

Zur Rolle der Antigenosiose in IgE-vermittelten Immunantworten und der allergischen Atemwegsentzündung

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg- Universität Mainz

Verena Raker

geb. am 05.11.1982
in Friesoythe

Mainz, den 03.08.2012

Angefertigt in der
Klinischen Forschergruppe Allergie
an der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin Mainz

Datum der mündlichen Prüfung:
22.11.2012

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mainz, den 03.08.2012

Verena Raker

Meinen lieben Eltern

A Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	1
B	Danksagung	5
C	Veröffentlichungen	6
D	Auszeichnungen	6

I. Einleitung

I.1.	Die spezifische Immuntherapie	9
I.2.	Die IgE -vermittelte Immunantwort (Typ 1 Allergie)	10
I.3.	Die allergische Atemwegsentzündung	13
I.4.	Die Rolle von Zytokinen in der TH2-vermittelten Immunantwort	15
I.4.1.	IL-4	15
I.4.2.	IL-5 und IL-13	15
I.4.3.	IL-10	16
I.5.	Zytokinquellen	17
I.6.	TH2-Antworten auslösende Parameter	18
I.7.	Die Rolle der Antigenpräsentation	21
I.8.	Toleranzinduktion	22
I.9.	Regulatorische T-Zellen	23
I.9.1.	Natürliche regulatorische CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen (nTreg)	23
I.9.2.	Induzierte regulatorische T-Zellen	25
I.9.3.	CD4-CD8 ⁻ doppelt negative T-Zellen	26

II. Material und Methoden

II.1.	Material	29
II.1.1.	Laborgeräte	29
II.1.2.	Labor- und Verbrauchsmaterial	31
II.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	33
II.1.4.	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	35

II.1.4.1.	Allgemein verwendete Lösungen und Puffer	35
II.1.4.2.	Lösungen und Puffer für ELISA und FACS-Analysen	36
II.1.5.	Kulturmedien und Medienzusätze	37
II.1.5.1.	Medien und Supplemente für Zellkulturarbeiten	37
II.1.6.	Sonstige Zusätze	38
II.1.7.	Antikörper	39
II.1.7.1.	Antikörper für die FACS-Analyse (Oberfläche)	39
II.1.7.2.	Antikörper für die FACS-Analyse (intrazellulär)	40
II.1.7.3.	Isotypkontrollantikörper für die FACS- Analyse	41
II.1.7.4.	Antikörper für die Absättigung unspez. Bindungsstellen	42
II.1.7.5.	Antikörper für den Immunglobulin-ELISA	42
II.1.7.6.	Antikörper für den Zytokin-ELISA	43
II.1.7.7.	Antikörper für die Zellaktivierung	44
II.1.7.8.	Magnetpartikel mit gekoppeltem Antikörper für die MACS®-Separation	44
II.1.8.	Zytokine	45
II.1.9.	Peptide	45
II.1.10.	Antigene	45
II.1.11.	Enzyme	46
II.1.12.	Zelllinie (RBL-2H3)	46
II.1.13.	Versuchstiere	47
II.2.	Methoden	48
II.2.1.	Tierversuche und Immunisierungsmethoden	48
II.2.1.1.	Proteinimmunisierungen	48
II.2.1.2.	Serumgewinnung	49
II.2.1.3.	Intravenöser adoptiver Zelltransfer	49
II.2.2.	Zellbiologische Methoden	50
II.2.2.1.	Allgemeines zu Zellkulturbedingungen	50
II.2.2.2.	Präparation von Organen	50
II.2.2.3.	Bestimmung der Lebendzellzahl	52

II.2.2.4.	Antigenspezifische Restimulation von Immunzellen	53
II.2.2.5.	Lymphozytenseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation	53
II.2.2.6.	Proliferationstest	54
II.2.2.7.	Degranulationstest (RBL-Test)	55
II.2.2.8.	Lungenfunktionsmessung	57
II.2.2.9.	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	59
II.2.2.10.	Herstellung von Zytospinpräparaten	60
II.2.2.11.	Differenzierung von Zellen aus der BAL	60
II.2.2.12.	Enzyme-linked- Immunosorbent Assay (ELISA)	60
II.2.2.13.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	64
II.2.2.14.	Magnetische Zellseparation	67
II.2.2.15.	Markierung von Immunzellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	70
II.2.2.16.	OVA- spezifischer Suppressionstest	71
II.2.3.	Statistik	73

III. Ergebnisse **74**

III.1.	Analyse der antigendosis-abhängigen Regulation der IgE-Produktion nach adjuvansfreier subkutaner Applikation von KLH	74
III.1.1.	Analyse der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigendosen	75
III.1.2.	Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit hohen Antigendosen auf die Induktion einer nachfolgenden IgE-Immunantwort	80
III.1.3.	Effekt einer therapeutischen Immunisierung mit hohen Antigendosen auf eine bereits etablierte IgE-Antwort	82
III.2.	Analyse der Antigendosis-abhängigen Regulation der IgE-Produktion nach subkutaner Applikation des Modellallergens Ovalbumin (OVA)	84
III.2.1.	Analyse der Produktion von IgE- und IgG-Antikörpern nach Immunisierung mit unterschiedlichen OVA-Dosen.	85
III.2.2.	Analyse des Effekts der prophylaktischen bzw. therapeutischen Applikation von hohen OVA-Dosen auf die Induktion einer IgE-Immunantwort	90
III.3.	Induktion von T-Zell-Toleranz nach Applikation hoher OVA-Dosen	97
III.4.	Effekt der Sensibilisierungsdosis im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung	99

III.5. Analyse der Induktion von regulatorischen T-Zellen nach Applikation von Hochdosen	107
III.6. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von dnTZ	114
III.6.1. Untersuchungen zur Häufigkeit von dnTZ in LD- und HD-Mäusen	115
III.6.2. Untersuchungen zur Oberflächenexpression LD und HD dn-T-Zellen	117
III.6.3. Untersuchungen der Zytokinproduktion von restimulierten dn-T-Zellen aus LD- und HD-Mäusen	123
III.7. Funktionelle Analyse der dnTZ aus LD- und HD-Mäusen	125
IV. Diskussion	129
<hr/>	
IV.1. Die Rolle der Antigenendosis in der Regulation der IgE-Produktion im Mausmodell	129
IV.2. Die Rolle der Antigenendosis im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung	135
IV.3. Die Rolle von CD4-CD8- doppelt negativen T-Zellen in der	138
IV.4. Regulation der IgE-Produktion	138
V. Literaturverzeichnis	147
<hr/>	
VI. Zusammenfassung	163
E Abkürzungsverzeichnis	165
F Lebenslauf	167

C Veröffentlichungen

Originalpublikationen

Barwig C, Raker V, Montermann E, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Antigen dose-dependent suppression of murine IgE responses is mediated by CD4(-)CD8(-) double-negative T cells. Clin. Exp. Allergy 2010; 40(6):891–901.

Bacher N, Hofmann C, Graulich E, Schwenk M, Baumgrass R, Bopp T, Zechner U, Raker V, Becker C, Steinbrink K. Interferon- α disarms human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells through cAMP repression. Eingereicht im August 2012 (Blood).

Raker V, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. The role of CD4-CD8-dnTZ induced by high allergen doses in the regulation of IgE-mediated immune responses. Manuskript in Vorbereitung.

Reviews

Raker V, Reske-Kunz A.B., Sudowe, S. Weniger ist mehr und mehr ist weniger: Zur Rolle der Allergendosis bei der Suppression von IgE-vermittelten Allergien. Allergo J 2012; 21(3):160-164.

Fachbuchbeiträge

Raker V, Maxeiner J, Reske-Kunz A.B., Sudowe S. Efficiency of biolistic DNA vaccination in experimental type I allergy. Methods in Molecular Biology: Biolistic DNA delivery. Band 940; 2013 (Im Druck).

Kongressbeiträge (Vorträge)

Raker V, Barwig C., Montermann E., Grabbe S., Reske-Kunz A.B., Sudowe S.: Induction of CD4-CD8- double-negative T cells, acting as suppressor cells in IgE immune responses is antigen dose-dependent. 8th EAACI.GA2LEN Immunology Winter School, 11.-14. Februar 2010, Grainau.

Raker V, Barwig, C, Höhn Y, Montermann E, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. DNA-based co-expression of TGF- β 1 limits transgene-specific immune responses in a mouse model of type I allergy. 22. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen

Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 11./12. März 2010, Mainz. Allergo-Journal 19: 49.

Raker V, Maxeiner J, Montermann E, Grabbe S, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Sensitization with high antigen doses via the subcutaneous route without adjuvant inhibits IgE production and prevents the induction of airway hyperresponsiveness in a mouse model of allergic airway inflammation. 23. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 10./11. März 2011, Mainz. Allergo-Journal 20: 43.

Raker V, Barwig C, Montermann E, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Sensitization with high antigen doses via the subcutaneous route without adjuvant inhibits IgE production and prevents the induction of airway hyperresponsiveness in a mouse model of allergic airway inflammation. 6th German Allergy Congress. 8.-10. September 2011, Wiesbaden.

Raker V, Maxeiner J, Montermann E, Grabbe S, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. CD4-CD8- double negative T cells with regulatory function are induced by exposure to high antigen doses via the subcutaneous route without adjuvant. 24. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 22./23. März 2012, Mainz. Allergo-Journal 21 (1): 53.

Kongressbeiträge (Poster)

Raker V, Barwig C, Montermann E, Scholtes P, Finotto S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Effect of co-expression of TGF- β 1 after gene gun-mediated DNA immunization on transgene-specific immune responses. 2nd European Congress of Immunology, 13. – 16. September 2009, Berlin. Eur. J. Immunol. 39 (Supplement 1): S549.

Raker V, Höhn Y, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Impact of biolistic co-vaccination with TGF- β 1 encoding plasmid DNA on antigen-specific immune responses in a mouse model of type I allergy. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, 26.-30. September 2010, Lugano, Schweiz.

Raker V, Maxeiner J, Montermann E, Grabbe S, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Subcutaneous sensitization with high antigen doses without the use of adjuvant prevents the induction of IgE production and airway hyperresponsiveness in experimental allergic airway inflammation. 30th Congress of the European Academy

of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), 11. – 15. Juni 2011, Istanbul, Türkei.

Raker V, Maxeiner J, Montermann E, Grabbe S, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. The role of CD4-CD8- double negative T cells in the regulation of IgE immune responses. 2011 Joint Annual Meeting SIICA-DGfI, 28. -01. Oktober 2011, Riccione, Italien.

Sudowe S, Barwig C, Raker V, Montermann E, Grabbe S, Reske-Kunz AB. Suppression of murine IgE production by CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells. 4. Gemeinsamer Deutscher Allergiekongress, 03.-06. September 2009, Berlin. Allergo-Journal 18 (Sonderheft 1): S24.

Sudowe S, Barwig C, Raker V, Montermann E, Grabbe S, Reske-Kunz AB. Induction of CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells as suppressor cells of IgE production by immunization with high antigen doses. World Immune Regulation Meeting (WIRM) IV, 29. März - 01. April 2010, Davos, Schweiz.

D Auszeichnungen

März 2011 Bester Beitrag der Sitzung „Atemwege“ auf dem 23. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI).

Juni 2011 Posterpreis in der Sitzung „Immunological advances in allergen immunotherapy“ auf dem 30. Kongress der European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) 2011 in Istanbul (Türkei).

Sept. 2011 1. Posterpreis der DGAKI Junior Member Poster Sitzung auf dem 6. Deutschen Allergiekongress (8.-10 September 2011) in Wiesbaden.

Dez. 2011 Doktorandenpreis und Reisestipendium der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz 2011.

I. Einleitung

Im Jahre 1911 entwickelten Leonard Noon und John Freeman die Grundlagen für die bislang einzige ursächliche Therapiemöglichkeit von Allergien, die spezifische Immuntherapie (SIT). Die auch als Hyposensibilisierung bekannt gewordene Immuntherapie wurde seit ihrer Entdeckung vor hundert Jahren konstant im Hinblick auf Sicherheit und Effizienz verbessert. Derzeit leiden in Deutschland etwa 25% der Bevölkerung unter einer oder mehreren Sensibilisierungen gegen Umweltantigene, wie Gräser- oder Baumpollen, Hausstaubmilben-antigenen oder Katzenhaaren. Neben der Zunahme von Allergien, die durch Allergene in der Luft, sogenannte Aeroallergen ausgelöst werden, gibt es auch immer mehr Unverträglichkeiten gegen Lebensmittel und deren Bestandteile. Die steigende Anzahl von Patienten mit Allergien macht die allergologische Grundlagenforschung zur Allergieprävention und -behandlung auch aufgrund der zunehmenden Belastung der Gesundheitssysteme notwendig (1–3).

I.1. Die spezifische Immuntherapie

Durch intervenierende Maßnahmen in vivo Mechanismen der peripherer Toleranz herbeizuführen, ist ein wichtiger Ansatz der Therapie von Allergien. Im Zuge der subkutanen SCIT werden dem allergischen Patienten wiederholt ansteigende Dosen des spezifischen rekombinanten Allergens oder von Allergenextrakten bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis subkutan gespritzt. Die Gabe der hohen Dosen des Allergens soll im Patienten zu einer Toleranzinduktion gegen das Allergen führen und kann die Gefahr von neuen Sensibilisierungen verringern (4). Die Notwendigkeit von wiederkehrenden Injektionen, der hohe Zeitaufwand für die Behandlung, die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks und die lange Therapiedauer von drei bis fünf Jahren machten es notwendig Alternativen zur SCIT zu erforschen. So gibt es mittlerweile als alternative Applikationsform der SIT die Möglichkeit das Allergen in Tablettenform sublingual zu sich zu nehmen (SLIT), womit bei weitaus geringerem Anaphylaxie-Risiko ähnliche Therapieerfolge erzielt werden. Die Behandlungsdauer verkürzt sich dadurch allerdings nicht, sehr wohl aber die Compliance der Patienten. Des Weiteren gibt es vielversprechende Studien zur sogenannten Ultra-Rush-SIT, bei

der während eines stationären Aufenthalts des Patienten mit bis zu drei Dosen pro Tag die Erhaltungsdosis schneller erreicht werden kann und ähnliche Langzeiteffekte wie bei der herkömmlichen SCIT zu erwarten sind. Erfolgversprechend ist die SCIT vor allem bei Bienengift-allergikern und schwachen Monosensibilisierungen.

Die Mechanismen die dem Erfolg einer SIT zugrunde liegen, sind bislang weitgehend ungeklärt. Es konnte jedoch in vielen Studien gezeigt werden, dass es zu einer Verschiebung der T-Zell-Immunantwort von einem TH2 geprägten Typ in TH1 Richtung und vor allem zu einer Induktion von spezifischen regulatorischen T-Zellen kommt (4–6). Eine gesteigerte Produktion von IL-10 wurde bei SIT Patienten bereits 1997 von Bellinghausen et al. beschrieben und später auch von anderen Studien bestätigt. Sie konnten zeigen, dass Blutmonozyten von Bienenallergiker nach der SIT eine reduzierte Proliferation nach Restimulation mit dem Bienengiftallergen aufwiesen. Sie konnten außerdem zeigen, dass nach der SIT vermehrt IL-10 gebildet wurde. Die Blockierung der IL-10-Produktion durch monoklonale Antikörper gegen IL-10 konnte die zuvor beobachtete inhibierende Wirkung der SIT auf die Proliferation von mononuklären Zellen aufheben. Die Induktion von IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen gilt daher als wichtiges Ereignis einer erfolgreichen SIT (4, 7–10). Des Weiteren ist zu beobachten, dass die saisonale Produktion von allergenspezifischem IgE bei SIT-Patienten verringert ist, die allergeninduzierte spezifische T-Zell- Proliferation gehemmt ist und vermehrt allergenspezifische B-Zellen zur Produktion von IgG4-Antikörpern angeregt werden (11). Außerdem konnte eine signifikante Abnahme von Mastzellen und Eosinophilen nach einer SIT verzeichnet werden, was mit einer geringeren Freisetzung von Entzündungsmediatoren verbunden war und positive Auswirkungen auf die klinische Symptomatik der Patienten hatte (12, 13).

I.2. Die IgE -vermittelte Immunantwort (Typ 1 Allergie)

1968 teilten Coombs und Gell allergische Reaktionen anhand ihrer pathophysiologischen Mechanismen in vier Typen ein. Die ersten drei Typen werden durch Antikörper vermittelt, während an der Ausprägung der Typ 4 Allergie T-Zellen beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Typ 1 Allergie, die

durch IgE-Antikörper vermittelt ist und als Allergie vom Soforttyp bekannt ist, da die allergische Reaktion schon binnen Sekunden bis wenigen Minuten nach Allergenkontakt einsetzt (14). Allen allergischen Reaktionen vom Sofort-Typ ist ein Merkmal gemeinsam: an ihrer Entstehung sind zentral Immunglobuline der IgE-Subklasse beteiligt. Die Sensibilisierung des Immunsystems auf ein potentielles Allergen verläuft in zwei Phasen, der Sensibilisierung und der Provokation.

Am Anfang der ersten Phase steht der Eintritt des Allergens durch die (Schleim)-Haut. Das Allergen wird von unreifen dendritischen Zellen (DZ) in der Haut mittels Makropinozytose aufgenommen. Die Aufnahme des Allergens führt zur Migration der DZ in die sekundären lymphatischen Organe und bedingt die Differenzierung (Maturierung) der DZ und damit eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Molekülen. Das Allergen wird dabei von der DZ in Peptide zerlegt und als Peptid-MHC-Komplex auf der Oberfläche präsentiert. Durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle zusammen mit dem Peptid-MHC-Komplex ist eine Aktivierung von allergenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch die DZ möglich. In einem weiteren Schritt können allergenspezifische B-Plasmazellen durch aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen aktiviert werden (15–17). Die Aktivierung einer geringen Anzahl von allergenspezifischen B-Zellen durch CD4⁺ T-Helferzellen führt letztendlich zur Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern, welche spezifisch an die hochaffinen FcεRI-Rezeptoren auf Gewebsmastzellen und Basophilen binden (18, 19).

Die Beladung der Mastzellen mit den allergenspezifischen IgE-Antikörpern führt somit als letzter Schritt der Sensibilisierung zur Generierung einer Population von Gewebsmastzellen, die Allergen binden können (Abb. 1).

In der symptomatischen Provokationsphase der allergischen Reaktion kommt es durch den erneuten Kontakt mit dem Allergen zur Aktivierung von den während der Sensibilisierung mit IgE beladenen Effektorzellen. Das Allergen bindet hierbei an die spezifischen IgE-Antikörper auf den Effektorzellen im Gewebe, zum Beispiel der Haut. Kommt es durch die Bindung des Allergens zur Kreuzvernetzung mehrerer FcεRI-Rezeptoren auf den mit IgE-beladenen Mastzellen, wird diese aktiviert. Die Aktivierung der Rezeptoren bewirkt über eine intrazelluläre Kaskade aus Signalmolekülen und Adaptorproteinen die Degranulation der Gewebsmastzellen.

Die auf diese Weise herbeigeführte Freisetzung von u.a. biogenen Aminen wie Histamin, Serotonin und diversen Mastzell-Proteasen führt in der Frühphase (30-60 Minuten nach Allergenkontakt) zu Vasodilatation, Muskelkontraktion, Gewebeschädigungen und -reizungen mit den bekannten klinischen Symptomen wie Schwellungen und Juckreiz (17, 19–21).

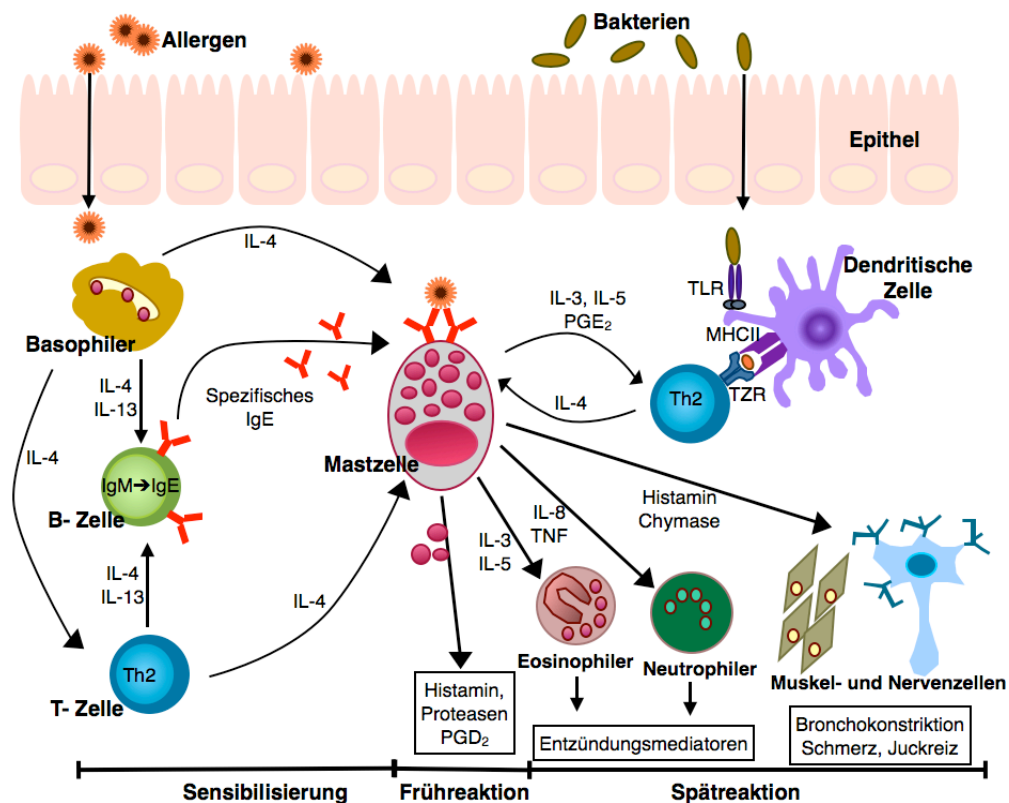


Abb. 1 Die Aktivierung von Mastzellen benötigt im Rahmen der Sensibilisierung die Freisetzung von spezifischem IgE aus B-Zellen (reguliert durch IL-4 und IL-13 aus TH2-Zellen und Basophilen) und IL-4 zur Verstärkung der Mediatorfreisetzung während des Mastzell-Primings. Durch die Kreuzvernetzung von membranständigem IgE auf den Mastzellen durch Allergene, die wegen einer Dysfunktion der Hautbarriere in das Gewebe gelangen, aber auch über Mechanismen der adaptiven Immunantwort werden residente Mastzellen in der Frühphase zur Freisetzung von Histaminen und anderen Mediatoren aktiviert. Mastzellmediatoren wie IL-3, IL-5, TNF und IL-8 führen in der Spätphase der allergischen Reaktion zur Rekrutierung von aktivierten Eosinophilen, Neutrophilen und TH2-Zellen, aber auch zur Interaktion mit Muskel- und Nervenzellen. Unspezifische Stimuli, wie LPS oder IgE-Fragmente können bei Beeinträchtigung der Hautbarriere durch z.B. allergiebedingte Urtikaria in der Abwesenheit des Allergens zur Verstärkung der allergischen Manifestationen, wie Juckreiz beitragen. TZR, T-Zell-Rezeptor; MHCII, Haupthisto-kompatibilitätskomplex II; TLR, Toll-like Rezeptor zur Erkennung von bakteriellen Komponenten. 1. Modifiziert, nach *Bischoff, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. Nat Rev Immunol 7, 93–104 (2007).*

Im Zuge der Spätphase der allergischen Reaktion (3-6 Stunden nach Allergenkontakt) kommt es durch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekül des Endothels (VCAM-1, P-Selectin, E-Selectin) und die Entstehung diverser Chemokingradienten zur Rekrutierung von Eosinophilen, T-Lymphozyten und anderen Entzündungszellen. Durch die Freisetzung einer Vielzahl von gespeicherten Mediatoren aus Eosinophilen, wie Peroxidasen, Lysozym und Kollagenasen oder zytotoxischen Produkte wie ECP und MBP (Major Basic Protein) und neurotoxisch wirkende Substanzen wie EDN (Eosinophil-Derived Neurotoxin) werden die allergischen Reaktionen verlängert und verstärkt (17). Weshalb eine Antigen das Immunsystem auf diese Weise aktiviert und somit als Allergen wirkt ist nicht genau bekannt, allerdings kommen hierfür verschiedene Parameter in Frage.

