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30(5): 626–635.
61. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4): 330–336.
62. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepers, B., Clark, L. B., and Yasayko, S.-A., et al. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27(1): 68–73.
63. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., and Serfling, E., et al. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell mediated suppression. *J Exp Med* 204(6): 1303–1310.
64. Yu, A., Zhu, L., Altman, N. H., and Malek, T. R. 2009. A Low Interleukin-2 Receptor Signaling Threshold Supports the Development and Homeostasis of T Regulatory Cells. *Immunity* 30(2): 204–217.
65. Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. 2004. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 173(12): 7259–7268.
66. Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., and Curotto de Lafaille, M. A. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115(7): 1923–1933.
67. Chen, W., Jin W., Hardegen, N., Lei K., Li, L., and Marinos, N., et al. 2003. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12): 1875–1886.
68. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* 178(1): 179–185.

69. Hansen, G., McIntire, J. J., Yeung, V. P., Berry, G., Thorbecke, G. J., and Chen, L., et al. 2000. CD4⁺ T helper cells engineered to produce latent TGF- β 1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 105(1): 61–70.
70. Letterio, J. J., and Roberts, A. B. 1998. Regulation of Immune Responses by TGF- β *. *Annu Rev Immunol* 16(1): 137–161.
71. Weiner, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection* 3(11): 947–954.
72. Williams, L. M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T., and Foxwell, B. M. J. 2004. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation - a continuing puzzle. *Immunology* 113(3): 281–292.
73. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., and Vries, J. E. de, et al. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652): 737–742.
74. Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C. A., and Akdis, M. 2008. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 205(12): 2887–2898.
75. Saraiva, M., and O'Garra, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10(3): 170–181.
76. Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., and Magnani, C. F., et al. 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116(6): 935–944.
77. Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., and Cramer, R., et al. 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(11): 1567–1575.
78. Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., and Sharpe, A. H., et al. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8(9): 1024–1032.
79. Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., and Boonstra, A., et al. 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(10): 5986–5993.
80. Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., and Rudensky, A. Y., et al. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8(9): 931–941.
81. Häring, B., Lozza, L., Steckel, B., and Geginat, J. 2009. Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med* 206(5): 1009–1017.

82. Provoost, S., Maes, T., van Durme, Y. M., Gevaert, P., Bachert, C., and Schmidt-Weber, C. B., et al. 2009. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 64(10): 1539–1546.
83. Ling, E., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., and Arbery, J., et al. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *The Lancet* 363(9409): 608–615.
84. Hadeiba, H., and Locksley, R. M. 2003. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J Immunol* 170(11): 5502–5510.
85. Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. 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(11): 1539–1547.
86. Kearley, J., Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 122(3): 617-24.e6.
87. Rackemann, F. M., and Mallory, T. B. 1941. Intrinsic Asthma. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 57: 60–73.
88. Humbert, M., Durham, S. R., Ying, S., Kimmitt, P., Barkans, J., and Assoufi, B., et al. 1996. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 154(5): 1497–1504.
89. Wenzel, S. E. 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18(5): 716–725.
90. Moore, W. C., Meyers, D. A., Wenzel, S. E., Teague, W. G., Li, H., and Li, X., et al. 2010. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 181(4): 315–323.
91. Alton, E. W., and Norris, A. A. 1996. Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 98(5 Pt 2): S102-5; discussion S105-6.
92. Korn, S., Hübner M., Taube C., and Buhl, R. 2012. Das schwere allergische Asthma. *Allergologie* 35: 487–494.
93. Newton, R. 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55(7): 603–613.
94. Reddel, H. K., Jenkins, C. R., Marks, G. B., Ware, S. I., Xuan, W., and Salome, C. M., et al. 2000. Optimal asthma control, starting with high doses of inhaled budesonide. *Eur Respir J* 16(2): 226–235.