I.3. Die allergische Atemwegsentzündung

Die klinischen Parameter, die eine allergische Atemwegsentzündung ausmachen sind die Produktion von IL-5, IL-13 und IL-4 in der Lunge, eine gesteigerte Eosinophilie, die Becherzellhyperplasie und eine gesteigerte Mukusproduktion. Zur Analyse der allergischen Reaktion in der Lunge wird vielfach ein murines Asthmodell verwendet werden. Im klassischen Ansatz werden Versuchstiere mit einem Allergen z.B. OVA systemisch sensibilisiert, was eine Aktivierung von TH2-Zellen zur Folge hat. Anschließend wird das Allergen in der Provokationsphase intranasal bzw. als Aerosol verabreicht. Die erneute Provokation mit dem Allergen führt in Anwesenheit von TH-2-Zytokinen wie IL-5 und IL-13 etc. zur Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten und anderen Effektorzellen. Die Auslösung einer TH2-Antwort ist also entscheidend für die Ausbildung von z.B. allergischem Asthma. Doch es sind nicht nur die von T-Zellen sekretierte Zytokine, die eine TH2-Polarisation begünstigen. Dass das von Makrophagen und Epithelzellen sekretierte Zytokin TSLP eine initiale Rolle in der Polarisierung einer TH2-Antwort spielt, zeigt eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2005. So führte die gewebsspezifische Überexpression von TSLP in der Lunge im Asthmodell zu einer AHR in den Versuchstieren (22). Die übermäßige Ausschüttung von TSLP ist mit atopischer Dermatitis, Asthma und Nahrungsmittelallergien assoziiert und führt in Tiermodellen zu einer TH2-Zytokin-vermittelten

Immunität und Inflammation (23). In Asthmatikern fand man eine Überexpression von TSLP in Epithelzellen, die mit der Schwere des Krankheitsbildes einherging (24). Das Zytokin IL-25, auch IL-17E genannt, wurde erstmals aus cDNA Bibliotheken von TH2-Zellen kloniert (25). Weitere Quellen sind Mastzellen, Basophile, Eosinophile und Epithelzellen (26–28). Über eine Inhibition der Wirkung von IFN- γ und IL-17 ist IL-25 in der Lage Th1-vermittelte Inflammation zugunsten einer Th2 basierten Immunantwort abzuschwächen (29). Außerdem führt die Defizienz für IL-25 in einem murinen Ovalbumin-induzierten Asthmadmodell zu einer Reduktion der Atemwegsentzündung (26, 30). Im Menschen sind Polymorphismen im Gen für den IL-25- Rezeptor (IL-17RA) mit einem asthmatischen Krankheitsbild korreliert (31).

Es wurde beschrieben, dass IL-33 als Gefahrensignal, als sogenanntes Alarmin oder DAMP (danger associate molecular pattern) bei Allergenexposition und Endothelschäden freigesetzt werden kann (32). Quellen von IL-33 sind neben Endothel- und Epithelzellen der Schleimhäute und Blutgefäße die Keratinozyten in der Haut. DZ zeigen in Anwesenheit von IL-33 eine Aufregulation von Reifungsmarkern, wie CD40, CD80 und OX40L und sind sehr effektiv in der Induktion von TH2-Immunantworten (33, 34). Die intraperitoneale Injektion von rekombinantem IL-33 induziert im Mausmodell eine Splenomegalie, pulmonare Eosinophilie, und die Produktion von IgE-Antikörpern. Zusätzlich zu den bekannten TH2-Zytokinen in der allergischen Reaktion wird zunehmend auch TH17-Zellen, im Zusammenhang mit asthmatischen Phänotypen charakterisiert. Die Einteilung der T-Zellpopulationen von Mosmann et al. in TH1- oder TH2-polarisierte Subpopulationen (35) wurde 2005 durch die Entdeckung einer inflammatorischen exklusiv IL-17 produzierenden T-Zellpopulation erweitert (36–39). TH17-Zellen produzieren IL-17, IL-17F und IL-22, was durch die massive Verbreitung von IL-17 und IL-22 Rezeptoren zu einer starken Gewebsreaktion führt. TH17-Zellen wird vorrangig eine Rolle in der Autoimmunität zugesprochen, in Kombination mit IL-23 sind TH-17-polarisierte T-Zellen aber auch in der Lage eine neutrophile Atemwegsentzündung zu induzieren und außerdem eine Erhöhung der TH2-vermittelten Eosinophilie zu bewirken (40, 41). Den TH17-Zellen werden aber auch positive Wirkungen auf das Immunsystem zugeschrieben. In einem Mausmodell des

allergischen Asthma konnte durch den Transfer von IL-17-produzierenden gamma-delta-T-Zellrezeptor tragenden TH17-Zellen eine Auflösung der Atemwegs-entzündung und Atemwegshyperreaktivität herbeigeführt werden (42).

I.4. Die Rolle von Zytokinen in der TH2-vermittelten Immunantwort

Die allergische Entzündung ist gekennzeichnet durch eine massive Aktivierung von TH2-polarisierten T-Zellen, eosinophiler Infiltration und allergenspezifischer IgE-Produktion (43). Die physiologische Rolle kommt TH2-Zellen bei der Abwehr von Helminthen zu. Als Zytokine, die von TH2 Zellen gebildet werden, sind hierbei vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 zu nennen. Neben dem klassischen TH2-Zytokin IL-4 wurden mittlerweile weitere Zytokine identifiziert, die nicht von T-Zellen sekretiert werden (TSLP, IL-25 (IL-17E) und IL-33), aber bei der TH2-Differenzierung eine entscheidende Rolle spielen (44).

I.4.1. IL-4

Interleukin-4 ist ein klassisches TH2-Zytokin, lange Zeit wurde angenommen, dass es essentiell für die Initiation einer TH2-vermittelten Immunantwort sei (45, 46). Mittlerweile wurde allerdings gezeigt, dass auch in der Abwesenheit eines effektiven IL-4-abhängigen Signalweges über STAT 6 (signal transducer and activator of transcription-6 phosphorylation)- Phosphorylierung die Differenzierung von TH2-Zellen stattfinden kann (47, 48). Dies führte zu der Annahme, dass IL-4 zwar die Zahl der TH2-Zellen beeinflussen kann, aber grundlegend nicht essentiell für die TH2-Polarisierung ist. Mittlerweile ist weitestgehend akzeptiert, dass IL-4 über eine erhöhte Expression von GATA-3 eine wichtige Rolle in der Expression von TH2-Effektorzytokinen wie IL-5 und IL-13 spielt (49, 50). Eine wichtige Rolle spielt IL-4 auch in der Initiation des Isotyp-Klassenwechsels von B-Zellen zu IgE (19).

I.4.2. IL-5 und IL-13

Die Zytokine IL-5 und IL-13 gelten als klassische TH2-Zytokine und sind vor allem in der Effektorphase der allergischen Immunantwort entscheidend. Die allergische

Atemwegsentzündung beispielsweise ist im Tiermodell, wie auch im Menschen, gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge; erhöhten Konzentrationen von IL-4, IL-5, and IL-13 in der bronchoalveolären Flüssigkeit und erhöhtem IgE-Titer im Serum (51). IL-5 ist vor allem für das Überleben und die terminale Differenzierung der Eosinophilen verantwortlich (52). Rückschläge im therapeutischen Einsatz von IL-5-blockierenden Antikörpern erfuh man durch die Erkenntnis, dass der Einsatz dieser monoklonalen Antikörper (Mepolizumab und SCH55700) zwar die Anzahl Eosinophiler im Blut reduzieren konnte, dass dies aber nicht mit einer klinischen Besserung der Symptome assoziiert war (53, 54).

Nach Stimulation mit IL-2 sind NK-Zellen in der Lage das TH2-Zytokin IL-13 auszuschütten (55). IL-13 wird außer von Th2-Zellen und NK-Zellen von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems produziert, so zum Beispiel von alveolaren Makrophagen (56), Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen (57). Darüber hinaus ist IL-13 am Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE beteiligt (19).

I.4.3. IL-10

Interleukin 10 wurde zunächst im humanen System als TH2- Zytokin verstanden (58–60). Durch die Entdeckung der induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iTreg), die ihre suppressierende Wirkung über IL-10 ausüben (Tr1) wurde IL-10 dann auch im Zusammenhang mit regulatorischen Prozessen diskutiert (61, 62). So inhibiert IL-10 z.B. die Funktion von Eosinophilen und supprimiert die IL-5-Produktion von humanen ruhenden TH0- und TH2-Zellen (63). Sekretiertes IL-10 vermindert die Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen auf APZ und inhibiert so die proliferative T-Zellantwort gegen eine große Anzahl von Allergenen, jedoch nicht wenn eine polyklonale Stimulation über CD3 erfolgt ist (64). Im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung konnte gezeigt werden, dass Foxp3+ regulatorische T-Zellen über einen IL-10-abhängigen Mechanismus vor einer Atemwegshyperreaktivität schützen können (65).

I.5. Zytokinquellen

T-Zellen galten lange Zeit als eine Hauptquelle von mit TH2-Antworten assoziierten Zytokinen. Die Entdeckung, dass auch in T-Zell- und B-Zell-defizienten Rag2^{-/-}-Mäusen nach Stimulation mit IL-25 TH2-Zytokine wie IL-5 und IL-13 gebildet wurden, sorgte für die Suche nach weiteren Quellen dieser Zytokine (25). So konnte gezeigt werden, dass während eines parasitären Befalls von Rag2^{-/-}-Mäusen mit Helminthen IL-25 eine große Rolle bei der Expansion von sogenannten NBNT (Nicht-B-Nicht-T)-Zellen spielt und in Abwesenheit dieser NBNT-Zellen der Parasit nicht ausgeschieden werden konnte (66).

Im Jahr 2010 fanden Neil et al in einem parasitären Infektionsmodell, dass die Hauptquelle für IL-13 eine bis dahin unbeschriebene Zellpopulation ist, die sie nach dem 13. Buchstaben des griechischen Alphabets Nuozyten nannten. Sie konnten zeigen, dass ein adoptiver Transfer dieser Zellen in Mäuse, die aufgrund einer geschwächten TH2-Antwort Defizienzen in der Parasitenabwehr hatten, eine Ausscheidung des Parasiten erfolgte. Versuche mit IL-13 defizienten Nuozyten zeigten außerdem, dass nur das von Nuozyten produzierte IL-13, die Ausscheidung der Parasiten herbeiführen konnte (67). Es wurden in parasitären Mausmodellen zuvor bereits mehrere andere lymphoide Zellpopulationen beschrieben, die eine Rolle in der TH2-vermittelten Immunität ausüben und deren Wirkmechanismen es nun galt miteinander in Zusammenhang zu bringen (66, 68, 69).

Etwa zur selben Zeit identifizierte eine Gruppe Wissenschaftler einen Zelltyp, der in der Lage war in mit dem Parasiten *Trichuris muris* infizierten IL-25-defizienten Mäusen die TH2-Antwort wiederherzustellen. Diese Zellen zeigten keine Expression von IL-4, waren aber positiv für den Mastzell-assoziierten Oberflächenmarker c-Kit. Diese c-Kit⁺ IL-4⁻ NBNT-Zellen wurden wegen ihres Effekts in den T. muris infizierten IL-25-defizienten Mäusen MPP-Typ 2 (multipotent- progenitor type 2)-Zellen genannt. MPP_{type2}-Zellen sind wichtig für die TH2-Antwort (70), zeigen aber keine Effekte auf die Expression von IL-13 und IL-5, wie sie für Nuozyten beschrieben wurden (67–69). Es wird angenommen, dass die bisher beschriebenen MPP_{type2}-Zellen eine heterogene Zellpopulation darstellen, denn sie haben die Fähigkeit der Ausdifferenzierung in verschiedene Zelltypen der angeborenen

Immunabwehr, wie Mastzellen, Basophile und Makrophagen (70).

Die Rolle von Basophilen in der TH2-Polarisierung ist sehr kontrovers diskutiert worden. Basophile wurden als frühe Quelle für IL-4 beschrieben (Voehringer et al., 2004) und sind als Antigen präsentierende Zellen und somit Initiatoren der TH2-Immunität diskutiert worden (Sokol et al, 2008). Andererseits konnte zwei Jahre später gezeigt werden, dass nicht Basophile sondern inflammatorische DZ in der Basophilenpopulation initial an der Induktion einer TH2-Antwort in der Lunge beteiligt sind (Hammad et al, 2010).

I.6. TH2-Antworten auslösende Parameter

Für die Auslösung einer adaptiven TH1- Immunantwort werden Antigene von Zellen des angeborenen Immunsystem endozytiert, prozessiert und über MHC II Moleküle an CD4+-T-Zellen präsentiert. Für die Auslösung einer TH2 vermittelten Immunantwort, wie die gegen Parasiten oder Pollen ist die Phagozytose als Aufnahmeweg, aufgrund der Größe der Pathogene, nicht wahrscheinlich. Man nimmt daher an, dass die vom Pollen oder Parasiten während seines Lebenszyklus ausgeschiedenen Proteine von APZ phagozytiert und prozessiert werden. Für die Entstehung einer TH2-polarisierten T-Zelle ist das umgebende Zytokinmieu entscheidend. In Anwesenheit von IL-4 differenzieren TH0-Zellen über die Erkennung von Peptid-MHC-Molekülen auf der APZ und unter Einfluss eines kostimulatorischen Signals zu TH2-Zellen. Die aktivierte TH2-Zelle regt wiederum B-Zellen zur Produktion von antigenspezifischem IgE an. Das IL-4 enthaltene Zytokinmieu unterstützt neben IL-13 hierbei den Klassenwechsel der B-Zellen zu IgE. Die sezernierten IgE-Moleküle binden an Antigenmoleküle auf den Parasiten (Opsonisierung) und machen die Parasiten somit erkennbar für IgE-Rezeptor tragende Effektorzellen im Darm, wie Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Durch die Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren auf den Effektorzellen werden diese aktiviert und sezernieren biogene Amine und toxische Enzyme, die zur Abtötung des Parasiten führen (71).

Für die Initiation einer TH2-Differenzierung gibt es Berichte über ein weiteres Signal der angeborenen Immunantwort. Anhand von murinen in vivo Versuchen wurde

beschrieben, dass Cysteinproteasen wie Papain oder Hausstaubmilben-Antigen (Der p 1) TH2- Antworten auslösen können (72, 73). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Basophile und Epithelzelllinien, die mit Cysteinproteasen behandelt wurden, eine Vielzahl von TH2-Zytokinen produzieren, z.B. IL-4 und TSLP (73, 74). Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass bei TH2- Antworten ebenfalls ein Signal über TLR-4 (Toll like Rezeptor 4) erfolgen kann. Hausstaubmilbenextrakte können Kontaminationen von Lipopolysaccharid (LPS) enthalten. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und ein Ligand für TLR-4. Eine Studie von Trompette et al. untersuchte die Homologie von Der p 1 und MD2, der LPS bindenden Einheit am TLR-4 und fand strukturelle Ähnlichkeiten (75). Hammad et al. fanden auf der anderen Seite heraus, dass die intranasale Applikation von HDM (house dust mite)- Allergen auch in Abwesenheit von MD2 eine TH2-Antwort auslösen kann (76). Im Tierversuch ist es möglich durch die Gabe von Ovalbumin (OVA) in Kombination mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) eine TH2-Antwort zu induzieren. Die Wirkmechanismen von Alum sind jedoch nicht vollständig geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass durch Alum aktivierte DZ eine verstärkte Expression von IL-1, IL-18 und vor allem IL-33 zeigen (77). Eine weitere wichtige Rolle im Wirkmechanismus von Alum scheint eine Caspase-1 abhängige Aktivierung des Inflammasoms (NLRP3) zu sein. NLRP3-defiziente Mäuse zeigen nach Stimulation mit Alum einen verminderten Klassenwechsel zu IgE (78). Die Zusammenhänge zwischen Alum und IL-33 werden vor allem im Hinblick auf die Abhängigkeit des Wirkmechanismus von Caspase-1 kontrovers diskutiert (79, 80). Es ist auch diskutiert worden, dass Alum über die Produktion von Harnsäure eine Gewebsschädigung hervorruft, was zur Freisetzung von biologisch aktivem IL-33 führt und somit die Expression von verschiedenen TH2-Zytokinen begünstigt (77).

Man nimmt an, dass während der Entwicklung des Immunsystems bestimmte Faktoren die Ausbildung eines TH1 geprägten Immunsystems begünstigen. So stellt die Aufnahme von mikrobiellen Bestandteilen durch Makrophagen über die Produktion von IL-12 und der anschließenden Aktivierung von IFN- γ sekretierenden Natürlichen Killer (NK)- und TH1-Zellen einen wichtigen Stimulus in TH1 Richtung dar (81). Verbesserte Hygiene und die Verwendung von Antibiotika in der industrialisierten Welt sind laut vieler europaweiter Studien Gründe für die geringere

Inzidenz von bakteriellen Infektionen im Säuglingsalter, die ansonsten die Ausbildung einer schützenden TH1-Antwort begünstigen würden (82, 83). Frühere Darstellungen der Hygienehypothese gehen davon aus, dass Menschen, die in der Kindheit häufig mit bakteriellen Infektionen zu tun hatten, ein eher TH1-polarisiertes Immunsystem entwickeln und daher weniger anfällig für TH2-vermittelte Allergien sind (82). Diese Sicht der Hygienehypothese wurde mittlerweile weiterentwickelt und verändert. Es zeigte sich, dass Menschen, die im Kindesalter häufiger mit parasitären Infektionen (Wurmbefall) zu tun hatten, seltener unter Allergien litten (84). In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass Langzeitinfektionen mit Helminthen, die eine TH2 polarisierte Antwort zeigen, invers mit Allergien korreliert sind. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass es zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch den parasitären Befall kommt und durch die Produktion von IL-10 Toleranz induziert wird (19, 85). Dies beobachtet man auch in Imkern, die in Zeiten erhöhter Allergenexposition eine Toleranzinduktion mit starker IL-10 Sekretion aufweisen (86).

Auch die genetische Veranlagung oder Prädisposition des Individuums spielt eine Rolle bei der Frage nach den Ursachen von Allergien. In Metanalysen wurde ermittelt, dass bislang 79 Gene identifiziert wurden, die mit einem asthmatischem oder atopischem Phänotyp assoziiert sind. Die beschriebenen Gene umfassen Schlüssel-moleküle, die in irgendeiner Form mit der Pathogenese von Hypersensitivitäten befasst sind, wie z.B. Gene, die für TH2-polarisierende Zytokine wie die Interleukine IL-13 und IL-4, sowie deren Rezeptoren (z.B. IL4RA) kodieren oder Kontrollelemente für die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptor (FCER1B) beinhalten (87). Das Risiko für den Nachwuchs an einer Allergie zu erkranken, steigt laut weltweiten Studien mit der Anzahl der betroffenen Elternteile (88, 89). Weitere Faktoren für die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen sind die zunehmende Belastung der Umwelt mit Luftschadstoffen und der daraus resultierenden erhöhten Allergenizität von Pollen (90–92) sowie der gesteigerten Vermehrung von Hausstaubmilben durch eine verbesserte Wärmedämmung von Häusern (93). Die Verbreitung neuer Pflanzen mit hohem allergenen Potential, z.B. *Ambrosia artemisiifolia*, in der bestehenden heimischen Flora ist ein weiterer Risikofaktor (94).

I.7. Die Rolle der Antigenendosis

Für die Auslösung einer TH2-Antwort ist, neben der Beschaffenheit des Antigens und der Qualität des Rezeptorsignals, die Dosierung des Antigens von entscheidender Rolle.

So zeigten bereits frühe Studien, dass die Stimulation von CD4-T-Zellen mit niedrigen Dosen eines Antigens eine TH2-Antwort hervorruft, hohe Dosierungen desselben Antigens jedoch in TH1-Richtung polarisieren (95, 96). In Studien an Imkern konnte gezeigt werden, dass diese zu Beginn der Imkerei-Saison nach einem Bienenstich starke kutane Spät-Phase-Reaktionen zeigten, im Laufe der weiteren Saison jedoch immer weniger auf Bienenstiche reagierten. Die vermehrte Exposition mit dem Allergen aus dem Bienengift, Phospholipase A₂ (PLA₂), führte über den Zeitverlauf der Saison zur Toleranz gegen das Allergen. Dies konnte durch in vitro Testungen bestätigt werden, denn auch die Restimulation von peripheren Blutmonozyten der Imker mit PLA₂ führte in Zeiten erhöhter Allergenexposition (in der Mitte der Saison) zu einer geringen Proliferation der T-Zellen und einer geringeren Sekretion von TH1- und TH2-Zytokinen. Die hohe Exposition mit dem Allergen führte dazu, dass nun vermehrt toleranzassoziiertes IL-10 von sogenannten Typ 1 regulatorischen T-Zellen (Tr1) gebildet wurde (86).

Im Mausmodell der Typ 1 Allergie wurde gezeigt, dass die IgE-Produktion antigenendosisabhängig reguliert ist (97–99). Mäuse die mit hohen Antigenendosen intraperitoneal behandelt wurden, zeigten in vivo eine Inhibition der IgE-Produktion und eine massive IgG₁- Induktion. Außerdem wiesen restimierte Milzzellen aus diesen Tieren eine geringere Reaktivität im T-Zellkompartiment auf, gekennzeichnet durch eine Hypoproliferation von Milzzellen und eine verringerte Sekretion von TH2-Zytokinen. Zudem konnte keine gesteigerte Induktion von IFN- γ nach Applikation von hohen Antigenendosen beobachtet werden. Auch in TH1-defizienten Mausstämmen konnte die antigenendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion beobachtet werden. Nach Applikation von hohen Dosen kommt es demnach nicht zu einer Verschiebung der T-Zell-Polarisation in TH1-Richtung (99). Die antigenspezifische Restimulation von B-Zellen aus hochdosig immunisierten Mäusen zeigte, dass diese in vitro in der Lage waren IgE-Antikörper zu produzieren. Dies führte zu

der Annahme, dass es in vivo einen suppressiven Mechanismus geben musste, der zur Inhibition der IgE-Produktion führte und die B-Zellen in einem IgG₁-produzierenden Stadium arretiert hielt (97). Barwig et al fanden schließlich 2010 in Studien in einem ähnlichen Modell der Typ 1 Allergie, dass nach hochdosiger intraperitonealer Immunisierung mit KLH/Alum CD4⁺CD8⁻ doppelt negative T-Zellen (dnTZ) entstehen, die suppressive Eigenschaften auf die IgE-Produktion ausüben konnten.

1.8. Toleranzinduktion

Die Neigung eines Individuums eine überschießende Immunreaktion gegen ein ansonsten harmloses Umweltantigen, etwa einen Pollen, auszubilden, nennt man Allergie. Die genetische Prädisposition eine IgE-vermittelte Immunantwort auszubilden, wird als Atopie bezeichnet. Atopiker reagieren auf dasselbe Molekül mit einer TH2-polarisierten Immunantwort, dem ein Nicht-Atopiker mit einer Toleranz begegnet. Der Begriff der immunologischen Toleranz umfasst die zentrale Toleranz und die periphere Toleranz. Die Mechanismen der zentrale Toleranz spielen sich im Thymus ab und sorgen mit Hilfe einer positiven Selektion und einer negativen Selektion für die Deletion von nicht funktionalen sowie autoreaktiven T-Zellen. Die T-Zellen binden im Thymus mit dem TZR an MHC-exprimierende Epithelzellen, die Selbstantigene präsentieren. Ist die Bindung zu schwach oder findet keine Erkennung statt, werden die T-Zellen deletiert. Somit überleben nur T-Zellen mit einem funktionstüchtigen TZR die positive Selektion. Im Zuge der negativen Selektion werden dann solche T-Zellen deletiert, die hochaffin an Selbstantigene im Thymus binden. Die zentrale Toleranz stellt durch diese Schritte sicher, dass ausschließlich funktionelle T-Zellen mit moderater Affinität den Thymus verlassen. Die zentrale Toleranz ist also ein wichtiger Mechanismus zur Verhinderung von Autoimmunität (100). Der Begriff der peripheren Toleranz beschreibt die Entfernung (Deletion) und funktionelle Inaktivierung (Anergie) von potentiell autoreaktiven T-Zellen in peripheren Geweben, die der negativen Selektion im Thymus entgangen sind. So können in diesem speziellen Mechanismus der peripheren Toleranz durch die supprimierende Wirkung von regulatorischen T-Zellen

autoreaktive T-Zellen beeinflusst werden. Dies geschieht zum einen durch Zellkontakt oder über die Sekretion von inhibierenden Zytokinen.

Nicht-Allergiker reagieren auf einen allergenen Stimulus mit der Produktion von IgG-Antikörpern und der Induktion von regulatorischen T-Zellen, die über die Sekretion von immunomodulatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL-) 10 eine Sensibilisierung verhindern. Bei Atopikern hingegen ist diese TH1- geprägte Immunantwort verschoben, so dass in vivo vermehrt IgE produziert wird und Zellen mit einem TH2- assoziierten Interleukin-Profil (IL-4, IL-5 und IL-13) in das betroffene Gewebe einwandern (81, 101).

I.9. Regulatorische T-Zellen

Die Entdeckung von regulatorischen T-Zellen und das Verständnis ihrer Wirkungsweise hat das Konzept der Toleranzinduktion stark beeinflusst. Regulatorische T-Zellen sorgen für die Erhaltung der Selbsttoleranz und kontrollieren Effektor-T-Zell-Antworten gegen Fremdantigene. Somit sind sie ein wichtiger Bestandteil des Schutzes vor Autoimmunität und Allergie. Im Rahmen einer Toleranzinduktion wirken regulatorische T-Zellen vor allem durch die Verminderung der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation, sowie supprimierend auf die Zytokinproduktion von TH1- und TH2-Zellen (102). In der Literatur wird sowohl die Wirkung natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen über Zell-Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen, als auch die Induktion von IL-10 sekretierenden Typ 1 regulatorische T-Zellen (103,104) beschrieben. Man nimmt an, dass im allergischen Patienten solche Toleranzmechanismen, die durch regulatorische T-Zellen vermittelt werden nicht hinlänglich funktionieren.

I.9.1. Natürliche regulatorische CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (nTreg)

1995 berichtete die Gruppe um Shimon Sakaguchi, dass eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimieren, einzigartige immunmodulatorische Funktionen in vivo und in vitro aufwiesen (105). CD4⁺CD25⁺ nTreg machen etwa 1 bis 10% der CD4⁺ T-Zellen im Blut und den peripheren lymphoiden Geweben aus. Sie verfügen über ein polyklonales T-Zell-

Rezeptor-Repertoire und sind in der Lage verschiedenste Selbst- und Fremdartigene zu erkennen (106, 107). Im Tiermodell führt die Entfernung von nTreg aus der Peripherie, z.B. durch gentechnische Manipulation der Tiere oder Depletion, zu einem stark autoimmunen Phänotyp und erhöht die Immunität von Tumoren, Allergenen und Pathogenen (108, 109).

CD25 wird von nTregs konstitutiv exprimiert. Die essentielle Bedeutung von CD25 für die Funktion der nTreg wird deutlich in Experimenten, in denen dieses Molekül deletiert wurde, was dann zu einer Expansion der lymphoiden Organe und diversen Autoimmunitäten führte (110–112). IL-2 erhält als essentieller Wachstumsfaktor die Funktion von humanen nTregs in vitro. Es steigert die Expression von FOXP3, CD25, CTLA-4 und GITR. Außerdem reduziert IL-2 die spontane Apoptose von nTregs in vitro (113, 114).

Als essenzielles Kontrollgen für die Entwicklung von nTreg in der Maus konnte das Gen *Foxp3* (forkhead/winged helix transcription factor 3) identifiziert werden, das für den Transkriptionsfaktor Foxp3 kodiert. Durch Überexpression von Foxp3 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen konvertieren diese in vitro zu Tregs, die auch funktionell aktiv sind. Eine Mutation im Foxp3-Gen, die einen nicht funktionellen Transkriptionsfaktor generiert, führt bei Mäusen ähnlich wie die direkte Depletion von nTreg zu einer Multiorganinflammation und schweren Autoimmunpathologien (Scurfy-Phänotyp). Ein Transfer von nTreg in neugeborene Foxp3-defiziente Mäuse kann den Krankheitsverlauf in Rezipienten abmildern (106, 115). Das humane Analog zum murinen Foxp3 ist FOXP3. Auch im Menschen führt der Verlust von funktionellem FOXP3 zu einem scurfy-ähnlichen Phänotyp. Das als IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked inheritance) bekannte Krankheitsbild zeichnet sich durch Multiorgan-inflammationen, autoimmuner Typ 1 Diabetes, schweren intestinalen Manifestationen und allergischer Dermatitis aus (116).

Ein weiteres vielbeachtetes Molekül auf der Oberfläche von nTregs ist GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene/protein, CD357). Shimizu et al. haben 2002 gezeigt, dass nach Injektion von komplement-aktivierenden Antikörpern gegen GITR in neonatale Mäuse ein ähnliches Krankheitsbild zu beobachten ist, wie nach der Depletion der nTreg (117). Die Stimulation von GITR auf nTregs führte in

weiteren Studien zur Expansion von nTregs und zur Sekretion des immunmodulatorischen Zytokins IL-10 durch die nTregs (39). CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CD152) ist ein weiteres Molekül, welches konstitutiv von nTregs exprimiert wird. Konventionelle T-Zellen hingegen exprimieren CTLA-4 erst nach der Stimulation durch den T-Zell-Rezeptor (TZR). Aufgrund der höheren Affinität von CTLA-4 zu seinen Liganden auf Seiten der antigenpräsentierenden Zelle, den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, ist es möglich die aktivierende Interaktion dieser Moleküle mit CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen zu verhindern. Gleichzeitig sendet CTLA-4 über seine inhibitorischen Elemente ein suppressives Signal in die T-Zelle. Bereits kleine Mengen des hochaffinen CTLA-4 reichen aus, um die Kostimulation über CD28 und CD80/86 zu blockieren (118, 119). Die durch die Gabe monoklonaler Antikörper induzierte temporäre Depletion von CTLA-4 führt im Tiermodell zu gastrointestinalen Autoimmun-Manifestationen, wohingegen die generelle Defizienz für CTLA-4 in Mäusen bereits nach wenigen Wochen lethal ist (120).

I.9.2. Induzierte regulatorische T-Zellen

Neben den bereits beschriebenen natürlich vorkommenden Tregs (nTreg) aus dem Thymus wird auch die Existenz von Tregs diskutiert, die durch Mechanismen der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz erst induziert werden. Induzierte Treg wirken nicht über Zell-Kontakt abhängige Mechanismen, sondern über die Produktion von IL-10 als regulatorische Typ 1 T-Zellen (Tr1) oder über TGF- β (TH3-Zellen).

Tr1-Zellen sind CD4⁺ T-Zellen welche durch die Anwesenheit von IL-10 aus TH0-Vorläuferzellen generiert werden können (121, 122). Des Weiteren ist eine Generierung von Tr1 Zellen durch die Anwesenheit von humanen IL-10-behandelten tolerogenisierten DZ möglich (123). TH3-Zellen können in vitro durch die Kultivierung in Anwesenheit von TGF- β aus TH0-Vorläuferzellen generiert werden (124). Sie sekretieren, dann ebenfalls TGF- β , jedoch kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IFN- γ (125), was sie zu einer einzigartigen T-Zellpopulation macht. TH3-Zellen üben eine wichtige Rolle in der oralen Toleranz aus, indem sie die Produktion von IgA-Antikörpern fördern (126) und sorgen außerdem für die Aufrechterhaltung der

peripheren Toleranz in einem EAE-Modell, indem die Differenzierung von antigenspezifischen Foxp3⁺ Tregs angetrieben wird (32).

I.9.3. CD4-CD8- doppelt negative T-Zellen

Die meisten konventionellen T-Zellen in der Peripherie exprimieren entweder CD4 oder CD8. Doppelt-negativen T-Zellen (dnTZ) fehlt die Expression sowohl von CD4 als auch von CD8. Diese Zellen machen etwa 1 bis 5% der peripheren T-Zell-Gesamtpopulation aus und wurden erstmals von Strober et al (1989) als distinkte T-Zellpopulation im peripheren Blut gesunder Menschen beschrieben. Die dnTZ hoben sich vor allem durch die Expression des α/β -TZR-Heterodimers von den bis dato bekannten T-Zellen ohne CD4 und CD8 Expression ab. Die von Strober beschriebenen Zellen exprimieren CD5, sie verfügen über einen reifen Differenzierungsstatus und lassen sich anders als herkömmliche mature T-Zellen durch die Stimulation mit IL-3 zur Proliferation anregen. Die beschriebenen dnTZ exprimierten außerdem kein CD28 auf ihrer Oberfläche und die Stimulation über den TZR konnte eine lytische Aktivität dieser Zellen auslösen. Für NK-Zellen spezifische Moleküle wie CD16 wurden auf der Oberfläche der dnTZ nicht detektiert (127, 128). Etwa zehn Jahre später beschrieb die Gruppe um Zhang in murinen Transplantationsmodellen dnTZ mit regulatorischer Aktivität, die durch die Expression von CD25, CD28, CD30, CD44, NK1.1 und den α/β -TZR charakterisiert wurden (129, 130). Diese dnTZ hatten die Fähigkeit T-Zellen mit derselben TZR-Spezifität zu inhibieren und in einem allogenen Hauttransplantationsmodell eine Transplantatabstoßung zu verhindern. Die dnTZ wirkten somit als antigenspezifische Suppressorzellen. Des Weiteren sind dnTZ in der Lage durch Interaktion ihres antigenspezifischen TZR mit dem MHC-Peptid-Komplex auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) Alloantigene von diesen zu übernehmen (Trogozytose) und aktivierten syngenen CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren (131) sowie über anschließende Signale den Zelltod von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einzuleiten (132). In anderen Studien wurde gezeigt, dass die suppressive Funktion der dnTZ auf autoreaktive T-Zellen über einen Fas/FasL-abhängigen zytolytischen Mechanismus abläuft (133, 134). Weiterhin wurde gezeigt, dass die exogene Zugabe von IL-10 in

in vitro die suppressiven Eigenschaften der dnTZ aufhebt. DnTZ exprimieren in hohem Maße Ly-6A (Sca-1). Ly-6A defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine erhöhte allogene Transplantatabstoßung auf (135–137). Bei Untersuchungen an Lewis-Ratten in einem Xenotransplantationsmodell verlängerte eine Kombinationstherapie, bestehend aus der frühzeitigen Gabe eines immunsuppressiven Medikaments und der Aktivierung der dnTZ, die Akzeptanz eines Herztransplantats signifikant (138). Außerdem wurde in dieser Studie festgestellt, dass die Abtötung von syngenen CD8⁺ T-Zellen abhängig vom Zellkontakt ist und durch Perforin und Granzym B, jedoch nicht über die Fas/FasL-Interaktion vermittelt wird (138, 139). Neben den Untersuchungen von dnTZ in Transplantationsmodellen gibt es auch Studien, die belegen, dass dnTZ die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie der Typ1 Diabetes beeinflussen können (140).

Der Ursprung von dnTZ ist wenig untersucht. Als ein möglicher Differenzierungsweg wird die Entstehung aus CD8⁺ T-Zellen postuliert. Jedoch zeigte sich, dass dnTZ auch in CD8 defizienten Tieren existieren und zudem nicht durch Stimulation mit dem TZR-spezifischen Antigen aus CD8⁺ T-Zellen in dnTZ konvertiert werden können. Zudem findet man dnTZ auch in der Milz und den Lymphknoten von thymektomierten Mäusen, die mit T-Zell-depletiertem Knochenmark rekonstituiert wurden. DnTZ die sich in thymektomierten Mäusen entwickelten zeigen interessanter Weise sogar eine effizientere Suppression von syngenen CD8⁺ T-Zellen als solche die sich in Kontrolltieren entwickelt hatten (141).

Hinsichtlich einer Rolle der dnTZ bei der Regulation von allergenspezifischen Immunantworten wurde in der Klinischen Forschergruppe Allergie erstmals demonstriert, dass nach Immunisierung von Mäusen mit hohen Antigendosen dnTZ mit suppressiver Kapazität entstehen. Die regulatorischen dnTZ inhibierten nach adoptivem Transfer antigenspezifisch die Produktion von IgE-Antikörpern in den Rezipienten (99).

Die Untersuchungen zu humanen dnTZ sind noch recht unterrepräsentiert vergleicht man sie mit den Daten zu Funktion und Phänotyp von dnTZ in der Maus. Bereits 1991 wurde jedoch gezeigt, dass humane dnTZ nicht anerg sind, sondern auch ohne die Expression von CD4 und CD8 in der Lage sind über ihren TZR und über IL-3

stimuliert zu werden (127, 128, 142, 143). Erstmals wurde nach allogener Transplantation eine dnTZ-Population mit suppressiver Kapazität im Menschen beschrieben. Diese dnTZ sind ähnlich den murinen Zellen in der Lage Peptid-HLA-A2 Komplexe von APZ durch Zell-Zell-Kontakt zu übernehmen und antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren (144).

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	Mettler HS4	Mettler, Gießen
Autoklav	V- 150	Systec GmbH, Wetterberg
Brutschrank	CB 150, CB 210	Binder, Tutlingen
Digitalwaage	Basic	Sartorius, München
Dispensette	Polytron PT 2100	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Durchflusszytometer	FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Exsikkator mit Einsatz	Duran, Ø 120 mm	DuranGroup, Wertheim
Gewebedissoziator	Gentle MACS-	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Hämazytometer	Neubauer Improved Bright Line, 0,1 mm	AO Spencer, Buffalo, USA
Infrarotlampe	IR 11	Roth, Karlsruhe
Kamera	ColorView II Mikroskopkamera	Olympus, Hamburg
Labor-Taschenthermometer	Labtherm	Roth, Karlsruhe
MACS Separator	QuadroMACS OctoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Kelheim
Mehrkanalpipette	m300: 12 Kanal 30 – 300 µl	Biohit, Rosbach
Mehrkanalpipette	8 Kanal 30-300 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskope	CK2 CH2	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Ultrawash plus	Dynex, Chantilly, USA
pH-Meter	PH 538 MultiCal®	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten (WTW) GmbH, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Pipetten: 1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 200 – 1000 µl Finnpipette: 40 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg Finnpipette, Helsinki, Finnland

Pipettierhilfe	pipetus®A-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Pipetboy	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Plethysmograph	Modell PLY 3211 (whole body)	Buxco Research Systems, Wilmington, USA
Präparierbesteck	–	Hammacher, Solingen
Präzisions Mikroplatten Leser	Emax precision micro plate reader	MWG Biotech, Ebersberg
Schüttelinkubator	RBI-112 Benchtop Incubator Shaker „Aerotron“	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spektralphotometer	Ultrospec 1100 pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Sterilwerkbank	HeraeusLamin Air®HB 2448	Heraeus, Hanau
Szintilationszähler	1205 Betaplate	LKB Wallac, Freiburg
Thermocycler	DNA Thermocycler 480	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
Thermocycler	7900 HT Fast Real- Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler	MJ Research PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, Massachusetts, USA
Ultraschallbad	Transsonic T570	Elma, Singen
Vortexer	Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Laboratory Counter	Becton Dickinson
Zellerntegerät	1295-001 Cell Harvester	LKB Wallac, Freiburg
Zentrifugen	Biofuge primo (für 1,5 und 2,5 ml Reaktionsgefäße)	Heraeus, Hanau
	Multifuge 1 L-R (300xg= 1.200 UpM)	
	Cytospin 3	Shandon, Frankfurt

II.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller
Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten	Absolute QPCR Seal	Abgene, England
Abdeckfolie für ELISA-Platten		Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Braunüle	1,3 x 45 mm Vasofix® (Plastikkatheter für BAL)	B/Braun, Melsungen
Einmal-Feindosierspritze, zweiteilig	Injekt-F 1ml 0,01 ml/ 1,0 ml (für BAL)	B/Braun, Melsungen
	Omnifix®- F 1ml 0,01ml/ 1,0 ml (für i.p. Injektionen)	
Einmalkanülen	0,4 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektionen)	B/Braun, Melsungen
	0,5 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektionen)	
Einmalspritzen	10 ml, Discardit™II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Deckgläser	18 x18 mm	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Dispensiergerät-Aufsatz	PD-Tips 2,5 ml	Brand, Wertheim/Main
ELISA-Platten	96-Loch-Flachbodenplatten; hohe Bindungskapazität	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Eppendorfreaktionsgefäße („Safe- Lock“, SL)	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfreaktionsgefäße (Protein LoBind, SL)	0,5 ml, 1,5 ml	
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Röhrchen; # 352008	Becton Dickinson, USA
FACS-Röhrchen Polystyrol-Reagenzgläser	0,6 ml # 101101	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Lymphozyten Separationsmedium	LSM 1077	PAA, Pasching, Österreich
Glasfaserfilter	Priwet Filtermat A	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Glaspipetten	Precicolor 5 ml und 10 ml und 25 ml	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
	Techcolor 5, 10 und 25 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Silberbrand Eterna 5, 10 und 25 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Gewebedissoziationsröhrchen	C-Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Handschuhe, Latex	Sempercare®	Sempermed, Österreich
Handschuhe, latexfrei		
Küvetten	Einmal-Küvetten, 1,5 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Kulturplatten	24- Loch-Gewebekultur- Platte (Flachboden)	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
	48- Loch-Gewebekultur-Platte (Flachboden)	
	Cellstar- 96- Loch-Gewebekultur-Platte (Flachboden)	
	96- Gewebekultur-Platte (Spitzboden)	
	Cellstar- 96Loch-Gewebekultur- Platte (Rundboden)	
Kulturflaschen	25 cm ² Gewebekultur 75 cm ² Gewebekultur 175 cm ² Gewebekultur	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
FACS-Platten	V96-MicroWell Plate (Spitzboden, unbeh.)	Nunc, Roskilde, DK
Laboralufolie	-	Roth, Karlsruhe
MACS Säulen mit Stempel	MS-Säule LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Objektträger	76 x 26 cm Mattrand	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Parafilm	Parafilm N	Nationalcam™, Chicago, USA
Pasteurpipetten	150 mm	VWR GmbH, Darmstadt
PCR- Platten	Thermo- Fast® 96, 0,2 ml	ABgene, Hamburg
Pipettenspitzen	gelbe Spitzen: bis 200 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht
	Blaue Spitzen: 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, klar	StarTipOne bis 200 µl bis 1000 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg
Beschichtete Spitzen	StarTipOne bis 200 µl	
Kristallspitzen	(qPCR) bis 10 µl	
Plastikpetrischalen	60 mm (no 628161)	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
	94 mm (no 633161)	
Plastikpipetten	Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen

Polypropylenröhrchen	15 ml, 50 ml, konisch	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen	12 ml, Polypropylen	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellsieb	Cell Strainer: Ø 40 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

II.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/ Vertrieb
2,2,2 Tribromethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2- Methyl- 2 butanol (tert. Amylalkohol)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
³ H-Thymidin (³ HTdR)	Perkin Elmer, Wellesley, USA
A 23187 (Calciumionophor)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetyl-β-Methylcholine-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin, Hühnerei (Ovalbumin)	Calbiochem, La Jolla, USA
Alkopharm 70 (70%iger Alkohol)	Brüggemann, Heilbronn
Aluminiumhydroxid, Imject® Alum	Perbio, Wien, Österreich
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, Na-Salz (C ₁₉ H ₃₇ BrNa)	Roth, Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin)	PAA, Pasching, Östereich
Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diff-Quick-Färbeset	Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, Schweiz
DPBS	Gibco, Carlsbad, UK
Entellan ® neu	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%ig, (C ₂ H ₅ OH; vergällt)	Martin und Werner Mundo OHG, Mainz- Kostheim
Ethyl diamintetraessigsäure, Na.-Salz x 2 H ₂ O (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FCS (Fetal calf serum)	PAN Systems GmbH, Nürnberg
Forene® Wirkstoff: Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Glycin	Roth, Karlsruhe

GolgiPlug (enthält Brefeldin A)	Becton Dickinson, Heidelberg
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Gibco, Carlsbad, UK
HEPES (Pufferan®)	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol) C ₃ H ₈ O	Hedinger, Stuttgart
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (CHKO.)	Riedel-de Haën, Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Narcoren® Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium	MeriAL GmbH, Halbergmoos
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ H ₂)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD), (C ₆ H ₈ N ₂ x 2 HCl)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-Glucosamid (pNAG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti®-Quant	BioRad, München
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl), 37 %ig	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 95 Vol.%ig	Roth, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Tri-Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol, C ₃₄ H ₆₂ O ₁₁)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tween®-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Wasser, pyrogenfrei, steril	Aqua B. Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %ig	Merck KGaA, Darmstadt

II.1.4. Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Zum Herstellen der Puffer und Lösungen wurde entionisiertes Wasser, wenn nicht anders angegeben aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (ELGA, Bucks, Großbritannien) benutzt. Die Lagerung der Kulturmedien, Puffer und Lösungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C.

II.1.4.1. Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Ethanol (70 %)	hergestellt aus 96 % Ethanol und LPS- freiem entionisiertem Wasser
Gey'scher Lysepuffer	0,25 g KHCO ₃ , 2,07 g Ammoniumchlorid, 0,0093 g EDTA wurden in 250 ml entionisiertem Wasser gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und 0,2 µm sterilfiltriert.
HBSS (Hank's balanced salt solution)	zum Rekonstituieren der Kollagenase Typ 2 auf 50 mg/ml
HEPES-Puffer	2,38 g HEPES, 8,77 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,2 g MgCl ₂ ·6 H ₂ O, 0,26 g CaCl ₂ ·2 H ₂ O wurden in 1 Liter entionisiertem H ₂ O gelöst, mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und 0,2 µm sterilfiltriert.
1 x PBS (Phosphate buffered saline)	40,2 g NaCl und 7,8 g NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O wurden in 5 l entionisiertem H ₂ O gelöst, der pH- Wert mit 10 M NaOH auf 7,2 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.
10 x PBS	402 g NaCl und 78 g NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O wurden in 5 l entionisiertem H ₂ O gelöst, der pH- Wert mit 10 M NaOH auf 6,6 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.
MACS-Puffer	FCS wurde filtriert (0,45 µm) und anschließend 2 %ig (v/v) in 1x PBS inkl. 2 mM EDTA verdünnt.
Narcoren®- Gebrauchslösung	Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit 1x PBS (pH 7,2)
Spüllösung für BAL	1x PBS versetzt mit 10 % (v/v) FCS (Gibco invitrogen, Carlsbad, USA)
Trypanblau-Stammlösung	0,1 % (w/v) Trypanblau und 0,01 % (w/v) NaN ₃ in H ₂ O _d

Trypanblau-Gebrauchslösung	Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 9:1 mit 10 x PBS
TYRODES-Puffer	130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ (x 6 H ₂ O), 1,4 mM CaCl ₂ (x 6 H ₂ O), 5,6 mM Glucose, 10 mM HEPES und 0,1% BSA gelöst in deionisiertem Wasser. Dieser Puffer ist nur ca. eine Woche haltbar und wurde deshalb am Versuchstag frisch angesetzt.
Waschmedium für Zellkultur	EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Lonza; Basel, Schweiz), versetzt mit 2% (v/v) FCS (Gibco invitrogen, Carlsbad, USA), 1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

II.1.4.2. Lösungen und Puffer für ELISA und FACS-Analysen

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Blockierungslösung (ELISA)	1 x PBS, versetzt mit 1% BSA, zum Absättigen freier unspezifischer Bindungsstellen im ELISA und als Verdünnungspuffer für Zytokine, Detektionsantikörper und Enzyme.
Blockierungslösung (für IL-17A ELISA)	1 x PBS, versetzt mit 1% BSA und 5 % Saccharose
FACS-Fixierungslösung (0,7% PFA)	0,7 g PFA wurden bei 56°C in 10 ml 1xPBS (pH 7,2) gelöst.
FACS-Medium	FCS wurde filtriert (0,4 µm) und anschließend 2 %ig (v/v) in 1x PBS verdünnt.
Fix/Perm-Lösung	1 Teil Fixations/Permeabilisierungs-Konzentrat und 3 Teile Fixations/Permeabilisierungs-Verdünnung des fertigen Kits (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience, SanDiego, USA) wurden gemischt.
OPD-Substratpuffer	15,6 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O und 14,7 g tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O wurden in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt.
1 x Permeabilisierungspuffer	1 Teil des 10x Permeabilisierungsreagenz (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience, SanDiego, USA) und 9 Teile H ₂ O wurden gemischt.
Screening-Puffer	1x PBS versetzt mit 30 mM EDTA und 0,01% NaN ₃

Stopplösung	1M H ₂ SO ₄ . Es wurden 53 ml konzentrierte H ₂ SO ₄ mit 1 L entionisiertem Wasser aufgefüllt. Mit dieser Lösung wurde die Substratumsetzung im ELISA abgestoppt.
Waschpuffer für Mikrotiterplatten	1 Teil 10 x PBS (pH 6,6) wird mit 9 Teilen entionisiertem Wasser zu 1 x PBS verdünnt. Der pH-Wert erhöhte sich auf 7,2. Es wurde 0,1% (v/v) Tween 20 als Detergenz zugegeben.

II.1.5. Kulturmedien und Medienzusätze

Die Kultivierung von steril aus den Versuchstieren entnommenen Zellen erfolgte ex vivo in Puffern, Kultur- und Waschmedien, denen fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt war. Dieses dient als Nährstoffquelle und ist entscheidend für das Wachstum der Zellen.

Das FCS wurde mycoplasmenfrei und steril bezogen und nach Aliquotierung bei -20°C langzeitgelagert und zur kurzzeitigen Verwendung bei 4° aufbewahrt.