95. Adams, N., Bestall, J., and Jones, P. W. 2001. Inhaled fluticasone propionate for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD003135.
96. Ducharme, F. M., and Hicks, G. C. 2002. Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD002314.
97. Lin, H., Boesel, K. M., Griffith, D. T., Prussin, C., Foster, B., and Romero, F., et al. 2004. Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and FcεRI on basophils. *J Allergy Clin Immunol* 113(2): 297–302.
98. Holgate, S., Casale, T., Wenzel, S., Bousquet, J., Deniz, Y., and Reisner, C. 2005. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115(3): 459–465.
99. Prussin, C., Griffith, D. T., Boesel, K. M., Lin, H., Foster, B., and Casale, T. B. 2003. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 112(6): 1147–1154.
100. Wenzel, S., Wilbraham, D., Fuller, R., Getz, E. B., and Longphre, M. 2007. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *The Lancet* 370(9596): 1422–1431.
101. Corren, J., Busse, W., Meltzer, E. O., Mansfield, L., Bensch, G., and Fahrenholz, J., et al. 2010. A Randomized, Controlled, Phase 2 Study of AMG 317, an IL-4R Antagonist, in Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 181(8): 788–796.
102. Akdis, C. A. 2012. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med* 18(5): 736–749.
103. Kips, J. C., O'Connor, B. J., Langley, S. J., Woodcock, A., Kerstjens, H. A. M., and Postma, D. S., et al. 2003. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 167(12): 1655–1659.
104. Flood-Page, P. T., Menzies-Gow, A. N., Kay, A. B., and Robinson, D. S. 2003. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 167(2): 199–204.
105. Noon, L. 1911. Prophylactic inoculation against Hay Fever. *The Lancet* 177(4580): 1572–1573.
106. Freeman, J. 1911. Further Observations on the treatment of Hay Fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *The Lancet* 178(4594): 814–817.
107. Bousquet, J., Lockey, R., and Malling, H. J. 1998. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 102(4 Pt 1): 558–562.

108. Burks, A. W., Calderon, M. A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., and Jutel, M., et al. 2013. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol* 131(5): 1288–1296.e3.
109. Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., and Noble, W., et al. 1999. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341(7): 468–475.
110. Walker, S., Pajno, G., Lima, M., Wilson, D., and Durham, S. 2001. Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: A randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 107(1): 87–93.
111. Hankin, C. S., Cox, L., Lang, D., Bronstone, A., Fass, P., and Leatherman, B., et al. 2010. Allergen immunotherapy and health care cost benefits for children with allergic rhinitis: a large-scale, retrospective, matched cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 104(1): 79–85.
112. Johnstone, D. E., and Dutton, A. 1968. The value of hyposensitization therapy for bronchial asthma in children--a 14-year study. *Pediatrics* 42(5): 793–802.
113. Jacobsen, L., Niggemann, B., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., and Høst, A., et al. 2007. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 62(8): 943–948.
114. Purello-D'Ambrosio, F., Gangemi, S., Merendino, R. A., Isola, S., Puccinelli, P., and Parmiani, S., et al. 2001. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin Exp Allergy* 31(8): 1295–1302.
115. Wedi, B. 2008. Stellenwert und Indikation der SLIT im Vergleich zur SCIT. *Hautarzt* 59(7): 537–543.
116. van Oosterhout, A. J., van Esch, B. C. A. M., Hofman, G., Hofstra, C. L., van Ark, I., and Nijkamp, F. P., et al. 1998. Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4): 622–628.
117. Taher, Y. A., van Esch, B. C. A. M., Hofman, G. A., Henricks, P. A. J., and van Oosterhout, A. J. M. 2008. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 180(8): 5211–5221.
118. Maazi, H., Shirinbak, S., Willart, M., Hammad, H. M., Cabanski, M., and Boon, L., et al. 2012. Contribution of regulatory T cells to alleviation of experimental allergic asthma after specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 42(10): 1519–1528.
119. Janssen, E. M., van Oosterhout, A. J., Nijkamp, F. P., van Eden, W., and Wauben, M. H. 2000. The efficacy of immunotherapy in an experimental murine model of allergic asthma is