II.1.5.1. Medien und Supplemente für Zellkulturarbeiten

Medium/ Supplement	Zusammensetzung/ Vertrieb
EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	Es wurde von Lonza (Basel, Schweiz) bezogen und als Waschmedium für die Kultivierung von Lungen-, Milz- und Lymphknotenzellen eingesetzt.
FCS (fetal calf serum)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamin (200 mM)	Als Supplement in Kulturmedien wurde 5,84g/L (+)-Glutamin (Roth, Karlsruhe) in 200 ml 1x PBS gelöst und 0,2 µm sterilfiltriert.
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Es wurde von Gibco (Carlsbad, USA) bezogen und mit weiteren Zusätzen zur Kultivierung von Lungen-, Milz- und Lymphknotenzellen verwendet.
Ionomycin	1 mg wurden in 134 µl DMSO gelöst (10 mM)
β-Mercaptoethanol (5 mM)	40 µl 2-β-Mercaptoethanol wurden in 114 ml IMDM verdünnt und 0,2µm sterilfiltriert, 1% ig = 50 µM

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Mischung aus 10^4 U/ml Penicillin und 10^4 μ g/ml Streptomycin. 1%ig als Supplement zum Schutz vor Verkeimung von Kultur- und Waschmedien zugesetzt.
Natriumpyruvat	100 mM in IMDM
Kulturmedium/ Testmedium für Lungen-, Milz- und Lymphknotenzellen	IMDM supplementiert mit 5% (v/v) FCS (Gibco invitrogen, Carlsbad, USA) 1% (v/v) Pen/ Strep 2 mM L- Glutamin 50 μ M 2- β -Mercaptoethanol
Waschmedium für Lungen-, Milz- und Lymphknotenzellen	EMEM supplementiert mit 2% (v/v) FCS (Gibco invitrogen, Carlsbad, USA) 1% (v/v) Pen/ Strep
RBL-2H3 Kulturmedium/ Testmedium	IMDM supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Gibco invitrogen, Carlsbad, USA) 1% (v/v) Pen/ Strep 2 mM L- Glutamin 50 μ M 2- β -Mercaptoethanol 1 mM Natriumpyruvat

II.1.6. Sonstige Zusätze

Medium/ Supplement	Zusammensetzung/ Vertrieb
A 23187	Der Ionophor wurde 10 mM in DMSO angesetzt.
Ionomycin	1 mg wurden in 134 μ l DMSO gelöst (10 mM)
PMA	5 mg PMA wurden mit 1 ml H ₂ O _a rekonstituiert.

II.1.7. Antikörper

II.1.7.1. Antikörper für die FACS-Analyse (Oberfläche)

Antigen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Anti-Maus TCR β -Kette	Arm. Hamster IgG	H57-597	APC	1: 600	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus $\gamma\delta$ -TCR	Arm. Hamster IgG	GL-3	APC	1: 200	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus $\gamma\delta$ -TCR	Arm. Hamster IgG2a	GL-3	Biotin	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus DO11.10-TCR	Maus IgG2a	KJ1-26	APC	1:200	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus CD3	Arm. Hamster IgG	145-2C11	FITC	1 : 1000	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus CD3	Arm. Hamster IgG2a	145-2C11	Cy5-PE	1: 600	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus CD4	Ratte IgG2b	GK1.5	PE	1 : 400	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD4	Ratte IgG2b	GK1.5	FITC	1: 200	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD4	Ratte IgG2a	RM4-5	Cy5- PE	1 : 400	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD4	RatteIgG2a	RM4-5	Cy7-PE	1: 1600	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD8	Ratte IgG2a	53-6.7	FITC	1: 200	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD8	Ratte IgG2a	53-6.7	PE	1: 200	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus-CD8	RatteIgG2a	53-6.7	PerCP	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD25	Ratte IgM	7D4	FITC	1 : 50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD28	Syr. Hamster IgG	37.51	Biotin	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus CD30	Arm. Hamster IgG	mCD30.1	PE	1:1200	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Human/ Maus CD44	Ratte IgG2b	IM7	Biotin	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus CD45R (B220)	Ratte IgG2a	RA3-6B2	FITC	1:100	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD45R (B220)	Ratte IgG2a	RA3-6B2	PE	1:100	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD62L	Ratte IgG2a	MEL-14	FITC	1:100	Caltag Laboratories, Hamburg
Anti-Maus CD69	Hamster IgG	H1.2F3	FITC	1:100	Caltag Laboratories, Hamburg

Anti-Maus CD90.2	Ratte IgG2a	53-2.1	APC	1: 1500	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD90.2	Ratte IgG2a	53-2.1	Cy7-PE	1: 2000	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD152 (CTLA-4)	Ratte IgG2a	63828	FITC	1: 2	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Anti-Maus CD178 (FasL)	Arm. Hamster IgG	MFL3	PE	1: 100	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus GITR	Ratte IgG2b	DTA-1	FITC	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus NKp46 (CD335)	Ratte IgG2a	29A1.4	FITC	1:100	eBioscience, San Diego, USA

II.1.7.2. Antikörper für die FACS-Analyse (intrazellulär)

Antigen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Anti-Maus IFN- γ	Ratte IgG1	XMG1.2	FITC	1:500	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-4	Ratte IgG1	11B11	PE	1:40	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Human/ Maus IL-5	Ratte IgG1	TRFK5	PE	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10	Ratte IgG2b	JES-516E3	APC	1:80	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus IL-17A	Ratte IgG1	TC11-18H10	PE	1:200	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus/ Human FoxP3	Maus IgG1	3G3	PE	1 : 10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Maus Granzym B	Ratte IgG2a	NGZB	FITC	1:400	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus Perforin	Ratte IgG2a	OMAK-D	FITC	1:400	eBioscience, San Diego, USA

II.1.7.3. Isotypkontrollantikörper für die FACS- Analyse

Antikörper	Klon	Markierung	Kat.-Nummer	Firma
Maus IgG1	P3	PE	# 12-4714-73	eBioscience, San Diego, USA
Maus IgG2b	PLRV219	APC	# 21275536	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Maus IgG2a	eBM2a	Cy7-PE	# 25-4724-81	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG1	R3-34	PE	# 554685	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG1	R3-34	FITC	# R101	Caltag Laboratories, Hamburg
Ratte IgG2a	eBR2a	PE	# 12-4321-83	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG2a	R35-95	FITC	# 553929	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a	R35-95	Cy5-PE	# 553931	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG2a	R35-95	Cy7-PE	# 557855	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a	eBR2a	APC	# 17-4321-81	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG2a	R35-95	PerCP	# 553933	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b	eB149/10H5	PE	# 12-4031-81	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG2b	RG7/11.1	FITC	# 10104D	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b	eB149/10H5	Biotin	# 13-4031-81	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgM	eBRM	FITC	# 11-4341-82	eBioscience, San Diego, USA
Ratte APC	eBRM	APC	# 17-4341-81	eBioscience, San Diego, USA

Ratte- IgG2a	R35-95	Cy5-PE	# 553931	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Arm. Hamster IgG1	A19-3	PE	# 553972	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-IgG1	G235-2356	PE	# 553954	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Arm. Hamster IgG	eB299Arm	FITC	# 11-4888-81	eBioscience, San Diego, USA
Arm. HamsterIgG1	eB299Arm	APC	# 17-4888-81	eBioscience, San Diego, USA
Arm. Hamster IgG1	G235-2356	Biotin	# 553952	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

II.1.7.4. Antikörper für die Absättigung unspez. Bindungsstellen

Antikörper	Klon	eingesetzt	Herkunft
FcγRII/III- Antikörper	2.4.G2	1:100 (2,6 µg/ml)	Laboreigene Produktion (145)

II.1.7.5. Antikörper für den Immunglobulin-ELISA

Antikörper	Isotyp	Art.-Nr./ Klon	Konzentration (eingesetzt)	Hersteller/Vertrieb/ Herkunft
Anti-Maus IgG-Biotin	Ziege IgG	1070-08	1 mg/ml (0,2 µg/ml)	Southern Biotec
Anti-Maus IgG _{2b} - Biotin	Ziege IgG	1080-08	1 mg/ml (0,2 µg/ml)	Southern Biotec
Anti-Maus IgE	Ratte IgG	EM-953	(1:1000)	Laboreigene Produktion, (146)
Anti-Ratte IgG-Biotin	Maus	# 212-065-106	(1:2000)	Jackson/ Dianova

II.1.7.6. Antikörper für den Zytokin-ELISA

II.1.7.6.1. Fängerantikörper

Antikörper	Isotyp	Art.-Nr./ Klon	Konzentration (eingesetzt)	Hersteller/ Vertrieb
anti-Maus IFN- γ	Ratte-IgG ₁	R4-6A2*	(1:1000) in 0,1M NaHCO ₃	Laboreigene Präparation (147)
anti-Maus/ Mensch IL-5	Ratte-IgG ₁	# 554393/ TRFK4*	0,5 mg/ml (2 μ g/ml) in 0,1M NaHCO ₃	Biozol, EBD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus IL-4	Ratte-IgG ₁	# 554434 11B11	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) in 0,1M NaHCO ₃	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus IL-10	Ratte- IgG2b, κ	# 14-7101/ JESS- 16E3*	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) in 1x PBS	NatuTec, Frankfurt
Anti-Maus IL-13	Ratte- IgG2b	# MAB413 38213	0,5 mg/ml (2 μ g/ml) in 1x PBS	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Maus IL-17	Ratte- IgG2a	# MAB421 50104	0,5 mg/ml (5 μ g/ml) in 1x PBS	R&D Systems, Minneapolis, USA

II.1.7.6.2. Detektionsantikörper

Antikörper	Isotyp	Art.Nr./ Klon	Konzentration [eingesetzt] (Inkubation)	Hersteller/ Vertrieb
Anti-Maus IFN- γ -biotinyliert	Ratte IgG1	AN 18.17.24*	[1:5000] (60 min, 37°C)	Laboreigene Präparation, (148)
Interleukin 2	/	Proleukin®	1000 U (1U/ml)	Cetus Corp, Emeryville, USA
Anti-Maus IL-4- biotinyliert	Ratte IgG1	# 554390	0,5 mg/ml [0,5 μ g/ml] (60 min, 37°C)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus IL-5- biotinyliert	Ratte IgG2a	# 554397/ TRFK4*	0,5 mg/ml [1 µg/ml] (60 min, 37°C)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10- biotinyliert	Ratte IgG1, κ	#13-7102 JESS- 2A5*	0,5 mg/ml [0,5 µg/ml] (60 min, RT)	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Maus IL-13- biotinyliert	Ziege IgG	#BAF413	0,5 mg/ml [0,5 µg/ml] (60 min, RT)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Maus IL-17- biotinyliert	Ziege IgG	#BAF421	0,5 mg/ml [0,5 µg/ml] (60 min, RT)	R&D Systems, Minneapolis, USA

II.1.7.7. Antikörper für die Zellaktivierung

Antikörper	Klon	Konzentration (eingesetzt)	Firma/ Herkunft
Anti-Maus CD3	145-2C-11	0,1 mg/ ml (1:20)	Laboreigene Präparation
Anti-Maus CD28		Unbekannte Konzentration (1:25)	Laboreigene Präparation

II.1.7.8. Magnetpartikel mit gekoppeltem Antikörper für die MACS®-Separation

Zur Aufreinigung unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen aus Milzzellpräparationen wurde die MACS-Separation angewendet. Dabei wurden diverse MACS® - MicroBeads von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, verwendet.

Partikel # Art.-Nr.	Antikörper gegen	zur Isolation von
CD8 (Ly-2) mouse MicroBeads (# 130-049-401)	CD8	CD8+ T-Zellen (Depletion)
CD4 (L3T4) mouse MicroBeads (# 130-049-201)	CD4	CD4+ T-Zellen (Depletion)

CD90 (Thy1.2) mouse Microbeads (# 130-049-101)	CD90	CD90+ T-Zellen aus DO11.10-BALB/c- Mäusen (Positivselektion)
Mouse PAN T Cell Isolation Kit (# 130-090-932)	CD11b, CD45R, DX5, Ter-119	T-Zellen (Negativselektion)

II.1.8. Zytokine

Zur Ermittlung der Zytokinkonzentration aus der im ELISA gemessenen optischen Dichte (OD) wurde eine entsprechende Zytokinlösung mit bekannter Konzentration mitgeführt.

Zytokin	Art.Nr./ Klon	Konzentration (Startkonzentration)	Hersteller/ Vertrieb
rekombinantes murines IFN- γ	#19301U	2 $\mu\text{g/ml}$ (5 ng/ml)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
rekombinantes murines IL-5	#14-8051-62	10 $\mu\text{g/ml}$ (2 ng/ml)	NatuTec, Frankfurt
rekombinantes murines IL-10	#14-8101	10 $\mu\text{g/ml}$ (4 bzw. 8 ng/ml)	eBioscience, San Diego, USA
rekombinantes murines IL-13	# 413-ML	5 $\mu\text{g/ml}$ (5 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA
rekombinantes murines IL-17	# 421-ML	10 $\mu\text{g/ml}$ (2 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA

II.1.9. Peptide

Peptid	Hersteller/ Vertrieb
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR)	JPT Peptide Technologies, Berlin

II.1.10. Antigene

Antigen	Hersteller/ Vertrieb
Keyhole Limpet Hemocyanin (# H7017)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ovalbumin (# D00107280)	Calbiochem-Novachem, Löffelfingen

II.1.11. Enzyme

Enzym	Hersteller/ Vertrieb
Kollagenase Typ 2 (50 mg/ml)	Worthington, St. Katharinen
DNase I (10 mg/ml)	Roche, Mannheim
Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Trypsin	Roche, Mannheim

II.1.12. Zelllinie (RBL-2H3)

Zum funktionellen Nachweis von IgE-Antikörpern wurde die adhärenzte Zelllinie RBL (Rat Basophilic Leucemia)- 2H3 verwendet. Diese Zellen verfügen wie Mastzellen über einen FcεRI-Rezeptor und sind somit in der Lage IgE-Antikörper im Serum zu binden und auf die Vernetzung mit relevantem Antigen hin, zu degranulieren.

Die Zellen wurden in 10 ml RBL-Kulturmedium in 25 cm² Kulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Im Abstand von etwa 3 Tagen wurden die Zellen in der Erhaltungskultur versorgt. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit 10 ml PBS gespült und 2 ml PBS mit 0,05% Trypsin und 2 mM EDTA zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Min bei 37°C und 10% CO₂ wurden die adhärenzten Zellen vom Boden abgeklopft und anschließend unter Verwendung von 10 ml Waschmedium in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung des überschüssigen Trypsins im Medium wurden die Zellen noch zweimal mit 10 ml Waschmedium gewaschen. Das Zellsediment wurde in 2,5 ml RBL-Kulturmedium aufgenommen und 3 Tropfen dieser Verdünnung in eine, mit 10 ml frischem RBL-Kulturmedium gefüllte, 25 cm² Kulturflasche gegeben. Für die Haltung von Zellen, die im RBL-Test zum Einsatz kommen sollten, wurden 3-4 Tage vor dem Tag der Testung Kulturen in 75 cm² Kulturflaschen angelegt (4 Tropfen auf 30 ml RBL-Kulturmedium), um eine optimale Zelldichte zu erhalten.

II.1.13. Versuchstiere

Für die vorliegenden Experimente wurden Tiere des Inzuchtstammes BALB/c und C57BL/6 verwendet. Es wurden stets weibliche Mäuse verwendet, die zu Versuchbeginn sechs bis acht Wochen alt waren. Zusätzlich zu den Wildtyp-Stämmen wurden Tiere verwendet, die eine Defizienz im TLR-4 Signalweg aufwiesen. Es handelte sich hierbei um CH3/HeJ(BALB/c) sowie C57BL/6-TLR4-Mäuse (die initialen Zuchtpaare wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Immunologie Mainz). Eine spontane Mutation tauchte zwischen 1960 und 1968 im Toll-Like-Rezeptor 4-Genlocus (*Tlr4lps*) der C3H auf (149). Dies macht den sogenannten C3H-HeJ(*Tlr4Lps-d*)-Stamm insensitiv für die Erkennung von LPS. Bei den in dieser Arbeit verwendeten C3H-HeJ Weibchen wurden zusätzlich BALB/c Männchen eingekreuzt und schließlich die für den TLR-4-Defekt homozygote Folgegeneration C3H-HeJ(BALB/c) generiert. C57BL/6-TLR-4 wurden erstmals von Hoshino et al. im Jahr 1999 beschrieben (150). Bei diesen Tiere wurden diejenigen Sequenzen des TLR-4 Gens, die für transmembran- und zytoplasmatische Domänen (Aminosäure 86-835) kodieren, durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt. Das Fehlen eines funktionellen TLR-4 Gens (*Tlr4^{lps-d}*) macht die Mäuse dieses Stammes hyporesponsiv für LPS-Stimulation.

Für die Suppressionsanalysen wurden zudem T-Zellen aus T-Zellrezeptor-transgenen DO11.10-Mäusen gewonnen, die einen genetischen BALB/c-Hintergrund besitzen und das OVA-Peptid³²³⁻³³⁹ im Zusammenhang mit MHCII spezifisch erkennen (das initiale Zuchtpaar wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Immunologie Mainz). Die Mäuse des Stammes Tg(DO11.10)10Loh/J wurden homozygot verpaart. Es wurden ausschließlich Tiere verwendet, bei denen die Expression des transgenen TZR (Klon: KJ-126⁺) von CD4⁺ T-Zellen in der FACS-Analyse über 97% lag (151).

Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz gezüchtet. Alle Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gehalten und nach spezifischen Hygienemaßnahmen von Pathogenen ferngehalten. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach den Richtlinien der Tierversuchsordnung und des Deutschen Tierschutzgesetzes.

II.2. Methoden

II.2.1. Tierversuche und Immunisierungsmethoden

II.2.1.1. Proteinimmunisierungen

II.2.1.1.1. Ansetzen der Proteinlösungen

Das kommerziell erworbene KLH (Keyhole limpet hemocyanine) wurde mit 2 ml entionisiertem Wasser rekonstituiert und in einer Konzentration von 10 mg/ml in 250 µl Aliquoten bei -20°C gelagert.

Für die Immunisierung wurde Ovalbumin in DPBS (Gibco) gelöst, 0,2 µm sterilfiltriert, die Proteinkonzentration mittels photometrischem Bradford 595 Test bestimmt und auf die Konzentration 5 mg/ml eingestellt. Die Gebrauchslösungen wurden aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C verwahrt.

II.2.1.1.2. Subkutane (s.c.) Sensibilisierung

Für die subkutane Injektion von unterschiedlichen Dosen Ovalbumin (0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg und 1000 µg/ Injektion) bzw. Keyhole limpet hemocyanine (KLH, 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg und 1000 µg/ Injektion) wurden 200 µl Lösung in das Nackenfell der Versuchstiere injiziert. Für die verschiedenen Konzentrationen des Ovalbumins bzw. KLH (0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml und 5000µg/ml) wurden Gebrauchslösungen angesetzt, die jeweils am Tag der Sensibilisierung aus der Stammlösung (5 mg/ml) in DPBS verdünnt wurden. Für die höchste Dosis von 1000 µg pro 200 µl Injektion wurde die Stammlösung unverdünnt injiziert.

II.2.1.1.3. Intraperitoneale (i.p.) Sensibilisierung

Für die intraperitoneale Injektion von 10 µg OVA adsorbiert an Aluminiumhydroxid wurden 100 µl einer 100 µg/ml Stocklösung im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt® Alum, Perbio, Wien) gemischt. Diese Suspension wurde in einem Volumen von 200 µl in das Peritoneum der Versuchstiere injiziert.

II.2.1.1.4. Intranasale (i.n.) Applikation von Proteinlösung

Die Versuchstiere wurden im Exsikkator mit 10 ml 100% Isofluran betäubt und in Rückenlage gebracht. Dann wurden 50 µl einer 2 mg/ml in 1 x PBS konzentrierten OVA-Lösung auf ein Nasenloch des Versuchstieres getropft und vom Tier vollständig eingeatmet. Als Kontrolle wurden bei einigen Tieren 50 µl 1 x PBS intranasal appliziert. Die intranasale Behandlung wurde an drei aufeinander folgenden Tagen, die dem Tag der Lungenfunktionsmessung 48 Stunden vorausgingen, durchgeführt.

II.2.1.2. Serumgewinnung

Zur Überprüfung einer erfolgreichen subkutanen Immunisierung der Versuchstiere wurde bei jedem Tier ein Immunglobulin-ELISA (siehe II.2.12.1) zur Feststellung des Serumimmunglobulintiters durchgeführt. Dazu wurde dem Tier durch leichtes Drehen mit einer Pasteurpipette Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Das Blut wurde in einem 1,5 ml- Reaktionsgefäß aufgefangen und nach einer Stunde Inkubation bei RT die geronnenen Bestandteile des Bluts („Blutkuchen“) entfernt. Zur Gewinnung des Serums wurde nun bei 10000 UpM in der Eppendorffzentrifuge für 5 min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde vorsichtig abgenommen und in 0,5 ml- Sicherheitsgefäßen bei -20°C bis zur weiteren Analyse weggefroren.

II.2.1.3. Intravenöser adoptiver Zelltransfer

Umgehend nach der Isolation wurden Milzzellen (siehe II.2.2.2.3) bzw. Lymphknotenzellen (siehe II.2.2.2.2) und magnetisch aufgereinigte Subpopulationen von T-Zellen nach Zugabe von 2 ml 1 x PBS für 10 min bei 300 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das Zellsediment wurde auf die gewünschte Zellzahl in 200 µl PBS pro Maus eingestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Um eine Erweiterung der Venen zu erreichen wurden die zu behandelnden Versuchstiere mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt. Die Zellen wurden vor dem Transfer gut resuspendiert und mittels einer 1 ml Einmalspritze luftabschlussfrei in die Schwanzvene naiver Mäuse injiziert.

II.2.2. Zellbiologische Methoden

II.2.2.1. Allgemeines zu Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit autoklavierten oder sterilfiltrierten oder vom Hersteller steril bezogenen Substanzen und Lösungen gearbeitet. Verbrauchsmaterial welches in Kontakt zur Zellkultur stand, war ebenfalls steril. Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei Standardbedingungen (37 °C, 10% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in CO₂ begasten Brutschränken.

II.2.2.2. Präparation von Organen

Die Versuchstiere wurden durch cervikale Dislokation getötet und mit 70%igem Alkohol aus der Spritzflasche desinfiziert. Die Präparation aller Organe erfolgte mit zuvor sterilisierten Instrumenten unter der Sterilwerkbank.

II.2.2.2.1. Präparation von Lungenzellen

Den getöteten Versuchstieren wurden beide Lungenflügel entnommen und in einem mit 2-4 ml HEPES-Puffer gefüllten Polypropylenröhrchen gesammelt. Die Lungenflügel wurden dann, ohne das Aufbewahrungsmedium mitzuführen, mit einer Pinzette in eine bakterielle Petrischale, in die 4,8 ml HEPES-Puffer vorgelegt worden waren, gegeben und in Gewebedissoziationsröhrchen (C-Röhrchen) überführt (maximal 3 Organe pro Röhrchen). Dann wurde zur Zerkleinerung einer Lunge 10 µl DNase I (10 mg/ ml) und 200 µl Kollagenase Typ 2 (50 mg / ml in HBSS) hinzugegeben, die Röhrchen wurden in das GentleMACS-Gerät eingespannt und mit „Programm 1 Lunge“ behandelt. Für 2-3 Lungen erhöhte sich die Menge der DNase I auf 20 µl bei unveränderter Kollagenasezugabe. Die Röhrchen wurden daraufhin für 30 Minuten bei 37°C horizontal im Schüttler bei 300 UpM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Gewebebrei mit Hilfe des GentleMACS-Gerätes mit „Programm 2 Lunge“ zu einem feineren Brei zerkleinert. Der

Gewebebrei wurde dann durch ein 40 µm Nylon-Zellsieb passiert und so in ein frisches 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Es wurden anschließend 5 ml Waschmedium auf das Sieb gegeben und der Gewebebrei nochmals passiert. Zuletzt wurde das Sieb mit weiteren 5 ml Waschmedium gespült und die Zellsuspension abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abdekantiert, für weitere Analysen bei -20°C weggefroren oder verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen (aus einer Lunge) in 1 ml Gey'schem Lysepuffer resuspendiert und 90 Sekunden bei RT inkubiert. Für 2 (3) Lungen wurden 2 (3) ml Lyse-Puffer zugegeben. Die Lyse wurde unter Zugabe von 10 ml Waschmedium beendet. Die Zellen wurden insgesamt drei Mal mit Waschmedium versetzt und zentrifugiert um den Lysepuffer zu entfernen, letztlich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bis zur Zellzahlbestimmung auf Eis gelagert.

II.2.2.2.2. Präparation von Lymphknotenzellen

Die drainierenden (cervikalen) Lymphknoten wurden den getöteten Versuchstieren entnommen und gruppenweise in einem mit 2 ml eiskaltem Waschmedium gefüllten 2 ml Röhrchen gesammelt. Zum Organaufschluss wurde der Inhalt der Röhrchen in eine 60 mm bakteriologische Petrischale überführt und die Organe zwischen den aufgerauten Enden zweier, durch Abflammen sterilisierter Mattrandobjektträger zerrieben. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit einer 5 ml Stangenpipette über ein 40 µm Nylon-Zellsieb in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Petrischale und die Objektträger wurden mit weiteren 10 ml Waschmedium ausgespült und dies ebenfalls über das Sieb gegeben. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 x g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Gegebenenfalls wurde eine Lyse der Erythrozyten mit 1 ml Gey'schem Lysepuffer, für eine Minute bei RT inkubiert, durchgeführt. Erfolgte eine Lyse, wurden zwei weitere Zentrifugationsschritte (300 x g, 4°C, 10 min) vorgenommen, um die Zellen mit jeweils 10 ml Waschmedium zu waschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 1- 2 ml Kulturmedium aufgenommen und bis zur Zellzahlbestimmung auf Eis gelagert.

II.2.2.2.3. Präparation von Milzzellen

Die Milzen wurden den getöteten Versuchstieren entnommen und einzeln oder gruppenweise in einem mit 5 ml eiskaltem Waschmedium gefüllten 50 ml Polypropylen-Röhrchen gesammelt. Zum Organaufschluss wurde der Inhalt der Röhrchen in eine 94 mm bakteriologische Petrischale überführt, die Organe wurden mit abgeflamten Objektträgern zerschnitten und zwischen den aufgerauten Enden der Mattrandobjektträger zerrieben. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Stangenpipette über ein 40 µm Nylon-Zellsieb in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Petrischale und Objektträger wurden mit weiteren 10 ml Waschmedium ausgespült und dies ebenfalls über das Sieb gegeben. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 x g, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mit 1 ml Gey'schem Lysepuffer pro Milz für eine Minute bei RT. Die Reaktion wurde mit 20 ml Waschmedium abgestoppt und die Zellen zentrifugiert. Es folgten zwei zusätzliche Waschschriffe (300 x g, 4°C, 10 min) um den Lysepuffer zu entfernen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium pro Milz aufgenommen und bis zur Zellzahlbestimmung auf Eis gelagert.

II.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl der lebenden Zellen in der Zellsuspension wurde durch eine Trypanblaufärbung bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in Zellen mit defekter Zellmembran ein und färbt die Zellen blau. Lebende, intakte Zellen können so leicht unterschieden werden. Es wurde eine Probe der resuspendierten Zellsuspension in Trypanblaulösung verdünnt (1:2, 1:5 oder 1:10) und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anhand der folgenden Formel konnte die Lebendgesamtzellzahl (LGZZ) bestimmt werden:

LGZZ = Zellen in einem Großquadrant x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor (10⁴) x Volumen (ml)

II.2.2.4. Antigen-spezifische Restimulation von Immunzellen

Durch die *in vitro* Stimulation von Zellen aus der Milz oder der Lunge ist es möglich, die antigen-spezifische Produktion von Zytokinen zu bestimmen. Dies geschieht mittels ELISA bei Kulturüberständen oder mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Zellebene.

Durchführung:

In einer 24-Loch-Kulturplatte wurden 5×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium in An- bzw. Abwesenheit von 100 µg/ml Ovalbumin (OVA) über 72 Stunden in einem Gesamtvolumen von 1 ml pro Vertiefung im Brutschrank kultiviert (37°C, 10% CO₂). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 800 µl der Kulturüberstände pro Loch abgenommen und bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im ELISA in 15 ml Polypropylenröhrchen bzw. 1,5 ml-Eppendorfgefäßen (Protein-Lo-Bind) bei -20 °C aufbewahrt. Die in der Vertiefung verbliebenen Zellen wurden geerntet, in 15 ml Röhrchen überführt und für die folgende durchflusszytometrische Analyse auf Eis aufbewahrt.

II.2.2.5. Lymphozytenseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Mithilfe des synthetischen Lymphozytenseparationsmedium (LSM), einem Saccharose-Polymer ist es möglich Zellen anhand ihrer Größe über einen Dichtegradienten aufzutrennen. Den zu testenden DO11.10-Tieren wurden 5 Tropfen Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen, welches 1 ml raumtemperierten Screening-Puffer enthielt (Schritt A). Das Eppendorfgefäß wurde invertiert, um das Blut mit dem Puffer zu vermengen. Anschließend wurden die Blutproben mit 3 ml frischem raumtemperiertem Waschmedium in einem 15 ml Polypropylenröhrchen (PP-Röhrchen) vermischt (Schritt B). In ein weiteres frisches 15 ml PP-Röhrchen wurden 4 ml LSM vorgelegt und daraufhin mit der verdünnten Blutprobe aus Schritt B vorsichtig überschichtet, so dass sich 2 Phasen bildeten (Schritt C). Die Röhrchen aus Schritt C wurden anschließend bei RT mit 2100 UpM für 20 Minuten zentrifugiert. Der Rotor wurde langsam und bei ausgeschalteter Rotorbremse

hochgefahren, um die Gradientenbildung nicht zu behindern. Durch die Zentrifugalkraft wurden die Zellen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Es entstanden somit 3 Phasen. Die obere Schicht machte das Plasma aus, in der Interphase befanden sich die gewünschten Lymphozyten (PBMC= peripheral blood mononuclear cells), dann folgte Ficoll und am Boden des Röhrchen sedimentierten Granulozyten und Erythrozyten. Die Lymphozyten enthaltende Interphase wurde mithilfe einer Glaspasteurpipette abgenommen und in ein mit 5 ml Waschmedium gefülltes frisches 15 ml PP-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden daraufhin zentrifugiert (300 x g, 10 Min. 4°C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen aus DO11.10-Tieren mithilfe der FACS-Analyse auf die Expression des OVA-transgenen Rezeptors auf der Zelloberfläche untersucht (siehe I.2.2.13.1).

II.2.2.6. Proliferationstest

Im Proliferationstest wurden Milz- oder Lymphknotenzellen auf die Fähigkeit hin getestet, auf einen spezifischen Stimulus durch das Antigen zu proliferieren.

Mehrfach subkutan immunisierten Versuchstieren wurden die Milzen entnommen. Die Zellen wurden isoliert und in einer 96-Loch-Flachbodenplatte zusammen mit abnehmenden Konzentrationen des spezifischen Antigens für 72 Stunden kultiviert und dann mit radioaktiv markiertem Thymidin versetzt. Das radioaktiv markierte Thymidin wurde während der weiteren Inkubation in die neusynthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die eingebaute Radioaktivität konnte anschließend mit einem Szintillationszähler gemessen werden.

Durchführung:

Nach Präparation der Organe (siehe II.2.2.2) und Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe II.2.2.3) wurden die Zellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Das Gesamtvolumen im Test betrug 200 µl je Loch. In das erste Triplikate einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 200 µl einer OVA-Proteinlösung (100 µg/ml) in Testmedium pipettiert und in Triplikaten seriell 1:2 über 7 Stufen in 100 µl vorgelegtes Testmedium titriert, wobei nach der letzten Stufe 100 µl verworfen

wurden. Das letzte Triplikate eines Ansatzes diente als Leerkontrolle zur Bestimmung der antigen-unspezifischen Proliferation und enthielt Testmedium anstelle der OVA-Lösung.

Anschließend wurde in jedes Loch 100 µl der Zellsuspension gegeben, die eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 100 µl aufwies.

Nach einer 72-stündigen Inkubation bei 37°C (10% CO₂) wurde den Zellen 0,25 µCi ³HTdR pro Loch zugesetzt. Der Test wurde weitere 16 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren um die Proliferation zu stoppen und die Lyse der Zellen einzuleiten. Zum Ernten der Platten wurden diese aufgetaut. Im Zellerntegerät wurden die lysierten Zellen mittels eines Stroms destillierten Wassers durch einen Glasfaserfilter gesaugt wobei die DNA an diesem Filter zurückgehalten wurde. Anschließend wurde die Filtermembran in der Mikrowelle getrocknet und die DNA somit immobilisiert. Danach wurden die trockenen Filter in eine Folie mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweisst und in Kassetten eingelegt. Die Flüssigkeit verstärkt dabei die niedrige β-Strahlung des ³H-Thymidin. Durch ein Szintillationsmeßgerät wurde die Menge der eingebauten Radioaktivität bestimmt.

II.2.2.7. Degranulationstest (RBL-Test)

Mithilfe der Granulozyten- Zelllinie RBL (Rat Basophilic Leucemia)-2H3 ist es möglich die funktionelle Kapazität von IgE-Antikörpern im Serum sensibilisierter Versuchstiere im Hinblick auf die Auslösung einer Degranulation von Granulozyten zu testen. RBL-2H3 verfügen wie Mastzellen über IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche. Durch die Inkubation der Zellen mit IgE-enthaltendem Serum werden die FcεRI beladen. Wird das relevante Antigen zu den IgE-beladenen Zellen pipettiert, werden die IgE-Rezeptoren kreuzvernetzt und führen nach Aktivierung einer Signalkaskade zur Degranulation der Zellen und somit zur Freisetzung von β-Hexosaminidase (β-Hex). Als Positivkontrolle dienen Zellen, denen ausschließlich die unspezifischen Stimulatoren PMA und A23187 zugesetzt werden. Die Zugabe dieser Ionophore führt zu einer Degranulation der Zellen, die unabhängig ist vom IgE-Rezeptor und somit den Wert der maximalen β-Hex-Freisetzung im Test angibt.

Als weitere Kontrolle wurden Zellen ohne Serum mit bzw. ohne Antigen inkubiert, um die Hintergrundreaktion des Testsystems zu messen. Als Spezifitätskontrolle für die Antigenzugabe dienen Serum-behandelte Ansätze mit bzw. ohne Antigenzugabe. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten werden die Überstände der Zellkulturen gewonnen. Diese enthalten β -Hex, welches auf den antigenen Stimulus hin freigesetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einem Detergenz für 60 Minuten behandelt, was zur Lyse der RBL-Zellen führt und somit sämtliches β -Hex im Lysat freisetzt. Die Lysate der Zellen wurden ebenfalls gewonnen.

Zum Nachweis der freigesetzten β -Hex Menge in Überstand und Lysat dient ein photometrischer Versuchsansatz. Durch die enzymatische Aktivität des β -Hex kann über die Umsetzung eines zugesetzten Substrats (pNAG) die Menge an freigesetztem β -Hex bestimmt werden und somit indirekt auf den IgE-Gehalt im Serum geschlossen werden.

Durchführung:

Am Vortag des RBL-Tests wurden die Zellen in einer 96-Loch Mikrotiterplatte in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Loch in RBL-Testmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2 kultiviert. Am Morgen des RBL-Tests wurden zunächst die Seren aufgetaut und in RBL-Testmedium vorverdünnt (zehnfach konzentriert gemessen an der gewünschten Endverdünnung). Einem Quadruplikat der RBL-Zellen wurden daraufhin je Loch 5 μl der entsprechenden Serumverdünnung zugesetzt und die Ansätze anschließend für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Zwei Quadruplikate dienten als Kontrollansätze (Negativ- und Positivkontrolle) und blieben unbehandelt. In der Zwischenzeit wurde der TYRODES-Puffer (siehe II.1.4.1), 1,5-prozentiges Triton X-100 (verdünnt in TYRODES-Puffer), die Stimulatoren KLH (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TYRODES-Puffer) oder OVA (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TYRODES-Puffer) sowie die Positivkontrolle [75 μl A23187 (= 7,5 μM) und 46,2 μl PMA (= 150 mM) in 439 μl TYRODES-Puffer] und die Nachweisplatten vorbereitet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 150 μl TYRODES-Puffer pro Loch gewaschen. Einem Duplikat der mit Serumverdünnungen behandelten Quadruplikate, bzw. der Negativkontrolle wurden 100 μl KLH bzw. OVA-Lösung

zugesetzt und das andere Duplikat mit 100 µl RBL Testmedium versehen. Das Quadruplikat für die Positivkontrolle wurde mit 100 µl der Stimulationsmischung aus PMA und A23187 behandelt. Nach einer 45 minütigen Inkubationszeit wurden 100 µl der Überstände aus den Duplikaten in Eppendorf-Gefäßen vereinigt. Die Ansätze wurden anschließend mit 150 µl TYRODES-Puffer pro Loch gewaschen. Den gewaschenen Zellen wurde daraufhin 100 µl 1,5% ige Triton-X-Lösung zugesetzt und die Zellen daraufhin für 45 Minuten im Brutschrank kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit dem Detergenz führte zur Lyse der Zellen. Die Lysate aus den Duplikaten wurden in vorbereiteten Eppendorf-Gefäßen vereinigt. Für den Nachweis des freigesetzten Enzyms β -Hexosaminidase wurden zunächst die Überstände bzw. Lysate in Duplikaten über 3 Stufen seriell 1:3 verdünnt (Testvolumen 50 µl). Zur Berechnung des Leerwerts wurde in einige Vertiefungen auf jeder Nachweisplatte 50 µl TYRODES-Puffer pipettiert. Nach der Titration der Proben wurde allen Ansätzen 50 µl Substratlösung zugesetzt (1mM pNAG in 0,1 M tri-Na-Citratpuffer). Die Platten wurden bei 37°C und 10% CO₂ für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Ansätzen 150 µl 0,2 M Glycinpuffer zugesetzt, was in Anwesenheit von β -Hex zu einem Farbumschlag von Farblos nach Gelb führte. Die Extinktion wurde anschließend im Photometer bei 405 nm gemessen. Anhand der Extinktionswerte der Überstände und Lysate wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und so der prozentuale Anteil der Freisetzung der β -Hexosaminidase in den Kulturen als prozentualer Wert bestimmt.

II.2.2.8. Lungenfunktionsmessung

Der bronchoalveoläre Strömungswiderstand oder die Atemwegsreaktivität (AR) ist abhängig von Körpergröße und Alter des Individuums und kann auch auf einen unspezifischen Stimulus hin durch Verengung der Atemwege zunehmen. Dies geschieht als ein Schutzmechanismus der Lunge vor tiefer Inhalation, zum Beispiel toxischer Substanzen.

Bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie dem allergischen Asthma erhöht sich der Atemwegswiderstand über diesen physiologisch wirksamen Effekt hinaus und es kommt zu einer sogenannten Atemwegshyperreaktivität (AHR).

Die Messungen der Atemwegsreaktivität wurden im Rahmen der Asthma Core Facility der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde den Versuchstieren im murinen Modell des allergischen Asthma als unspezifischer Stimulus inhalativ Metacholin (MCh) verabreicht und der veränderte Strömungswiderstand auf invasive und nicht-invasive Weise detektiert.

II.2.2.8.1. Invasive Lungenfunktionsmessung mittels BUXCO

48 Stunden nach der letzten intranasalen Provokation mit Ovalbumin wurden die Versuchstiere betäubt und die Haut oberhalb des Cervix entfernt, bis eine fellfreie runde Stelle zu sehen war. Daraufhin wurde ein vertikaler Schnitt über dem Thymus durchgeführt und die Haut und das Muskelgewebe wurden mit 2 Pinzetten entfernt, um den Ösophagus und die Trachea freizulegen. Daraufhin wurde die Trachea fixiert indem ein Spatel vorsichtig zwischen Ösophagus und Trachea geschoben wurde. Anschließend wurde ein medizinischer Faden unter der Trachea durchgeführt, um den 16 mm Tubus später fixieren zu können. Durch einen kleinen vertikalen Schnitt zwischen zwei oberen trachealen Ringen entstand ein Loch, in welches der Tubus bis zum Entstehen eines leichten Widerstands eingeführt wurde und mit dem medizinischen Faden in dieser Position fixiert werden konnte. Das intubierte Tier wurde nun nach Anweisung des Herstellers in die Messkammer eingelegt und über das System ventiliert. Die Kammer wurde geschlossen, um äußere Einflüsse zu vermeiden. Für die Messung wurde zunächst die Grundreaktivität der Atemwege bestimmt (60 Sek.). Nach dieser initialen Messung wurden für 30 Sekunden 3,125 mg/ml Methacholin in 1x PBS über den Tubus eingeleitet und die Änderung des Atemwiderstands aufgezeichnet. Für die Dosen 6,25 mg/ml; 12,5 mg /ml; 25 mg/ml und 50 mg/ ml wurde ebenso verfahren. Die Analyse der Daten erfolgte mit BioSystem XA Software (Buxco Research Systems) und Excel (Microsoft).

II.2.2.8.2. Ganzkörperplethysmographie (nicht invasive Messung)

24 Stunden nach der letzten intranasalen Provokation mit dem Modellallergen wurden die Versuchstiere einzeln in den Ganzkörper-Plethysmographen gesetzt und der Kammerdruck (P) während der Normalatmung der Maus gemessen. Dies ist möglich durch einen am Ableitungsrohr der Kammer gekoppelten Pneumotachograph, der die Druckschwankungen resultierend aus der Atembewegung der Maus verstärkt und durch einen Computer aufzeichnet.

Zu Anfang wurde 5 Minuten lang die Ruheatmung gemessen und gemittelt. Als Basislinie wurde der Wert 100 festgelegt und die Änderungen als % der Abweichung von der Basislinie festgehalten. Daraufhin strömte je Dosis 3 Minuten lang aerosolisiertes Metacholin in ansteigenden Dosen (3,125 mg/ml; 6,25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml in 1 x PBS) in die Kammer, wo es von den Versuchstieren inhaliert wurde. Während der folgenden 5 Minuten, wurde die Änderung des Drucks und damit die Änderung des Strömungswiderstands der Lunge der Tiere aufgezeichnet und der Mittelwert berechnet. Die Verabreichung der Metacholindosen wurde unterbrochen durch eine jeweils 7 minütige Pause.

Aus dem durch die Verengung der Bronchien bedingten Kammerdruckabfall und dem Verhältnis aus Maximaldrücken bei Inspiration und Expiration der Tiere wurde ein dimensionsloser Parameter errechnet, die Penh („enhanced pause“). Der Wert für die Penh stieg hierbei mit zunehmendem Atemwiderstand.

II.2.2.9. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Über den bereits für die Lungenfunktionsmessung gesetzten Tubus wurden mithilfe eines Adapters (Kanüle in eine 100 µl Pipettenspitze gesteckt) und einer 1 ml Spritze 1000 µl eiskalte BAL- Spülflüssigkeit mit leichtem Druck in die Lunge injiziert und unter Unterdruck sofort wieder herausgezogen. Die wiedergewonnene Flüssigkeit wurde in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt, nach der Volumenbestimmung abzentrifugiert (300 x g, 4°C, 10 min), der zellfreie Überstand (BALF, BAL-Flüssigkeit) in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und sofort bei -20 ° C bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA eingefroren. Das Zellsediment

wurde aufgebrochen und in 500 μ l 1x PBS bis zur Zellzahlbestimmung auf Eis verwahrt. Die Zellen wurden für Zytospinpräparate verwendet um später die einzelnen Leukozyten-Populationen in der BAL näher zu charakterisieren.

II.2.2.10. Herstellung von Zytospinpräparaten

Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung wurden die durch die BAL erhaltenen Zellen resuspendiert, jeder Probe 2 ml 1x PBS zugefügt und zentrifugiert (300 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Es wurden 50 μ l 1 x PBS pro 5×10^5 Zellen je Probe für einen Spin zugegeben und die Zellen in einer Zytospinzentrifuge bei 500 UpM und mittlerer Beschleunigung für 5 min auf Objektträger zentrifugiert. Die so erhaltenen Präparate wurden luftgetrocknet, mit Hilfe des Diff- Quick®-Färbesets nach Herstellerangaben fixiert und gefärbt. Die Präparate wurden erneut luftgetrocknet und dann mittels Entellan® unter Verwendung von Deckgläschen eingedeckt.

II.2.2.11. Differenzierung von Zellen aus der BAL

Die Analyse der Zellen in der BAL erfolgte durch Aufnahmen mit dem Systemmikroskop Olympus BX50 inklusive Digitalkamera. Es wurden für jedes Versuchstier 10 Aufnahmen pro Objektträger gemacht (400-fach vergrößert) und die Zellen mit dem Programm cellF⁺ ausgezählt. Dabei unterschied man zwischen Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten und Erythrozyten. Nicht identifizierbare Zellen wurden zur Auswertung mitgezählt, sind aber im Ergebnisteil nicht aufgeführt.

II.2.2.12. Enzyme-linked- Immunosorbent Assay (ELISA)

Unter dem ELISA versteht man einen immunologischen Test zum quantitativen Nachweis von Proteinen wie z.B. Immunglobulinen oder Zytokinen. Es ist so möglich anhand eines Standards die Konzentration von Zytokinen in Kulturüberständen zu ermitteln bzw. den Immunglobulintiter von Seren zu bestimmen.

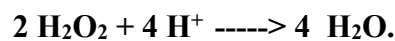
II.2.2.12.1. Immunglobulin (Ig)-ELISA

Der Ig-ELISA dient dem quantitativen Nachweis von antigenspezifischen Immunglobulinen im Serum von Versuchstieren. Es handelt sich hierbei um einen direkten Nachweis, bei dem die 96-Loch-Platte mit dem antigenen Protein beschichtet wird. Freie unspezifische Bindungsstellen wurden durch einen BSA-haltigen Puffer abgesättigt. Die Seren werden dann in geeigneter Verdünnung aufgetragen. Die Detektion erfolgte über einen Subklassen-spezifischen biotinylierten Antikörper, der im folgenden Schritt das Enzym Merrettich-Peroxidase über Streptavidin bindet. Im letzten Schritt wurde das Substrat OPD zugegeben und seine Umsetzung mittels H_2O_2 in ein farbiges Produkt betrachtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M H_2SO_4 gestoppt und anschließend wurde die optische Dichte photometrisch bestimmt. Die Intensität der Färbung gab schließlich Auskunft über den Gehalt von spezifischem Immunglobulin im Serum.

Durchführung:

Eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte mit einer hohen Bindungskapazität wurde mit 100 μ l je Loch einer antigenhaltigen Lösung (50 μ g / ml OVA bzw. 25 μ g/ ml KLH in 0,1 M $NaHCO_3$) blasenfrei beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung aus der Platte ausgeschlagen und 200 μ l 1% BSA in 1 x PBS in die Vertiefungen pipettiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Lösung ausgeschlagen und die Seren in geeigneter Verdünnung in die Platte pipettiert wobei die Seren 1: 2 über 10 Stufen titriert wurden. Als Kontrolle für die Spezifität dienten Ansätze, die nicht mit antigenhaltiger Lösung aber mit 1xPBS/1% BSA beschichtet wurden. Als Leerkontrolle dienten Ansätze, die anstelle von Serum 1xPBS/1% BSA enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Messung von IgE-Antikörpern im Serum der Tiere war es nötig zunächst einen IgE-Fängerantikörper zuzugeben. Der Ratte Anti-Maus IgE Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und in einem Volumen von 100 μ l je Vertiefung für 45 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurde ein biotinylierter isotypspezifischer Detektionsantikörper Maus Anti-Ratte IgG in einer Verdünnung von 1:2000 und einem Volumen von 100 μ l je Loch aufgetragen. Direkt

mit Biotin markierte Ziege Anti-Maus IgG₁ bzw. Ziege Anti-Maus IgG_{2a}-Detektionsantikörper in einer Verdünnung von 1: 5000 dienten gegebenenfalls zum Nachweis von IgG-Subklassen im Serum. Nach 45 minütiger Inkubation bei RT wurde die Detektionslösung durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und 100 µl je Loch des Streptavidin-konjugierten Enzyms Peroxidase 1: 2000 in 1 x PBS /% BSA verdünnt aufgetragen. Nach 45 minütiger Inkubation bei RT wurde durch dreimaliges Waschen und sorgfältiges Ausschlagen die Restlösung gründlich entfernt. Zum Nachweis der antigenspezifischen, über das Antigen an den Plattenboden gebundenen, Immunglobuline wurde nun je Loch 100 µl OPD-Substratlösung (1 mg OPD / ml Substratpuffer mit 1 µl H₂O₂ pro ml Substratpuffer) in die Vertiefungen gegeben und die Umsetzung des OPD in ein farbiges Produkt abgewartet. Die Peroxidase oxidierte Wasserstoffperoxid zu Wasser wie folgt:



Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 1M H₂SO₄ beendet und es kam zu einem Farbumschlag von gelb zu orange. Im Spektralphotometer wurde bei 490 nm die optische Dichte gemessen. Anhand einer linearen Regression wurde der Antikörpertiter bei einer optischen Dichte von 0,2 ermittelt.

II.2.2.12.2. Zytokin-ELISA

Für den quantitativen Nachweis von Zytokinen, wie IFN-γ, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, und TSLP in Überständen aus Milz- und Lungenzellkulturen, sowie der bronchoalveolären Flüssigkeit und Lungenlysaten wurde ein indirekter Sandwich-ELISA verwendet. Hierbei wurde ein zytokinspezifischer Primärantikörper an die Platten gekoppelt, der dann mit den Überständen inkubiert wurde und die enthaltenen Zytokine je nach Spezifität band. Zur Detektion dieser Zytokine wurden zytokinspezifische, biotinylierte Sekundärantikörper zugegeben, an die wiederum ein Streptavidin-konjugiertes Enzym (Merrettich-Peroxidase) band und im letzten Schritt das farblose OPD zu einem farbigen Produkt umsetzte, dessen optische Dichte bestimmt wurde. Als Referenzwert diente jeweils eine Verdünnungsreihe einer Standardlösung des jeweiligen Zytokins.

Durchführung:

Die Beschichtung der ELISA-Platten mit dem Fängerantikörper (siehe II.1.7.5.1) erfolgte verdünnt in 1M NaHCO₃ (IFN- γ , IL-5) bzw. 1 x PBS (IL-10, IL-13, IL-17A) in einem Volumen von 50 μ l je Loch über Nacht bei 4°C (IFN- γ , IL-5) bzw. RT (IL-10, IL-13, IL-17A). Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal im ELISA-Waschgerät mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeschlagen.