- related to the strength and site of T cell activation during immunotherapy. *J Immunol* 165(12): 7207–7214.
120. Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., and Hamid, Q. 2011. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128(3): 451–462.
121. Cooke, R. A. 1935. Serological Evidence of immunity with coexisting Sensitization in a type of human Allergy (Hay Fever). *J Exp Med* 62(6): 733–750.
122. Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M. M. 1966. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 97(6): 840–853.
123. Lichtenstein, L., Holtzman, N., and Burnett, L. S. 1968. A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* 101(2): 317–324.
124. García, B. E., Sanz, M. L., Gato, J. J., Fernández, J., and Oehling, A. 1993. IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine. *J Invest Allergol Clin Immunol* 3(1): 26–33.
125. Daëron, M., Malbec, O., Latour, S., Arock, M., and Fridman, W. H. 1995. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* 95(2): 577–585.
126. Coggeshall, K. M. 1998. Inhibitory signaling by B cell FcγRIIb. *Current Opinion in Immunology* 10(3): 306–312.
127. Müller, U., Helbling, A., and Bischof, M. 1989. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 44(6): 412–418.
128. Reisinger, J., Horak, F., Pauli, G., van Hage, M., Cromwell, O., and König, F., et al. 2005. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 116(2): 347–354.
129. Kleine-Tebbe, J. 2011. Immunological measures as potential markers of dose. *Allergy* 66: 44–46.
130. Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Wilhelm, M., Wiedermann, U., and Schenk, S., et al. 1997. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phi p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 27(9): 1007–1015.
131. Shimoda, K., van Deursent, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., and Tripp, R. A., et al. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. *Nature* 380(6575): 630–633.

132. Lebman, D. A., and Coffman, R. L. 1988. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med* 168(3): 853–862.
133. Secrist, H., Chelen, C. J., Wen, Y., Marshall, J. D., and Umetsu, D. T. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178(6): 2123–2130.
134. Huang, Macary, Wilke, Kemeny, and Chung. 1999. Inhibitory effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on bronchial hyperresponsiveness, allergic inflammation and T-helper 2 cytokines in Brown-Norway rats. *Immunology* 98(2): 280–288.
135. Huang, T. J., MacAry, P. A., Eynott, P., Moussavi, A., Daniel, K. C., and Askenase, P. W., et al. 2001. Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma. *J. Immunol.* 166(1): 207–217.
136. Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., and Muller, U. R. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154(8): 4187–4194.
137. Durham, S., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R., and Mackey, I., et al. 1996. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- γ . *J Allergy Clin Immunol* 97(6): 1356–1365.
138. Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A. H., Christmann, S., Knop, J., and Saloga, J. 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(5): 1131–1139.
139. Pevec, B., Radulovic Pevec, M., Stipic Markovic, A., Batista, I., Rijavec, M., and Silar, M., et al. 2012. House Dust Mite-Specific Immunotherapy Alters the Basal Expression of T Regulatory and Fc ϵ RI Pathway Genes. *Int Arch Allergy Immunol* 159(3): 287–296.
140. Pereira-Santos, M. C., Baptista, A. P., Melo, A., Alves, R. R., Soares, R. S., and Pedro, E., et al. 2008. Expansion of circulating Foxp3+CD25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 38(2): 291–297.
141. Kerstan, A., Albert, C., Klein, D., Brocker, E.-B., and Trautmann, A. 2011. Wasp venom immunotherapy induces activation and homing of CD4(+)CD25(+) forkhead box protein 3-positive regulatory T cells controlling T(H)1 responses. *J Allergy Clin Immunol* 127(2): 495-501.e1-6.
142. Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R., and Nouri-Aria, K. T. 2008. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 121(6): 1467–1472.e1.
143. Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., and Blaser, K. 1998. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 102(1): 98–106.

144. Pierkes, M., Bellinghausen, I., Hultsch, T., Metz, G., Knop, J., and Saloga, J. 1999. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 103(2 Pt 1): 326–332.
145. Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., and Blaser, K., et al. 2003. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 33(5): 1205–1214.
146. Möbs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Jakob, T., Hertl, M., and Pfutzner, W. 2010. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol* 184(4): 2194–2203.
147. Tsai, Y.-G., Yang, K. D., Niu, D.-M., Chien, J.-W., and Lin, C.-Y. 2010. TLR2 Agonists Enhance CD8+Foxp3+ Regulatory T Cells and Suppress Th2 Immune Responses during Allergen Immunotherapy. *J. Immunol.* 184(12): 7229–7237.
148. Barwig, C., Raker, V., Montermann, E., Grabbe, S., Reske-Kunz, A. B., and Sudowe, S. 2010. Antigen dose-dependent suppression of murine IgE responses is mediated by CD4–CD8– double-negative T cells. *Clinical & Experimental Allergy* 40(6): 891–901.
149. Deniz, G., Erten, G., Küçüksezer, U. C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., and Aktas, E., et al. 2008. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 180(2): 850–857.
150. Fujimoto, M. 2010. Regulatory B cells in skin and connective tissue diseases. *J Dermatol Sci* 60(1): 1–7.
151. Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6): 655–669.
152. Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., and Eberl, G., et al. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204(1): 57–63.
153. Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science* 250(4988): 1720–1723.
154. Kappler, J., Skidmore, B., White, J., and Marrack, P. 1981. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med* 153(5): 1198–1214.
155. Wilder, J. A., Collie, D. S., Bice, D. E., Tesfaigzi, Y., Lyons, C. R., and Lipscomb, M. F. 2001. Ovalbumin aerosols induce airway hyperreactivity in naïve DO11.10 T cell receptor transgenic mice without pulmonary eosinophilia or OVA-specific antibody. *J Leukoc Biol* 69: 538–547.
156. Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., and Otsuka, F., et al. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+ CD4+ naturally anergic and suppressive T

- cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162(9): 5317–5326.
157. Glaab, T., Taube, C., Braun, A., and Mitzner, W. 2007. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res* 8(1): 63.
158. Vanoirbeek, J. A. J., Rinaldi, M., Vooght, V. de, Haenen, S., Bobic, S., and Gayan-Ramirez, G., et al. 2009. Noninvasive and Invasive Pulmonary Function in Mouse Models of Obstructive and Restrictive Respiratory Diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42(1): 96–104.
159. Niedel, J. E., Kuhn, L. J., and Vandenberg, G. R. 1983. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(1): 36–40.
160. Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Bohle, B., Repa, A., Renz, H., and Kraft, D., et al. 1999. Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *J Allergy Clin Immunol* 103(6): 1202–1210.
161. Wiedermann, U., Herz, U., Baier, K., Vrtala, S., Neuhaus-Steinmetz, U., and Bohle, B., et al. 2001. Intranasal Treatment with a Recombinant Hypoallergenic Derivative of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 Prevents Allergic Sensitization and Airway Inflammation in Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 126(1): 68–77.
162. Vissers, J. L. M., van Esch, B. C. A. M., Hofman, G. A., Kapsenberg, M. L., Weller, F. R., and van Oosterhout, A. J. M. 2004. Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 113(6): 1204–1210.
163. Yu, H.-q., Li, X.-h., Guo, H., Liu, Z.-g., Ran, P.-x., and Ji, K.-m., et al. 2010. Sublingual Immunotherapy Efficacy of *Dermatophagoides farinae* Vaccine in a Murine Asthma Model. *Int Arch Allergy Immunol* 152(1): 41–48.
164. Akdis, M., and Akdis, C. A. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 780–789.
165. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 351(9111): 1225–1232.
166. Asher, I., Baena-Cagnani, C., Boner, A., Canonica, G. W., Chuchalin, A., and Custovic, A., et al. 2004. World Allergy Organization guidelines for prevention of allergy and allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 135(1): 83–92.
167. Calderón, M. A., Casale, T. B., Togias, A., Bousquet, J., Durham, S. R., and Demoly, P. 2011. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: From meta-analysis to registration and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 127(1): 30–38.

168. Abramson, M. J., Puy, R. M., and Weiner, J. M. 2010. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Library*(8).
169. Klein-Tebbe, J., Bergmann, K.-C., Friedrichs, F., Fuchs, T., Jung, K., and Klimek, L., et al. 2006. Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen: Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) und der Gesellschaft für pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo J*(15): 56–74.
170. Winkler, B., Baier, K., Wagner, S., Repa, A., Eichler, H. G., and SCHEINER, O., et al. 2002. Mucosal tolerance as therapy of type I allergy: intranasal application of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice. *Clin Exp Allergy* 32(1): 30–36.
171. Shirinbak, S., Taher, Y., Maazi, H., Gras, R., van, E., and Henricks, P., et al. 2010. Suppression of Th2-driven airway inflammation by allergen immunotherapy is independent of B cell and Ig responses in mice. *J Immunol* 185(7): 3857–3865.
172. Miller, M., Miller, M., Cho, J. Y., McElwain, K., McElwain, S., and Shim, J. Y., et al. 2005. Corticosteroids prevent myofibroblast accumulation and airway remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(1): L162–L169.
173. Henderson, W. R., Chiang, G., Tien, Y., and Chi, E. 2006. Reversal of Allergen-induced Airway Remodeling by CysLT1 Receptor Blockade. *Am J Respir Crit Care Med* 173(7): 718–728.
174. Beckett, P. A. 2003. Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma? *Thorax* 58(2): 163–174.
175. Mauad, T., Bel, E. H., and Sterk, P. J. 2007. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 120(5): 997–1009.
176. Lichtenstein, L. M., Norman, P. S., Winkenwerder, W. L., and Osler, A. G. 1966. In Vitro Studies of Human Ragweed Allergy: Changes in Cellular and Humoral Activity Associated with Specific Desensitization*. *J Clin Invest* 45(7): 1126–1136.
177. Lichtenstein, L. M., Ishizaka, K., Norman, P. S., Sobotka, A. K., and Hill, B. M. 1973. IgE Antibody Measurements in Ragweed Hay Fever: Relationship to Clinical Severity and the Results of Immunotherapy. *J Clin Invest* 52(2): 472–482.
178. Gehlhar, K., Schlaak, M., Becker, W., and Bufe, A. 1999. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin. Exp. Allergy* 29(4): 497–506.
179. Unkeless, J. C., Scigliano, E., and Freedman, V. H. 1988. Structure and Function of Human and Murine Receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6(1): 251–281.