Um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen wurden die Platten mit 150 μ l Blockierungslösung für eine Stunde bei RT inkubiert und die Lösung anschließend gründlich ausgeschlagen. Der Probenauftrag der Ansätze mit unbekannter Zytokinkonzentration, sowie der Standardlösung bekannter Konzentration erfolgte in einer zweifachen seriellen Titrationsreihe mit einem Volumen von 50 μ l je Loch in 1 x PBS /1% BSA bzw. in 100 μ l 1x Assay-Diluent über Nacht bei 4°C. Zur Kontrolle wurden einige Löcher nur mit Verdünnungspuffer (Leerwert) mitgeführt. Danach wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und sorgfältig ausgeschlagen.

Im Anschluss folgte die Zugabe der biotinylierten Detektionsantikörper (siehe II. 1.7.5.2) in 1xPBS/1%BSA in einem Volumen von 50 μ l je Loch mit einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C (IL-5 und IFN- γ) bei RT bzw. 120 min bei RT (IL-10, IL-13 und IL-17A). Die Platten wurden dann mit Waschpuffer zweimal gewaschen und gründlich ausgeschlagen.

Die Inkubation mit Streptavidin-konjugierter Merrettich-Peroxidase (siehe II.1.11) 1:1000 verdünnt erfolgte in einem Volumen von 50 μ l je Loch in 1xPBS/1% BSA für eine Stunde bei RT. Nach diesem Schritt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft.

Zur Entwicklung des Tests wurde 1 mg OPD pro ml Substratpuffer vollständig gelöst und mit 1 μ l H₂O₂ pro ml Substratlösung versetzt. 50 μ l je Loch dieser Lösung wurden in die Platte pipettiert und ein Farbumschlag abgewartet. Spätestens mit beginnender Verfärbung des Leerwertes wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des gleichen Volumens 1M H₂SO₄ abgestoppt.

Bei 490 nm wurde dann im Spektralphotometer die Extinktion gemessen. Durch lineare Regressionsanalysen der Messwerte und des Standards konnte die Konzentration der Proben errechnet werden. Dazu wurde die Zytokinkonzentration

der Standardlösung mit der Verdünnung der Proben bei einer OD von 0,2 in Zusammenhang gebracht.

II.2.2.13. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse („Fluorescence-activated cell sorting“) ist eine Methode zur Quantifizierung von Zellen aufgrund bestimmter Moleküle auf der Oberfläche oder im Zellinneren, sowie anhand von Größe und Granularität der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse zur Untersuchung des Zytokinprofils von Immunzellen, zur Überprüfung der Reinheit isolierter T-Zellen, sowie der Analyse von Oberflächenmolekülen auf CD4-CD8-doppelt negativen T-Zellen verwendet. Dies gelang durch die Analyse der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD90.2, sowie CD25, CD28, CD69, CD62L, CTLA-4, GITR, Nkp46, CD178 (FasL). Ebenfalls getestet wurde die Expression der intrazellulären Moleküle Perforin, IL-4, IL-5, IL-10

und IFN- γ . Die verwendeten Fluoreszenzmarker waren Phycoerythrin (PE) oder Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Cy5- Phycoerythrin (Cy5PE), Cy7- Phycoerythrin (Cy7PE), Allophycocyanin (APC) and Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP). Diese Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einer Strahlung der Wellenlänge 488 nm (Argonlaser) bzw. 633 nm (Helium-Neon-Laser) im BD FACS Canto II (Becton Dickinson) angeregt und emittierten dann Licht der Wellenlängen 578 nm (PE), 520 nm (FITC), 667 nm (Cy5PE), 785 (Cy7PE), 660 nm (APC) bzw. 678 nm (PerCP). Im Durchflusszytometer wurden die Zellen vereinzelt an einem blauen Argonstrahler bzw. roten Helium-Neon-Strahler vorbeigeführt und die Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffs detektiert. Granularität und Größe der Zellen konnten durch die Lichtstreuung (SSC: Side Scatter) und Lichtbeugung (FSC: Forward Scatter) ermittelt werden.

II.2.2.13.1. Oberflächenfärbung

Die aufbereitete Zellsuspension wurde auf 1×10^7 /ml eingestellt und 200 μ l Suspension (2×10^6 Zellen) in die Vertiefung einer unbeschichteten 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte (Nunc) verteilt und abzentrifugiert (300 x g, 10 Min, 4°C). Der Überstand wurde aus der Platte ausgeschlagen und unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 20 μ l (2,6 μ g/ml) 1:100 in FACS-Medium verdünnten Anti-Fc γ RII/III-Antikörper (Klon 2.4.G2) abgesättigt und resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, bei 4°C wurden 20 μ l einer doppelt konzentrierten Mischung aus mehreren Primärantikörpern gegen die zu analysierenden Oberflächenmoleküle auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Vortex gemischt und für 20 min, bei 4°C inkubiert. Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern gegen das Oberflächenantigen erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit 200 μ l FACS-Medium ein weiterer Färbeschritt unter Zugabe von 20 μ l eines biotinylierten fluoreszenzmarkierten Antikörper für 20 min bei 4°C. Zum anschließenden Waschen der Zellen wurden 200 μ l FACS-Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann in 200 μ l DPBS (Gibco, Carlsbad, USA) in FACS-Röhrchen überführt und am BD FACS Canto II analysiert.

II.2.2.13.2. Intrazelluläre Färbung

Die zu analysierenden Zellen wurden auf 1×10^7 / ml eingestellt und 200 μ l Suspension (2×10^6 Zellen) in die Vertiefung einer unbeschichteten 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte (Nunc) verteilt und abzentrifugiert (300 x g, 10 Min, 4°C). Die Zellen wurden daraufhin für 4 Stunden mit 50 ng/ml Phorbolmyristataacetat (PMA), 0,5-1 μ g/ml Ionomycin und 1 μ l/ml GolgiPlug (enthält Brefeldin A; BD, Heidelberg) in 100 μ l Kulturmedium bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Es erfolgte eine Oberflächenfärbung nach den unter II.2.12.1. beschriebenen Schritten. Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 100 μ l kalter, frisch angesetzter Fix/Perm-Lösung versetzt, resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C) und der

Überstand ausgeschlagen. Um intrazellulär Fc-Rezeptoren (FcγRII/III) abzusättigen wurde je Ansatz 20 µl eines 1:100 in Permeabilisierungspuffer verdünnten 2.4.G2-Antikörpers zugegeben und die Zellen anschließend für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µl 1x Permeabilisierungspuffer pro Vertiefung. Daraufhin wurden 20 µl einer doppelt konzentrierten Antikörperlösung gegen intrazellulär exprimierte Moleküle (IFN-γ, IL-5, IL-4, IL-10, Perforin) in die entsprechende Vertiefung pipettiert bzw. der in 1x Permeabilisierungspuffer verdünnte Isotypkontroll-Antikörper in einem Volumen von 20 µl zugegeben. Die Zellen wurden gemischt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 150 µl 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand ausgeschlagen. Die Zellen wurden je nach Größe des Zellsediments in 100-200 µl DPBS (Gibco) aus der Platte geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und bei 4°C im Dunkeln bis zur Messung am BD FACS Canto II verwahrt.

II.2.2.13.3. Durchflusszytometrischer Nachweis von Foxp3

1x10⁶ Zellen wurden in FACS-Röhrchen mit Schliff gegeben und abzentrifugiert (300 x g, 10 Min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellsediment wurden daraufhin zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 25 µl eines 1:100 in FACS-Puffer (siehe II.1.4.2) vorverdünnten 2.4G.2- Antikörper versetzt, auf dem Vortex gemischt und für mindestens 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde den Zellen 25 µl einer Mischung aus den Antikörpern Anti-Maus CD4-Cy5-PE (1:100 entspricht 1:200 final) und Anti-Maus CD25-FITC (1:25 entspricht 1:50 final) verdünnt in FACS-Puffer zugesetzt, auf dem Vortex gemischt und für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 100 µl kaltem, frisch angesetzten Fix/Perm-Puffer pro Röhrchen resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und anschließend unter Zugabe von 1 ml kaltem, frisch angesetzten 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen. Um intrazelluläre

Fc-Rezeptoren FcγRII/III abzusättigen wurde je Zellsediment 50 µl eines 1:100 in Permeabilisierungspuffer verdünnten 2.4.G2-Antikörpers zugegeben, auf dem Vortex gemischt und die Zellen anschließend für 15 min bei 4°C inkubiert. Nun erfolgte die intrazelluläre Färbung mit Anti-Maus/Human Foxp3-PE bzw. den Isotyp Maus IgG₁-PE (1:5 vorverdünnt in 1x Permeabilisierungspuffer). Zu den Proben wurde jeweils 10 µl des Anti-Maus/Human-Foxp3-PE Antikörpers bzw. in eine Probe 10 µl des vorverdünnten Maus-IgG₁-PE Isotypkontrollantikörpers pipettiert, auf dem Vortex gemischt und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml 1x Permeabilisierungspuffer pro Röhrchen. Die Zellen wurden nach einer weiteren Zentrifugation und dem Absaugen des Überstandes in 500 µl 1xPBS/ 0,7% PFA aufgenommen und bis zur Messung am BD FACS Canto II bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

II.2.2.14. Magnetische Zellseparation

Die MACS® (Magnetic-activated cell sorting)-Technologie der Firma Miltenyi Biotec ermöglicht es, Zellpopulationen über ein magnetisches Verfahren und die Expression bestimmter Oberflächenantigene zu isolieren. Bei der magnetischen Zellseparation werden Zellen mit Magnetpartikeln inkubiert, die einen Antikörper gebunden haben, der z.B. ein bestimmtes CD-Molekül auf der Oberfläche von Zellen erkennt (z.B. den T-Zell-Marker CD90). Die Magnetpartikel-beladenen Zellen durchlaufen dann eine Säule, die in ein Magnetfeld eingespannt wurde. Markierte Zellen werden durch die Kraft des Magnetfeldes auf der Säule zurückgehalten. Unmarkierte Zellen befinden sich im Durchlauf. Durch die Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld und der Zugabe von MACS-Puffer können die markierten Zellen mithilfe eines Stempels aus der Säule eluiert werden.

Es gibt zwei Strategien in der magnetischen Separation. Bei der positiven Selektion werden die Zellen von Interesse mit magnetischen Partikeln beladen (z.B. CD90) und können dann von der Säule eluiert werden. Positiv selektionierte Zellen haben den Antikörper mit Partikel dann auf der Oberfläche gebunden, was wegen der geringen Größe der Partikel in vitro jedoch meist keine Probleme macht. Eine Alternative hierzu ist die negative Selektion. Bei dieser Strategie werden alle Zellen

mit Magnetpartikel-gebundenen Antikörpern markiert, die nicht gewünscht sind (zum Beispiel alle Nicht-T-Zellen), so dass man im Durchlauf die unmarkierten Zellen von Interesse findet.

II.2.2.14.1. Positivselektion von T-Zellen

Die positive Selektion von T- Zellen und deren Subpopulationen erfolgte über die Inkubation von 1×10^8 Immunzellen mit 900 μ l MACS-Puffer (II.1.4.1) und 100 μ l CD4- oder CD8-MicroBeads bzw. CD90-MicroBeads (II.1.7.8) für 15 Minuten bei 4°C. Unterschritt oder überschritt die Zellzahl 1×10^8 wurden die Volumina für MACS-Puffer und MicroBeads entsprechend angepasst. Durch Zugabe von 14 ml Waschpuffer wurden die Zellen gewaschen und für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Die LS-Säule wurde unter Zugabe von 1 ml MACS-Puffer zuvor aktiviert. Die zu fraktionierende Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Sediment in 3 ml MACS-Puffer für 1×10^8 Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Schritten auf die Säule geladen. Die LS-Säule wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Durchlauf befanden sich die unmarkierten Zellen, welche verworfen wurden. Die mit markierten T-Zellen beladene Säule wurde aus dem Magnetfeld entnommen, durch Zugabe von 5 ml MACS-Puffer auf die Säule und unter konstantem Druck mit einem Stempel konnten CD4⁺ oder CD8⁺ bzw. CD90⁺ T-Zellen mechanisch in ein frisches 15 ml Röhrchen eluiert werden. Die T-Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde aufgebrochen und in 1-3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung für in vitro Testungen auf Eis gelagert.

II.2.2.14.2. Negativselektion von T-Zellen

Zur negativen Selektion von T- Zellen wurde eine Mischung aus biotinylierten monoklonalen Antikörpern (Pan T cell Isolation Cocktail, Milteny Biotec) gegen diverse APC, NK-Zellen und NKT-Zellen (CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1), Ter-119) zur erythrozytenfreien Zellsuspension gegeben. So ist es möglich

im Gegensatz zur positiven Selektion von T-Zellen über CD90- oder CD4-Beads, T-Zellen zu isolieren, die nicht mit magnetischen Partikeln beladen sind, sogenannte „untouched“ T-Zellen. Pro 1×10^8 Zellen wurden 400 μl MACS-Puffer und 100 μl Pan T Zell-Cocktail verwendet und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurde dieser Zellsuspension 300 μl MACS Puffer und 200 μl Anti-Biotin-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit banden die Anti-Biotin MicroBeads an die biotinylierten Primärantikörper. Die Zellen wurden dann durch Zugabe des zehnfachen Beladungsvolumens mit MACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei $300 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Es folgte die magnetische Separation von maximal 1×10^9 Zellen mittels einer LS-Säule, welche in den MACS-Separatoren eingesetzt und zur Äquilibration mit 1 ml MACS-Puffer gespült worden war. Das Sediment der zu fraktionierende Zellsuspension wurde nach der Zentrifugation in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Schritten auf die Säule geladen. Die LS-Säule wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Durchlauf befanden sich die T-Zellen welche in einem frischen 15 ml Röhrchen aufgefangen wurden. Auf der Säule verblieben markierte Nicht-T-Zellen, welche nach der Separation verworfen wurden. Die T-Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment aufgebrochen. Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen auf Eis gelagert bis zur weiteren Verwendung für eine FACS-Analyse oder zur Isolation von $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ doppelt negativen T-Zellen.

II.2.2.14.3. Depletion von $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen

Für die Depletion von $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen aus einer erythrozytenfreien Milzzellsuspension wurden 1×10^8 Zellen in 100 μl Pan TZell-Cocktail-Mischung (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) und 400 μl MACS-Puffer resuspendiert. Außerdem wurde den Zellen ein Anti- $\gamma\delta$ -TZR⁻-Biotin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 zugesetzt, bzw. der entsprechende Hamster-IgG-Biotin-Antikörper in gleicher Konzentration zugegeben. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wie in II.2.2.14.2 verfahren.

II.2.2.14.4. Separation von CD4-CD8- doppelt negativen T-Zellen (dnTZ)

Aus der Milzzellsuspension von sensibilisierten Tieren wurden mittels negativer Selektion Pan T-Zellen isoliert, welche im zweiten Selektionsschritt von CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden. Durch diese Kombination von negativer und positiver Selektion konnten „untouched“ CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellen isoliert werden. Aufgrund der höheren Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Pan T-Zellfraktion wurde die Menge der eingesetzten CD4- und CD8-MicroBeads entsprechend angepasst. Es wurden 3×10^8 Pan T-Zellen mit 1 ml CD4-MicroBeads und 1 ml CD8-MicroBeads resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe des zehnfachen Beladungsvolumens wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Es folgte die magnetische Separation von maximal 1×10^8 Zellen mittels einer LS-Säule, welche in den MACS-Separatoren eingesetzt und zur Äquilibration mit 1 ml MACS-Puffer gespült worden war.

Das Sediment der zu separierenden Zellfraktion wurde in 3 ml MACS-Puffer für 1×10^9 Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Schritten auf die Säule geladen. Die LS-Säule wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Durchlauf, der in einem frischen 15 ml Röhrchen gesammelt wurde, befanden sich die dnTZ welche anschließend gezählt und auf die benötigte Zellzahl eingestellt wurden. Das Gemisch aus markierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden von der Säule eluiert, ebenfalls gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Zellen wurden bis zum adoptiven Transfer bzw. der weiteren Verwendung auf Eis verwahrt.

II.2.2.15. Markierung von Immunzellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Als Alternative zum Einbau radioaktiven Thymidins wurden T-Zellen zur Messung der proliferatorischen Kapazität im Suppressionstest (siehe II.2.2.16) mit dem fluoreszierenden Stoff CFSE inkubiert. CFSE bindet kovalent über Succinimidyl-Gruppen an intrazelluläre Proteine. Dadurch, dass sich die Menge des anhaftenden

CFSE bei jeder Zellteilung exakt halbiert auf die Tochterzellen verteilt, kann man anhand der anschließenden durchflusszytometrischen Auswertung des CFSE-Signals Rückschlüsse auf die erfolgte Proliferation markierter Zellen ziehen.

Durchführung:

Die zu markierenden T-Zellen wurden auf eine Zelldichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ in Waschmedium ohne FCS eingestellt. Der Zellsuspension wurden $1,5 \mu\text{M}$ CFSE zugesetzt und für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Anlagerung des CFSE an die Zellen durch sofortige Zugabe von $1/5$ des Volumens FCS verlangsamt. Es wurden daraufhin 10 ml Waschmedium mit 2% FCS zugegeben und die Zellen wurden dann zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit je 14 ml Waschmedium mit 2% FCS wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und konnten in der gewünschten Zellzahl für weitere in vitro Tests eingesetzt werden.

II.2.2.16. OVA- spezifischer Suppressionstest

In einem syngenem in vitro Kokultursystem sollte die direkte suppressive Kapazität von ex vivo isolierten T-Zellen aus hochdosig sensibilisierten Tieren auf OVA-TZR transgene T-Zellen aus DO11.10.-Tieren getestet werden. Dazu wurden OVA-spezifische T-Zellen mit der MACS-Technologie (siehe II.2.14) aus Milzzellen von naiven DO11.10-Mäusen aufgereinigt, mit CFSE markiert (siehe II.2.2.15) und anschließend mit OVA-Peptid beladenen Milzzellen als APZ (siehe II.2.2.16.1) aus naiven BALB/c-Mäusen kultiviert. Zu diesen Kokulturen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen potentiell regulatorische T-Zellen zugegeben, die aus niedrig bzw. hochdosig sensibilisierten Tieren mit Hilfe der MACS-Technologie separiert worden waren. Nach 2 Tagen Kulturdauer wurde im FACS die Proliferation der CFSE-markierten T-Zellen gemessen. Als Kontrollen dienen Ansätze in denen APZ eingesetzt wurden, die nicht mit OVA-Peptid beladen wurden, sowie eine Kontrolle in der CFSE-beladene T-Zellen polyklonal über die Stimulation mit plattengebundenem Anti-CD3 und löslichem Anti-CD28 aktiviert wurden.

II.2.2.16.1. Beladen von Milzzellen mit OVA-Peptid

Milzzellen aus naiven BALB/c-Mäusen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 /ml eingestellt. Den Milzzellen wurde $5 \mu\text{g/ml}$ OVA³²³⁻³³⁹-Peptid zugesetzt (OVA beladene APZ). Einem Teil der Milzzellen wurde kein Peptid zugesetzt, sie dienten später als Kontrolle für unbeladene APZ. Nach einer vierstündigen Inkubation der Ansätze mit und ohne Peptid im Brutschrank (37°C , 10% CO_2) wurden die Milzzellen zweimal mit jeweils 15 ml Waschmedium gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in Testmedium bis zum Einsatz im Test auf Eis gelagert.

II.2.2.16.2. Ansetzen der Kokultur

Während der vierstündigen Inkubationszeit für die Beladung der Milzzellen mit OVA-Peptid wurden mithilfe der MACS-Technologie T-Zellen aufgereinigt. Dazu wurden wie unter II.2.2.14.2 beschrieben, Pan T-Zellen aus DO11.10-Tieren isoliert und wie unter II.2.2.15 beschrieben mit CFSE markiert (Effektoren). Des Weiteren wurden mit Hilfe des MACS PAN T-Zell Isolations-Kit der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (II.2.2.14.2) unmarkierte Pan T-Zellen aus LD und HD-Mäusen isoliert (Regulatoren). Die Regulatoren wurden auf eine Zellzahl von 2×10^6 / ml eingestellt und $100 \mu\text{l}$ in die ersten 6 Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Rundboden pipettiert. In die folgenden 6 Vertiefungen wurde über 3 Reihen $50 \mu\text{l}$ Testmedium vorgelegt. Die Regulatoren wurden nun mit der Mehrkanalpipette in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ im Verhältnis 1:2 über 3 Stufen seriell verdünnt. Nach der Titration befanden sich 1×10^5 Regulatoren in den ersten 6 Vertiefungen. Diese Zahl halbierte sich über die 3 Stufen der Titration (10×10^4 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$, $1,25 \times 10^4$). Den bereits vorliegenden Regulatoren wurden in zwei weiteren Schritten 5×10^4 CFSE-marierte Effektoren (1×10^6 /ml) in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$, sowie 5×10^4 OVA-beladene Milzzellen (1×10^6 /ml) in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ zugesetzt. Das Verhältnis von Effektoren zu APZ im Test betrug somit durchgängig 1:1, wohingegen sich das Verhältnis von Regulatoren zu Effektoren über die Titrationen veränderte (2:1, 1:1, 1:2 und 1:4). Zusätzlich zu den Ansätzen mit Regulatoren wurden

Kokulturen angelegt, die keine Regulatoren enthielten und somit als Positivkontrolle der Effektor-Proliferation dienten. Dafür wurden nicht mit CFSE-markierte Effektoren in einfacher (5×10^4) bzw. doppelter Zahl (1×10^5) mit APZ kultiviert, um einen Dichteeffekt durch fehlende Regulatoren auszuschließen. Außerdem wurden zur Testung der OVA-Spezifität des Testsystems Ansätze pipettiert, in denen Effektoren in einfacher und doppelter Zellzahl mit unbeladenen APZ kultiviert wurden (Negativkontrolle).

II.2.3. Statistik

Die Darstellung der Daten, sowohl statistisch wie auch graphisch, erfolgte mithilfe des Programms Sigmaplot 2.0 Version 7. Ein ungepaarter Student-t-Test wurde zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p < 0,001$) verwendet und die Unterschiede entsprechend durch die Symbole Kreuze, Sterne, Gitter oder Paragraphen gekennzeichnet.

III. Ergebnisse

III.1. Analyse der antigendosis-abhängigen Regulation der IgE-Produktion nach adjuvansfreier subkutaner Applikation von KLH

Dass die Antigendosis ein entscheidender Faktor für die Ausbildung einer Typ 1 Allergie ist, haben die Arbeitsgruppe um Professor Dr. Kölsch in Münster bereits vor einigen Jahren gezeigt. Die Wissenschaftler führten Immunisierungen mit dem Modellantigen Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) und dem Hauptallergen aus dem Bienengift, Phospholipase A2 (PLA₂) durch und testeten den Einfluss der Antigendosis auf die Auslösung der humoralen Immunantwort. Sie zeigten, dass die intraperitoneale Injektion von niedrigen Antigendosen, adsorbiert an das Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum), zur Induktion einer effektiven IgE-Immunantwort führt, während die Applikation hoher Antigendosen nur eine geringere IgE-Produktion hervorruft (152). Es ist mittlerweile bekannt, dass es während der SIT nach therapeutischer Applikation von hohen Allergendosen zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) und der Verschiebung der TH2-Balance in TH1-Richtung kommt (9). 1998 konnte in murinen Studien gezeigt werden, dass die antigendosis-abhängige Regulation von IgE-vermittelten Immunantworten nicht von einer Polarisation der induzierten T-Zellantwort in TH1-Richtung abhängig ist (98). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte aus diesem Grunde die Rolle von Treg in dem von Sudowe et al. beschriebenen Modell der antigendosis-abhängigen Regulation von IgE-Antworten. Es konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer Applikation von hohen Dosen KLH adsorbiert an Alum konventionelle Treg keine Rolle spielen, es kommt vielmehr zu einer Induktion von inhibitorischen CD4-CD8⁻ doppelt-negativen T-Zellen (dnT-Zellen) (99). Die adjuvante Wirkung von Aluminiumkomponenten wurde erstmals 1921 von Glenny et al. beschrieben (153). Seitdem ist Alum ein vielfach eingesetztes Adjuvant, das aufgrund seiner immunstimulatorischen Wirkung in Mausmodellen und auch bei Impfungen angewandt wird. Die starke adjuvante Wirkung von Alum in TH2-vermittelten Mausmodellen im Hinblick auf die Beeinflussung von dendritischen Zellen oder die Wirkung auf den Isotypklassenwechsel von B-Zellen wird von vielen Arbeitsgruppen kritisch gesehen (78, 154, 155). Die Verwendung von Alum zur Analyse der Regulation antigenspezifischer Immunantworten in Mausmodellen ist zudem wegen seiner starken

antigenunabhängigen Effekte wie zum Beispiel die Wirkung über IL-1 β und das Inflammasom (NALP3) (78, 156) umstritten.

In Anlehnung an das Desensibilisierungsprotokoll, welches bei der Durchführung der SIT zur Behandlung allergischer Patienten genutzt wird, wurde deshalb im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine alternative Immunisierungsstrategie verwendet, bei der auch ohne Einsatz eines Adjuvans potente antigenspezifische Immunantworten ausgelöst werden (157). Die Immunisierung erfolgte hierbei durch mehrfache subkutane Injektionen des Antigens.

III.1.1. Analyse der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigen Dosen

Die Sensibilisierung der Mäuse erfolgte im wöchentlichen Abstand durch subkutane Injektion des in PBS gelösten Antigens KLH in das Nackenfell der Tiere. Es wurden unterschiedliche Dosen des Antigens getestet (0,1 μ g, 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g und 1000 μ g). Den Tieren wurde sechs Tage nach jeder Immunisierung Blut entnommen und der KLH-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a- Gehalt in den Seren der Tiere wurde mittels ELISA bestimmt.

Mit steigender Zahl der KLH-Injektionen nahm auch die Menge der IgE-Antikörper in den Seren der immunisierten Tiere deutlich zu (Abb. 1.1). Während in den mit 0,1 μ g KLH sensibilisierten Tieren die stärkste Produktion von IgE-Antikörpern beobachtet wurde, nahm diese mit steigenden Sensibilisierungsdosen sukzessive ab und war in der Gruppe der Mäuse, die mit der höchsten Dosis (1000 μ g KLH) immunisiert wurden, kaum noch detektierbar.

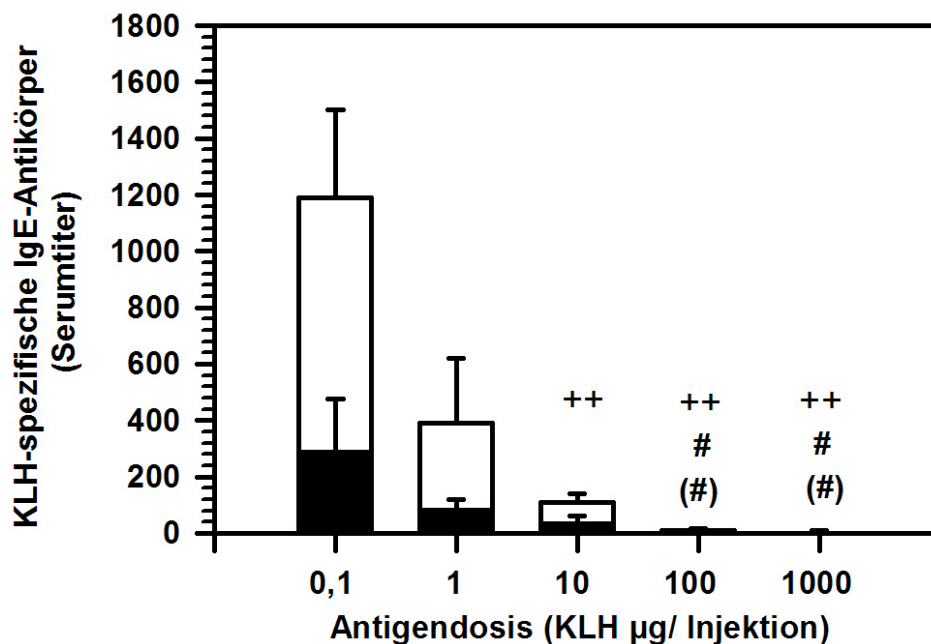


Abb. 1.1 Produktion von antigenspezifischen IgE-Antikörpern nach subkutaner Sensibilisierung mit unterschiedlichen Dosen KLH

BALB/cJ-Mäuse wurden wiederholt im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Antigens KLH subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der dritten (schwarze Balken) bzw. sechsten (weiße Balken) Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt der KLH-spezifischen IgE-Antikörper in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der IgE-Titer als Mittelwerte \pm SD von individuellen Mäusen ($n=6$ pro Gruppe), erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Kreuze markieren signifikante Unterschiede zu Tieren, die mit $0,1 \mu\text{g}$ KLH immunisiert wurden ($^{++}p<0,01$) und Rauten kennzeichnen Unterschiede zu den mit $1 \mu\text{g}$ KLH immunisierten Tieren ($^{\#}p<0,05$). Die Symbole in den Klammern beziehen sich auf den Vergleich nach der dritten. Sensibilisierung.

Das Ausmaß der Produktion antigenspezifischer IgG1- und IgG2a- Antikörper nach der sechsten Sensibilisierung verläuft hingegen entgegengesetzt zur IgE-Produktion, da in den Seren der niedrigdosig immunisierten Versuchstiere, die eine starke Induktion von KLH-spezifischem IgE aufwiesen, im Vergleich weniger IgG1- bzw. IgG2a- Antikörper detektiert wurden als in den mit den höheren KLH-Dosen sensibilisierten Tieren (Abb. 1.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die subkutane Sensibilisierung mit niedrigen Dosen ($0,1 \mu\text{g}$ und $1 \mu\text{g}$) KLH ohne Adjuvans zu einer effektiven Produktion von IgE-Antikörpern führt, wohingegen die Sensibilisierung mit hohen Dosen ($100 \mu\text{g}$ und $1000 \mu\text{g}$) nur eine marginale Produktion von IgE zur Folge hat. Im Gegenzug kam es in den hochdosig immunisierten Tieren zu einer starken Induktion der IgG1- und IgG2a-Produktion.

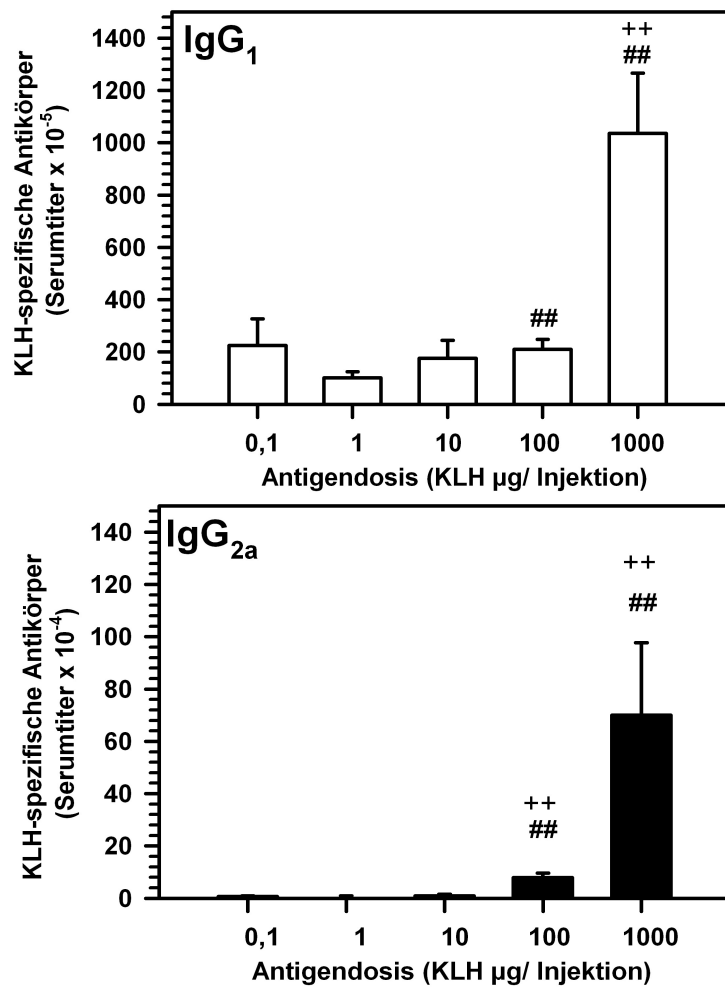


Abb. 1.2 Antigendosis-abhängige Produktion von antigenspezifischen IgG-Antikörpern nach subkutaner Sensibilisierung

BALB/cJ-Mäuse wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Antigens KLH subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt der KLH-spezifischen IgG₁- bzw. IgG_{2a}-Antikörper in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die IgG₁- und IgG_{2a}-Titer als Mittelwerte ± SD von individuellen Mäusen (n=3 pro Gruppe), die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit insgesamt 6 Tieren. Kreuze markieren signifikante Unterschiede zu Tieren, die mit 0,1 µg KLH immunisiert wurden (**p<0,01). Rauten kennzeichnen Unterschiede zu Tieren, die mit 1 µg KLH immunisiert wurden (##p<0,01).

Es ist denkbar, dass die starke Induktion von IgG1 bzw. IgG2a produzierenden Zellen infolge der subkutanen Sensibilisierung in einem kompetitiven Nachweissystem wie dem ELISA zu Detektionsproblemen der schwächer produzierten Isotypen wie dem IgE führen kann. Im ELISA konkurrieren alle antigenspezifischen Antikörper um die Bindung des plattengebundenen Antigens. Je mehr antigenspezifische IgG1- und IgG2a-Antikörper sich in den Proben befinden, desto größer ist die Möglichkeit, dass diese die Detektion des weniger frequenten IgE behindern kann. Dieses Phänomen der kompetitiven Hemmung im ELISA wird auch als Hook-Effekt bezeichnet (158). Um

auszuschließen, dass die geringere Induktion von IgE-Antikörpern, die nach hochdosiger Immunisierung im ELISA gemessen wurde, dem Hook-Effekt geschuldet war, wurden die Unterschiede im IgE-Gehalt der Seren mithilfe des RBL-Tests funktionell verifiziert (II.2.2.7). Dazu wurden Zellen der Granulozyten-Zelllinie RBL-2H3 mit dem Serum der immunisierten Versuchstiere inkubiert. Während dieser Zeit binden die IgE-Antikörper im Serum an hochaffine FcεRI-Rezeptoren auf der Oberfläche der Granulozyten. Die anschließende Inkubation der IgE-beladenen RBL-Zellen mit dem Antigen führt durch eine Kreuzvernetzung der FcεRI-Rezeptoren zur Degranulation der Zellen. Die Zellen setzen dabei den Mediator β-Hexosaminidase (β-Hex) frei, der im Anschluss im Kulturüberstand photometrisch quantifiziert wird und dessen Menge damit indirekt Auskunft über die Menge an gebundenem IgE gibt. Die Menge des freigesetzten β-Hex wird dazu prozentual zum Gesamt-β-Hex-Gehalt der Zellkultur ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurden RBL-2H3-Zellen ohne Serum inkubiert, um die Menge des freigesetzten β-Hex zu bestimmen, die durch den Antigenstimulus allein freigesetzt wurde. Außerdem wurden Zellen mit dem Ionophor A23187 und dem Phorbolster PMA inkubiert, was in einer unspezifischen und maximalen Freisetzung des β-Hex aus den Zellen resultierte.

In der Abbildung 1.3 sind die Ergebnisse des RBL-Tests dargestellt. Es handelt sich dabei um dieselben Seren, deren IgE-Gehalt zuvor im ELISA bestimmt wurde.

Die Maximalfreisetzung der β-Hex aus den RBL-2H3-Zellen, induziert durch die Inkubation mit A23187 und PMA, betrug 59 %. Unstimulierte RBL-2H3-Zellen, die ohne Zugabe von Serum inkubiert wurden, wiesen eine geringe Spontanfreisetzung der β-Hex von lediglich ca. 4 % auf. Die Inkubation der RBL-2H3-Zellen mit Seren aus Tieren, die mit niedrigen KLH-Dosen immunisiert worden waren, resultierte in einer signifikanten Freisetzung von β-Hex nach Zugabe des Antigens KLH zu der Kultur. Die antigenspezifische Degranulation der RBL-2H3-Zellen war am effektivsten, wenn die Zellen mit den Seren derjenigen Tiere inkubiert wurden, die zuvor mit der niedrigsten Dosis KLH (0,1 µg KLH) sensibilisiert worden waren. Im Gegensatz dazu wurde durch die Inkubation der RBL-2H3-Zellen mit Seren der Mäuse, die mit hohen KLH-Dosen immunisiert worden waren, keine (100 µg KLH) oder nur eine sehr schwache (1000 µg KLH) antigenspezifische Degranulation der RBL-2H3-Zellen induziert.

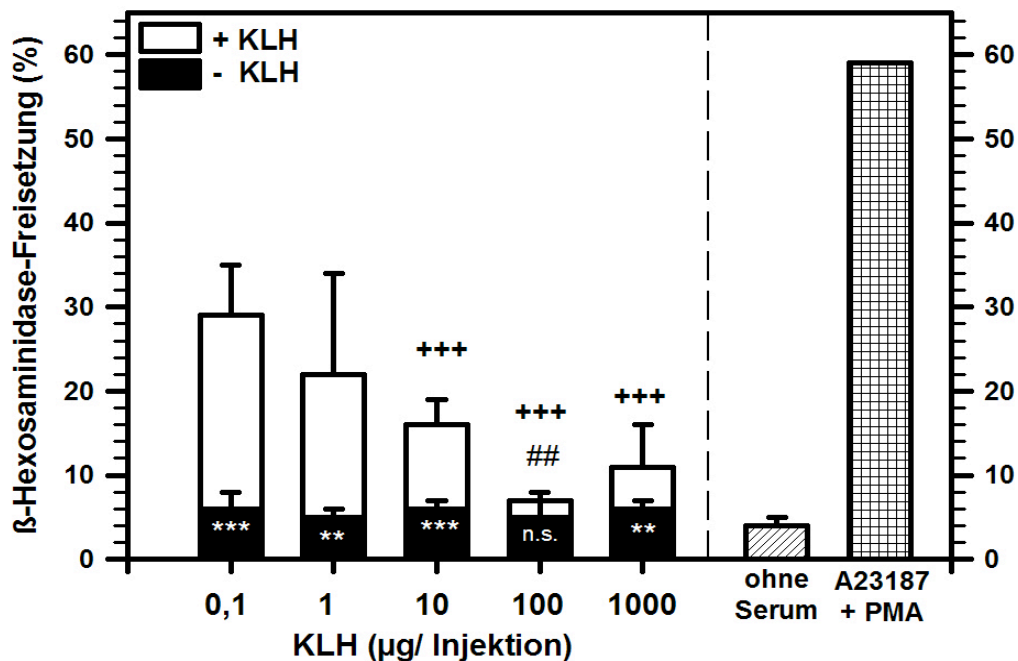


Abb. 1.3 Funktionelle Bestimmung von antigenspezifischen IgE-Antikörpern im Serum subkutan mit KLH sensibilisierter Mäuse

BALB/c-Mäuse wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Antigens KLH subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und Serum gewonnen. RBL-2H3-Zellen wurden wie aufgeführt mit den Seren der Tiere inkubiert bzw. unbehandelt (schraffierter Balken) belassen. Anschließend wurden die Zellen mit (weiße Balken) bzw. ohne (schwarze Balken) 1 µg KLH/ 100 µl stimuliert. Zusätzlich wurden zur maximalen Stimulation der RBL-2H3-Zellen Kulturen mit A23178 + PMA inkubiert (kariert Balken). Im Anschluss wird die Freisetzung von β-Hexosaminidase in das Kulturmedium durch aktivierte RBL-2H3-Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der β-Hex-Freisetzung ± SD durch individuelle Seren (n=6), erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und mit KLH stimulierten Ansätzen (**p<0,001). Unterschiede in der β-Hex-Freisetzung durch Seren von sensibilisierten Tieren werden durch Kreuze (vs. 0,1 µg KLH, *p<0,05, **p<0,01) bzw. Rauten (vs. 1 µg KLH, ###p<0,001) gekennzeichnet.

Das Ergebnis des RBL-Tests bestätigte die zuvor anhand der ELISA-Daten implizierte Antigendosis-abhängige Regulation der IgE-Produktion. Die subkutane Immunisierung mit niedrigen Dosen KLH (0,1 µg und 1 µg) führte zu einer starken Produktion von IgE-Antikörpern, die im Serum der Tiere nicht nur anhand hoher Antikörpertiter quantifiziert, sondern auch auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden können. Im Serum der Tiere hingegen, die mit hohen Dosen KLH (100 µg und 1000 µg) immunisiert worden waren, ließen sich sowohl im ELISA als auch im Funktionstest nur geringe Mengen an IgE nachweisen.

III.1.2. Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit hohen Antigendosen auf die Induktion einer nachfolgenden IgE-Immunantwort

Um zu testen, ob das Fehlen der IgE-Produktion in den mit 100 µg KLH s.c. behandelten Tieren (K100) durch einen aktiven regulatorischen Mechanismus bedingt ist, der auch eine nachgeschaltete IgE-Induktion inhibieren kann, wurden Versuche über einen Zeitraum von 10 Sensibilisierungen durchgeführt. Die subkutane Applikation von hohen Antigendosen führte, wie bereits gezeigt wurde, zu einer geringeren Produktion von funktionellem IgE. Es wurden in zwei Phasen wöchentliche Immunisierungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Experiment konzipiert, in dem die Versuchsmäuse zunächst in einer initialen Phase mit fünf wöchentlichen Injektionen hoher KLH-Dosen (100 µg; K100) immunisiert wurden (siehe Abb. 1.4 oben). Am Ende dieser Phase wurde den Mäusen Blut entnommen und der Gehalt an IgE-Antikörpern im Serum wurde kontrolliert: wie zuvor beschrieben wiesen diese Tiere nur sehr geringe IgE-Titer auf (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurden diese Tiere dann in einer zweiten Phase nicht weiter behandelt oder mit der hohen KLH-Dosis von 100 µg KLH bzw. alternativ mit einer niedrigen Dosis von 0,1 µg KLH (K01) immunisiert. Der Verlauf der KLH-spezifischen IgE-Produktion in den Versuchstieren während der zweiten Phase ist in Abb. 1.4 ebenfalls dokumentiert. Zudem sind dort die IgE-Titer von Kontrolltieren dargestellt, die parallel lediglich in der zweiten Phase mit den verschiedenen KLH-Dosen sensibilisiert wurden (Kontrollen).

Während die Immunisierung mit niedrigen Dosen KLH bei den K01-Kontrolltieren zu einem erheblichen Anstieg der KLH-spezifischem IgE-Titer führte, war die IgE-Produktion in den Tieren, die in der initialen Phase mit hohen KLH-Dosen immunisiert worden waren, nach der Applikation niedriger Dosen deutlich inhibiert. Bei dem Fehlen der IgE-Produktion in den K100-Mäusen handelt es sich demnach nicht einfach nur um eine fehlende Aktivierung von B-Zellen, sondern es wird vielmehr ein Suppressionsmechanismus in Gang gesetzt, der aktiv eine nachfolgende Induktion IgE produzierender B-Zellen verhindert.

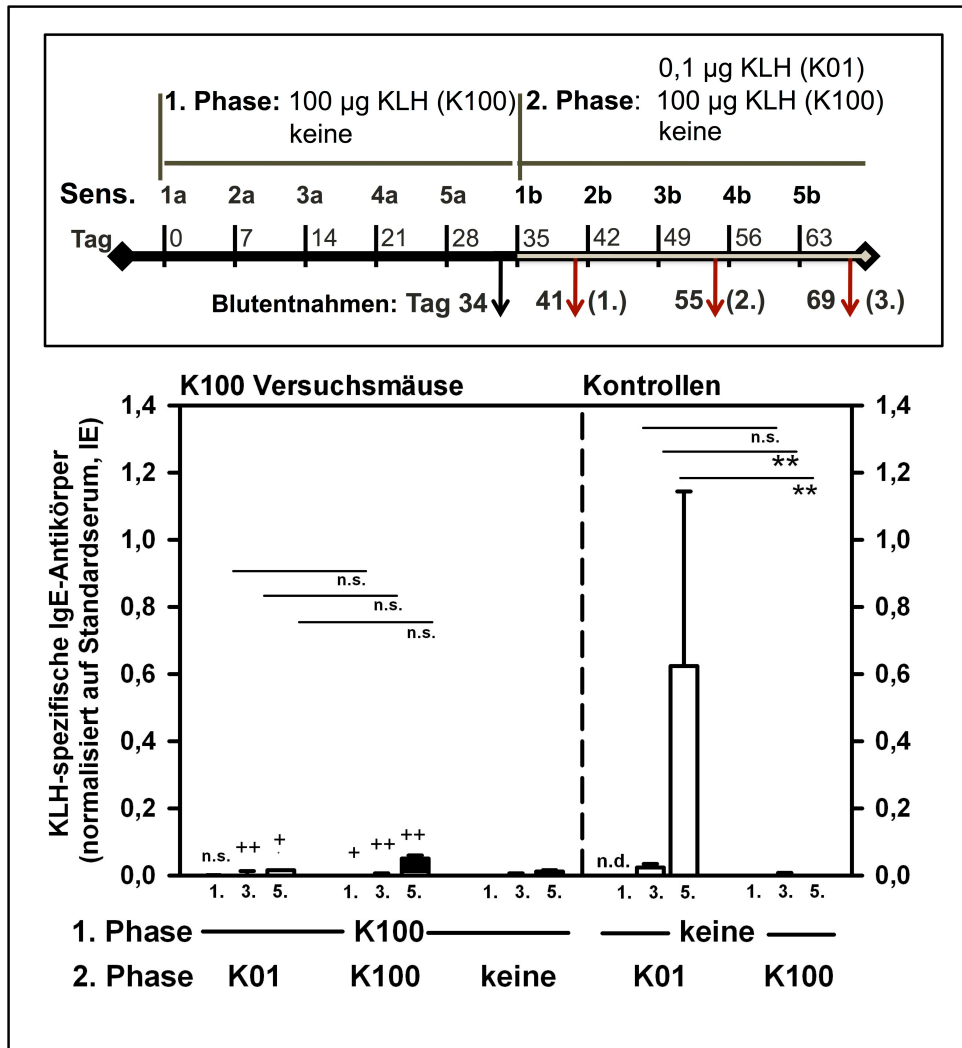


Abb. 1.4 Einfluss einer prophylaktischen Immunisierung mit hohen KLH-Dosen auf die Induktion einer nachfolgenden IgE-Immunantwort.

BALB/c Mäuse wurden fünfmal repetitiv im wöchentlichen Abstand (Immunisierung 1a bis 5a) mit 100 µg KLH subkutan sensibilisiert (K100-Versuchsmäuse). Nach der 5. Sensibilisierung wurde der Gehalt des KLH-spezifischen IgE im Serum der Tiere bestimmt und die Tiere wurden in drei Gruppen mit vergleichbarem mittlerem IgE-Gehalt eingeteilt. Eine Woche nach der initialen Sensibilisierungsphase wurden die K100-Versuchsmäuse sowie naive Kontrolltiere fünfmal (Immunisierung 1b bis 5b) subkutan mit 0,1 µg KLH (weiße Balken) oder 100 µg KLH s.c. (schwarze Balken) immunisiert. Eine dritte Gruppe der K100-Mäuse wurde nicht weiter sensibilisiert (schraffierte Balken). Allen Tieren wurde in der zweiten Versuchsphase nach der 1., 3. und 5. Sensibilisierung Blut entnommen und die Konzentration der KLH-spezifischen IgE-Antikörper im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Entwicklung der relativen Serumtiters der K100-Versuchsmäuse während der zweiten Versuchsphase dargestellt, auf der rechten Seite sind die Serumtiters der Kontrolltiere ohne initiale Immunisierungsphase dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittels eines Standardserums normierten Mittelwerte ± SD der IgE-Titer individueller Mäuse (n=4 Tiere pro Gruppe) aus einem Experiment. Signifikante Unterschiede der K01- bzw. K100-Versuchsmäuse (2.Phase) zu den jeweiligen Kontrolltieren sind mit Kreuzen gekennzeichnet (*p<0,05, **p<0,01). Die Unterschiede von K01- und K100-Versuchsmäusen zu den K100-Kontrolltieren waren nicht signifikant. Sterne geben Signifikanz zwischen den Kontrolltieren an (**p<0,01). Abk.: n.s. = nicht signifikant, n.d. = nicht detektierbar.

III.1.3. Effekt einer therapeutischen Immunisierung mit hohen Antigen Dosen auf eine bereits etablierte IgE-Antwort

Ziel der vorliegenden Versuche war es zu analysieren inwieweit sich die prophylaktische Applikation von hohen Dosen auf eine IgE-Immunität auswirken kann. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, kann durch die Immunisierung mit hohen KLH-Dosen die Induktion einer nachfolgenden IgE-Immunität effektiv verhindert werden. Daher wurde im Folgenden im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ 1 Allergie der Effekt der therapeutischen Applikation von hohen Antigen Dosen auf eine bereits bestehende IgE-Immunität untersucht. Dieses Therapiemodell weist interessante Parallelen zur klinischen Behandlung von Allergikern mittels der SIT auf, da im Zuge der SIT den Patienten nach einer Aufimmunisierungsphase ebenfalls hohe Dosen des relevanten Allergens verabreicht werden, um eine Toleranz gegen das Allergen auszulösen. Eine erfolgreiche Toleranzinduktion ist unter anderem gekennzeichnet durch eine langfristig verminderte Produktion von allergenspezifischem IgE in den Patienten.

Für dieses Experiment wurden die Versuchsmäuse zunächst in einer ersten Phase wiederholt mit 0,1 µg KLH immunisiert (K01-Mäuse), um eine deutliche IgE-Produktion in diesen Tieren zu induzieren (Abb. 1.5 oben). Tatsächlich wiesen diese Tiere hohe IgE-Titer auf (relativer mittlerer Serumtiter 0,07 IE, Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurden die K01-Mäuse dann entweder mit der niedrigen Dosis von 0,1 µg KLH weiterimmunisiert oder sie bekamen alternativ wiederholt die hohe KLH-Dosis von 100 µg KLH appliziert oder sie wurden nicht weiter behandelt. Zudem wurden die IgE-Titer von Kontrolltieren, die lediglich in der zweiten Phase mit den verschiedenen KLH-Dosen sensibilisiert wurden, bestimmt.