180. James, L. K., Shamji, M. H., Walker, S. M., Wilson, D. R., Wachholz, P. A., and Francis, J. N., et al. 2011. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 127(2): 509–516.e5.
181. Ejrnaes, A. M., Svenson, M., Lund, G., Larsen, J. N., and Jacobi, H. 2006. Inhibition of rBet v 1-induced basophil histamine release with specific immunotherapy -induced serum immunoglobulin G: no evidence that FcγRIIB signalling is important. *Clin Exp Allergy* 36(3): 273–282.
182. Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103(2): 175–183.
183. Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Overbergh, L., Dupont, L. J., and Ceuppens, J. L., et al. 2006. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 61(3): 202–208.
184. Finotto, S., Neurath, M., Glickman, J., Qin, S., Lehr, H., and Green, F., et al. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295(5553): 336–338.
185. Lou, W., Wang, C., Wang, Y., Han, D., and Zhang, L. 2012. Responses of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and IL-10-secreting type I T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children. *Pediatr Allergy Immu* 23(2): 141–150.
186. Howard, M., and O'Garra, A. 1992. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13(6): 198–200.
187. Moore, K. W., O'Garra, A., Malefyt, R. W., Vieira, P., and Mosmann, T. R. 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11(1): 165–190.
188. Campbell, J. D., Buckland, K. F., McMillan, S. J., Kearley, J., Oldfield, W. L. G., and Stern, L. J., et al. 2009. Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J Exp Med* 206(7): 1535–1547.
189. Francis, J. N., Till, S. J., and Durham, S. R. 2003. Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 111(6): 1255–1261.
190. Fujimura, T., Yonekura, S., Taniguchi, Y., Horiguchi, S., Saito, A., and Yasueda, H., et al. 2010. The Induced Regulatory T Cell Level, Defined as the Proportion of IL-10⁺Foxp3⁺ Cells among CD25⁺CD4⁺ Leukocytes, Is a Potential Therapeutic Biomarker for Sublingual Immunotherapy: A Preliminary Report. *Int Arch Allergy Immunol* 153(4): 378–387.
191. van Overtvelt, L., Wambre, E., Maillere, B., Hofe, E. von, Louise, A., and Balazuc, A. M., et al. 2008. Assessment of Bet v 1-specific CD4⁺ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol* 180(7): 4514–4522.

192. Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R. D. 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274(23): 16513–16521.
193. Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B., and Schuler, G. 2002. Human CD4+CD25+ Regulatory, Contact-dependent T Cells Induce Interleukin 10-producing, Contact-independent Type 1-like Regulatory T Cells. *J Exp Med* 196(2): 247–253.
194. Senti, G., Moos, S. von, and Kündig, T. M. 2011. Epicutaneous allergen administration: is this the future of allergen-specific immunotherapy? *Allergy* 66(6): 798–809.
195. Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Dhelft, V., Ligouis, M., Puteaux, E., and Benhamou, P.-H., et al. 2011. Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice. *J Immunol* 186(10): 5629–5637.
196. Martinez-Gomez, J. M., Johansen, P., I, Erdmann, I., Senti, G., and Cramer, R., et al. 2009. Intralymphatic Injections as a New Administration Route for Allergen-Specific Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 150(1): 59–65.
197. Valenta, R., and Niederberger, V. 2007. Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 826–830.
198. Pauli, G., Larsen, T. H., Rak, S., Horak, F., Pastorello, E., and Valenta, R., et al. 2008. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 122(5): 951–960.
199. Liu, Y., Sun, Y., Chang, L.-J., Li, N., Li, H., and Yu, Y., et al. 2012 // 2013. Blockade of peanut allergy with a novel Ara h 2-Fcγ fusion protein in mice. *J Allergy Clin Immunol* 131(1): 213–221.e5.
200. Smarr, C. B., Hsu, C.-L., Byrne, A. J., Miller, S. D., and Bryce, P. J. 2011. Antigen-Fixed Leukocytes Tolerize Th2 Responses in Mouse Models of Allergy. *J Immunol* 187(10): 5090–5098.
201. Roesler, E., Weiss, R., Weinberger, E. E., Fruehwirth, A., Stoecklinger, A., and Mostböck, S., et al. 2009. Immunize and disappear—Safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J Allergy Clin Immunol* 124(5): 1070–1077.e11.
202. Ahangarani, R. R., Janssens, W., VanderElst, L., Carlier, V., VandenDriessche, T., and Chuah, M., et al. 2009. In Vivo Induction of Type 1-Like Regulatory T Cells Using Genetically Modified B Cells Confers Long-Term IL-10-Dependent Antigen-Specific Unresponsiveness. *J Immunol* 183(12): 8232–8243.
203. van Overtvelt, L., Lombardi, V., Razafindratsita, A., Saint-Lu, N., Horiot, S., and Moussu, H., et al. 2008. IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 145(2): 152–162.

-
204. Majak, P., Jerzyńska, J., Smejda, K., Stelmach, I., Timler, D., and Stelmach, W. 2012. Correlation of vitamin D with Foxp3 induction and steroid-sparing effect of immunotherapy in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 109(5): 329–335.
205. Milliken, S. V., Wassall, H., Lewis, B. J., Logie, J., Barker, R. N., and Macdonald, H., et al. 2012. Effects of ultraviolet light on human serum 25-hydroxyvitamin D and systemic immune function. *J Allergy Clin Immunol* 129(6): 1554–1561.
206. Dimeloe, S., Richards, D. F., Urry, Z. L., Gupta, A., Stratigou, V., and Farooque, S., et al. 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ promotes CD200 expression by human peripheral and airway-resident T cells. *Thorax* 67(7): 574–581.
207. Casale, T. B., and Stokes, J. R. 2011. Future forms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 127(1): 8–15.
208. Patel, P., and Salapatek, A. M. F. 2006. Pollinex ® Quattro: a novel and well-tolerated, ultra short-course allergy vaccine. *Expert Rev Vaccines* 5(5): 617–629.
209. Gawchik, S. M., and Saccar, C. L. 2009. Pollinex Quattro Tree: allergy vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 9(3): 377–382.
210. Kuehr, J., Brauburger, J., Zielen, S., Schauer, U., Kamin, W., and Berg, A. von, et al. 2002. Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 109(2): 274–280.

6 Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bregs	regulatorische B Zellen
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DC	Dendritische Zelle
DEREG	<i>Depletion of regulatory T cells</i>
DT	Diphtherie-Toxin
DTR	Diphtherie-Toxin-Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
engl	englisch
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FoxP3	<i>forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	Hämatoxylin und Eosin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulating factor
iTregs	induzierte regulatorische T-Zellen
Jak	Januskinase

LABA	Lang-wirksame β 2-Agonisten
LPS	Lipopolysaccharide
MCh	Methacholin
min	Minuten
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
nTregs	natürliche regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin
PAS	Perjod-Säure-Schiff-Reaktion
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD	<i>programmed death</i>
Penh	<i>enhanced pause</i>
PMA	Phorbolmyristataacetat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RABA	kurz wirksame β 2-Agonisten
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
ROR γ t	<i>RAR related orphan receptor γt</i>
RSV	respiratory syncytial virus
s.c.	subkutan
SCIT	subkutane allergenspezifische Immuntherapie
SEM	Standardfehler
SIT	allergenspezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale allergenspezifische Immuntherapie
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
tLN	trachealer Lymphknoten
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tr-1	<i>Typ-1-like regulatory Tcells</i>
Treg	regulatorische T-Zelle

TSLP *thymic stromal lymphopietin*

TZR T-Zell-Rezeptor

ZNS zentrales Nervensystem

α -SMA *alpha-smooth muscle actin*

7 Danksagung

[aus Datenschutzgründen gelöscht]

8 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

[aus Datenschutzgründen gelöscht]