Der Verlauf der KLH-spezifischen IgE-Produktion in den Versuchs- und Kontrolltieren während der zweiten Phase ist in Abb. 1.5 unten dokumentiert. Über den Verlauf von weiteren fünf subkutanen Injektionen von 0,1 µg KLH stieg der mittlere IgE-Titer von ursprünglich 0,07 IE auf 0,275 IE an. K01-Kontrollmäuse wiesen ebenfalls eine starke Induktion von IgE-Antikörpern auf (0,623 IE). Infolge der Immunisierung der K01-Mäuse mit 100 µg KLH kam es zunächst zu einer raschen und sehr starken Zunahme der KLH-spezifischen IgE im Serum der Tiere.

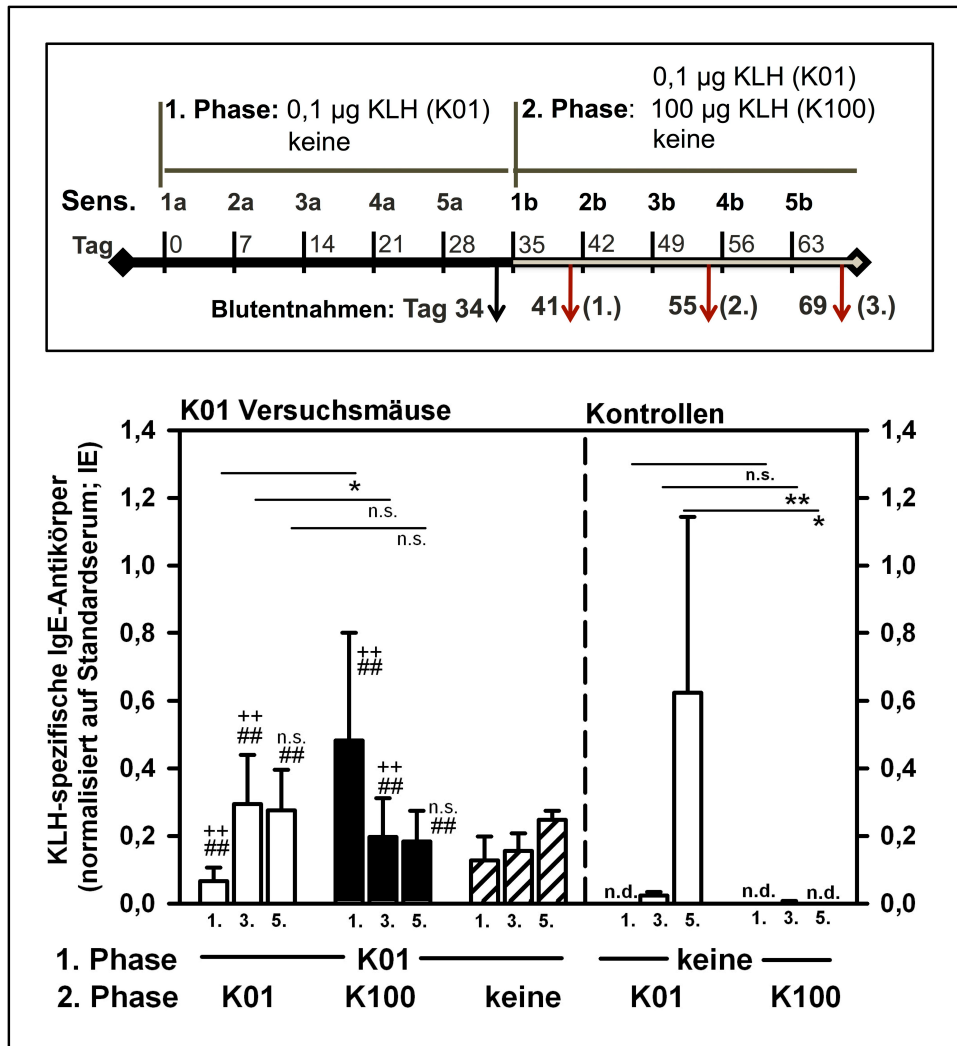


Abb. 1.5 Einfluss einer therapeutischen Immunisierung mit hohen Antigenosen auf eine bereits etablierte IgE-Produktion

BALB/c-Versuchsmäuse wurden fünfmal repetitiv im wöchentlichen Abstand (Immunisierung 1a bis 5a) mit 0,1 µg KLH subkutan sensibilisiert (K01-Mäuse). Nach der 5. Sensibilisierung wurde der Gehalt des KLH-spezifischen IgE im Serum der Tiere bestimmt und die Tiere wurden in drei Gruppen mit vergleichbarem mittlerem IgE-Gehalt eingeteilt. Eine Woche nach der initialen Sensibilisierungsphase wurden die K01-Versuchsmäuse sowie naive Kontrolltiere fünfmal (Immunisierung 1b bis 5b) subkutan mit 0,1 µg KLH (weiße Balken) oder 100 µg KLH s.c (schwarze Balken) immunisiert. Eine dritte Gruppe der K01-Versuchsmäuse wurde nicht weiter sensibilisiert (schraffierte Balken). Allen Tieren wurde in der zweiten Versuchsphase nach der 1., 3. und 5. Sensibilisierung Blut entnommen und die Konzentration der KLH-spezifischen IgE-Antikörper im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Entwicklung der relativen Serumentiter der K01-Versuchsmäuse während der zweiten Versuchsphase dargestellt, auf der rechten Seite sind die Serumentiter der Kontrolltiere ohne initiale Immunisierungsphase dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittels eines Standardserums normierten Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer individueller Mäuse (n=4 Tiere pro Gruppe) aus einem Experiment. Signifikante Unterschiede der K01- bzw K100-Versuchsmäuse (2.Phase) zu den K01-Kontrolltieren sind mit Kreuzen (**p=0,01) zu den K100-Kontrolltieren mit Rauten (##p=0,01) gekennzeichnet. Sterne geben Signifikanzen zwischen den markierten Gruppen an (*p=0,05, **p=0,01). Abk.: n.s. = nicht signifikant, n.d.= nicht detektierbar.

Im Lauf der weiteren Immunisierung mit hohen Dosen nahm die IgE-Produktion allerdings deutlich ab, die IgE-Titer lagen nach der 5. Immunisierung bei durchschnittlich 0,184 IE und damit unterhalb der IgE-Titer von Tieren, die in der zweiten Phase mit 0,1 µg KLH (0,275 IE) oder aber nicht weiter (0,247 IE)

sensibilisiert worden waren. Allerdings konnte die IgE-Produktion in den K01-Versuchstieren durch die nachfolgende Immunisierung mit hohen Dosen nicht auf das Niveau der K100-Kontrolltiere, für die nur marginale IgE-Titer (0,004 IE) bestimmt wurden, reduziert werden.

Die Daten der therapeutischen Immunisierung mit hohen Dosen implizieren demnach, dass es in diesem Modell in Analogie zum Geschehen während der SIT zunächst zu einer Aktivierung von aufgrund der Sensibilisierung gebildeten IgE exprimierenden B-Zellen und damit zu einer Zunahme der allergenspezifischen IgE-Produktion kommt, im weiteren Verlauf der Immunisierung aber durch die Applikation der hohen Dosen ein Suppressionsmechanismus aktiviert wird, der zur deutlichen Reduktion der IgE-Titer führt.

III.2. Analyse der Antigenosis-abhängigen Regulation der IgE-Produktion nach subkutaner Applikation des Modellallergens Ovalbumin (OVA)

Bei dem in den bisherigen Studien verwendeten Modellantigen KLH handelt es sich um ein sehr immunogenes Molekül, allerdings stellt KLH kein klinisch relevantes Allergen dar. Um zu untersuchen, ob die Schlussfolgerungen, die aus den Experimenten mit KLH gezogen wurden, auch für ein klinisch relevantes Allergen Gültigkeit besitzen, wurden zur Bestätigung der Ergebnisse im Folgenden Analysen mit Ovalbumin (OVA), einem Allergen aus dem Hühnereiweiß und etablierten Modellantigen, durchgeführt. In diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob die spezifische IgE-Antwort nach subkutaner Applikation von OVA ebenfalls antigenosisabhängig reguliert ist. Außerdem sollte untersucht werden inwiefern die bereits von Barwig et al. (2010) nach intraperitonealer Applikation von hohen KLH-Dosen beschriebenen CD4-CD8- doppelt-negativen Suppressor-T-Zellen, auch bei der Regulation im Modell der subkutanen Applikation von OVA eine Rolle spielen (99).

III.2.1. Analyse der Produktion von IgE- und IgG-Antikörpern nach Immunisierung mit unterschiedlichen OVA-Dosen.

Zur Analyse der Abhängigkeit der IgE-Produktion von der Dosis des zur Sensibilisierung verwendeten OVA wurden den Versuchsmäusen repetitiv im wöchentlichen Abstand unterschiedliche Dosen des Allergens (0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg und 1000 µg) subkutan in das Nackenfell injiziert. Im Laufe der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Serumtiter der Antikörperisotypen IgE, IgG1 und IgG2a in den Seren der Tiere wurden mittels eines OVA-spezifischen ELISA bestimmt (Abb. 2.1).

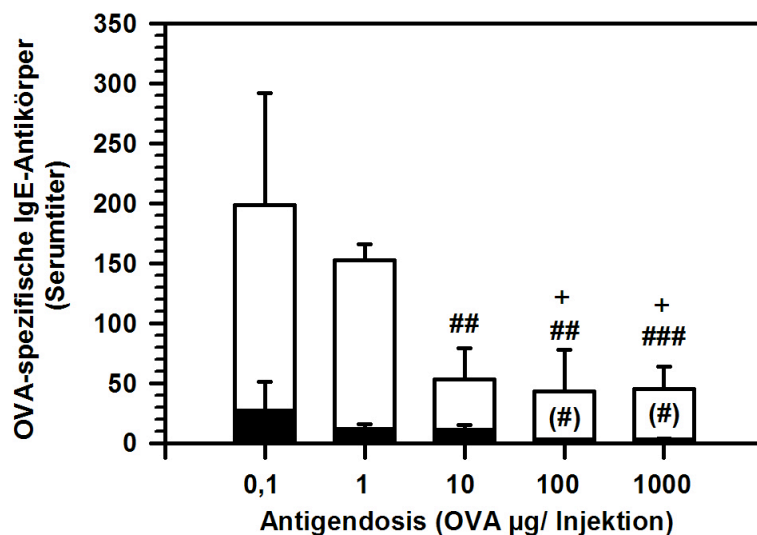


Abb. 2.1 Antigendosis-abhängige Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern nach subkutaner Sensibilisierung mit unterschiedlichen Dosen OVA

BALB/cJ-Mäuse wurden wiederholt im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Allergens OVA subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der dritten (schwarze Balken) bzw. sechsten (weiße Balken) Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt der OVA-spezifischen IgE-Antikörper in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der IgE-Titer als Mittelwerte \pm SD von individuellen Mäusen ($n=6$ pro Gruppe), erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Kreuze markieren signifikante Unterschiede zu Tieren, die mit 0,1 µg OVA immunisiert wurden ($*p<0,01$) und Rauten kennzeichnen Unterschiede zu den mit 1 µg OVA immunisierten Tieren ($#p<0,05$, $##p<0,01$, $###p<0,001$). Die Symbole in den Klammern beziehen sich auf den Vergleich nach der dritten Sensibilisierung.

Die wiederholte Gabe von OVA führte über den Zeitraum von sechs Immunisierungen zu einer effektiven Induktion von IgE-Antikörpern im Serum der Mäuse. Die Produktion von IgE-Antikörpern war am stärksten in Tieren, die mit 0,1 µg OVA immunisiert wurden (Abb 2.1). Die Steigerung der zur Immunisierung verwendeten OVA-Dosis führte sukzessive zu einer Abnahme der Produktion von OVA-spezifischem IgE; die Sensibilisierung mit 100 µg oder 1000 µg OVA hatte im Vergleich zu den mit

0,1 µg OVA immunisierten Mäusen signifikant niedrigere IgE-Titer in den Seren dieser Tiere zur Folge.

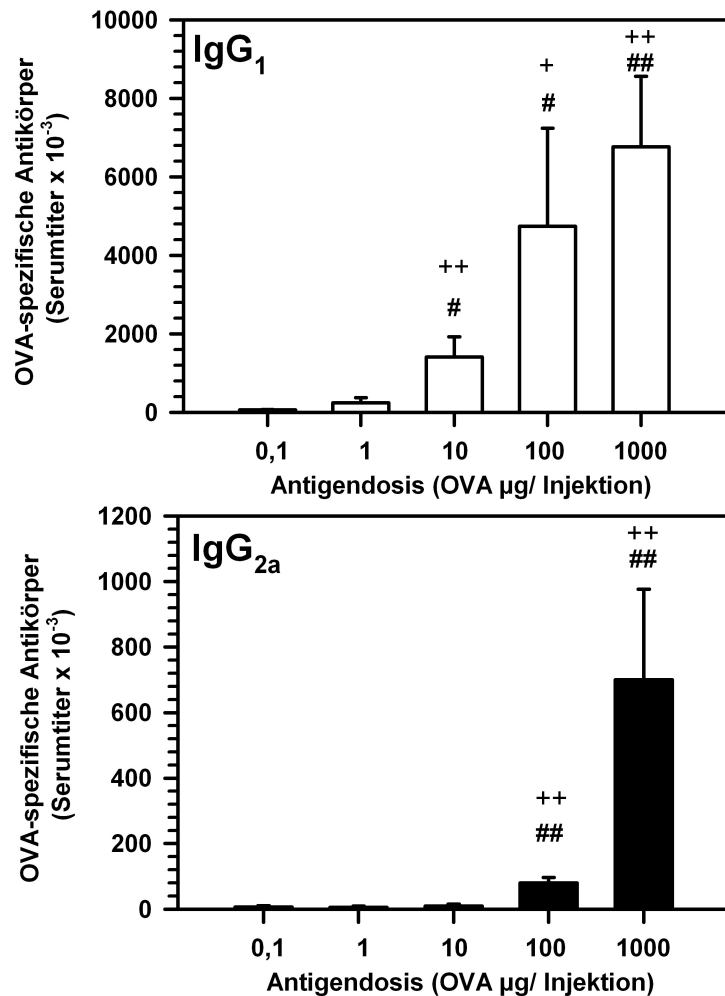


Abb. 2.2 Antigendosis-abhängige Regulation der Produktion von spezifischen IgG-Subklassen nach subkutaner Sensibilisierung mit dem Allergen OVA

BALB/cJ-Mäuse wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Allergens OVA subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt des OVA-spezifischen IgG₁ bzw. IgG_{2a} in den Seren wurde mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der Serumtiter als Mittelwerte ± SD von individuellen Mäusen (n=3 pro Gruppe) aus zwei (IgG₁) bzw. einem (IgG_{2a}) Experiment. Kreuze markieren signifikante Unterschiede zu Tieren, die mit 0,1 µg OVA immunisiert wurden (⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,01) und Rauten kennzeichnen Unterschiede zu den mit 1 µg OVA immunisierten Tieren ([#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001).

Die Immunisierung mit OVA induzierte eine deutlich höhere Produktion von IgG1-Antikörpern als von IgE-Antikörpern. Im Vergleich zum IgE unterlag die Bildung der IgG1-Antikörper jedoch einer reziproken Regulation: die subkutane Immunisierung mit 0,1 µg bzw. 1 µg OVA führte zu signifikant geringeren OVA-spezifischen IgG1-Titern als die Immunisierung mit 100 oder 1000 µg OVA. Ähnlich verhielt es sich für die Produktion von IgG2a- Antikörpern. Es konnte nach Immunisierung mit hohen

Antigendosen jedoch mehr IgG1 als IgG2a detektiert werden, was für die Ausbildung einer TH2-Antwort und gegen eine TH1-Polarisation nach Applikation von hohen Antigendosen spricht (Abb. 2.2).

Wie schon für die Bestimmung des KLH-spezifischen IgE beschrieben und um auszuschließen, dass im Überschuss vorhandene blockierende IgG-Antikörper den Nachweis von weniger frequentem IgE im ELISA erschweren, wurde die Abwesenheit spezifischer IgE-Antikörper in den Seren nach Immunisierung mit hohen OVA-Dosen mit Hilfe des bereits in Kapitel III.1 vorgestellten Degranulationstest verifiziert.

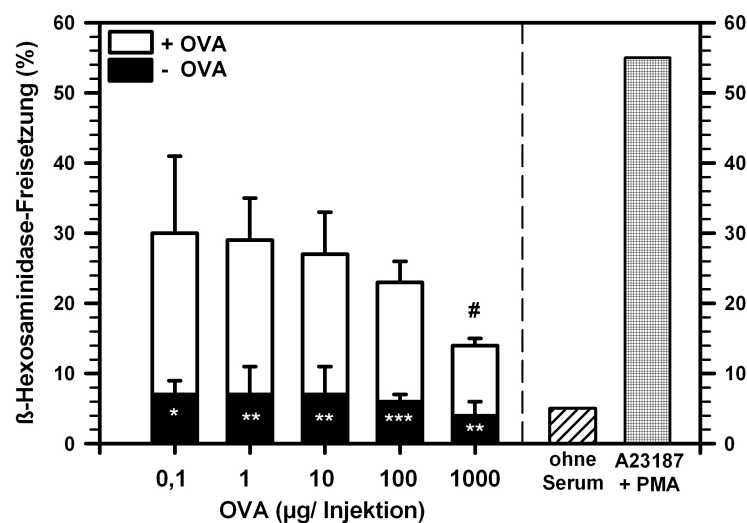


Abb. 2.3 Funktionelle Bestimmung von antigenspezifischen IgE-Antikörpern im Serum subkutan mit OVA sensibilisierter Mäuse

BALB/c-Mäuse wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Antigens OVA subkutan sensibilisiert. Sechs Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurde den Tieren Blut entnommen und Serum gewonnen. RBL-2H3-Zellen wurden wie aufgeführt mit den Seren der Tiere inkubiert bzw. unbehandelt (schraffierter Balken) belassen. Anschließend wurden die Zellen mit (weiße Balken) bzw. ohne (schwarze Balken) 30 µg OVA/100 µl stimuliert. Zusätzlich wurden zur maximalen Stimulation der RBL-2H3-Zellen Kulturen mit A23178 + PMA inkubiert (kariierter Balken). Im Anschluss wird die Freisetzung von β -Hexosaminidase in das Kulturmedium durch aktivierte RBL-2H3-Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der β -Hex-Freisetzung \pm SD durch individuelle Seren (n=6), erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und mit OVA stimulierten Ansätzen (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Unterschiede in der β -Hex-Freisetzung durch Seren von sensibilisierten Tieren werden durch Kreuze (vs. 0,1 µg OVA, *p<0,05, **p<0,01) bzw. Rauten (vs. 1 µg

Die maximale Freisetzung des Mediators β -Hex aus den RBL-2H3-Zellen, induziert durch die Inkubation der Zellen mit PMA und A23187, betrug 55% (Abb. 2.3). Kulturen von RBL-2H3-Zellen, die ohne Serum, aber mit dem Antigen inkubiert wurden, wiesen eine spontane Freisetzung von 5% β -Hex auf. In den Zellkulturen, die mit Serum von OVA-behandelten Tieren inkubiert wurden, wurde eine signifikante Freisetzung von β -Hex gemessen, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IgE-Bestimmung per

ELISA in der Gruppe der Tiere am größten war, die mit 0,1 µg OVA immunisiert worden waren (30%), während die Seren der Mäuse, denen mehrfach 1000 µg OVA injiziert worden war, die niedrigste β -Hex-Freisetzung aus den RBL-2H3-Zellen induzierten (14%).

Die Ergebnisse des RBL-2H3-Degranulationstests bestätigen also die Resultate der in Abbildung 2.1 dargestellten IgE-Bestimmung mittels ELISA und unterstützen die Annahme, dass die Immunisierung mit hohen OVA-Dosen zu einer verminderten Induktion von IgE in den Tieren führt.

Eine mögliche plausible Begründung für die Inhibition der IgE-Produktion nach Injektion hoher Antigendosen könnte auf der Kontamination der Antigenpräparationen mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, beruhen. Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass LPS die Ausbildung einer durch TH2-Zellen vermittelten Immunantwort und damit auch die Induktion der Produktion von IgE inhibieren kann. Kuipers et al. (2003) berichteten, dass die Stimulation von dendritischen Zellen mit LPS *in vitro* die Produktion von TH2-assoziierten Zytokinen zugunsten von TH1-Zytokinen durch interagierende CD4-T-Zellen reduziert (159). Weiterhin wurde in einem experimentellen Modell der allergischen Konjunktivitis durch die Gabe von LPS eine IgE-vermittelte konjunktivale Entzündung unterdrückt (160).

Die Verabreichung einer um den Faktor 1000 höheren Antigendosis hat auch eine entsprechend erhöhte Applikation von LPS zur Folge. Um zu untersuchen, ob das bei der Immunisierung verabreichte LPS einen Einfluss auf die Produktion von IgE-Antikörpern hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Mausstämme verwendet, die insensitiv für die Aktivität von LPS sind: Der C3H-Ursprungsstamm wurde 1920 von L. C. Strong aus einer Kreuzung von Bagg Albino Weibchen mit DBA Männchen und einer anschließenden Selektion für ein verstärktes Auftreten von viral (MMTV=mouse mammary tumor virus) induzierten Brusttumoren entwickelt. Heute erhältliche C3H-Stämme sind frei von MMTV. Eine spontane Mutation tauchte zwischen 1960 und 1968 im Toll-Like-Rezeptor 4-Genlocus (Tlr4lps) der C3H-Mäuse auf (149).

Dies macht den sogenannten C3H-HeJ(Tlr4Lps-d)-Stamm insensitiv für die Erkennung

von LPS. Zum Vergleich der Stärke der induzierten IgE-Produktion wurden die C3H-Mäuse mit BALB/c-Mäusen verglichen.

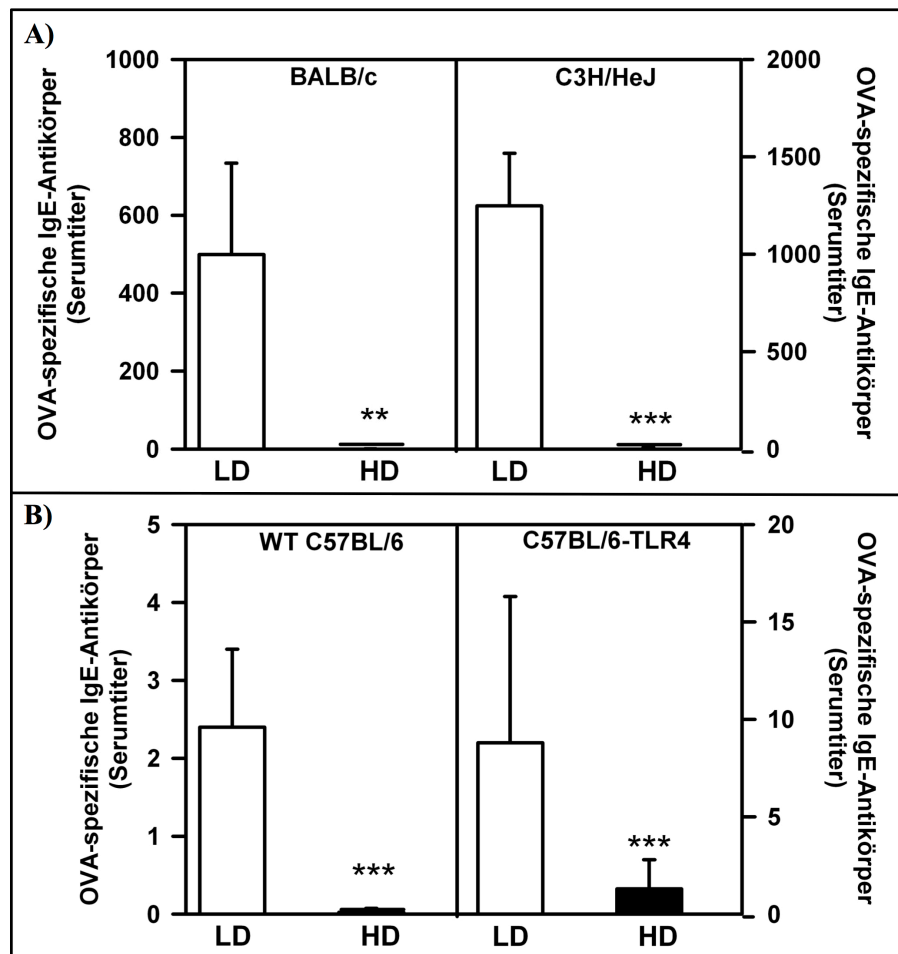


Abb. 2.4 Antigen dosis-abhängige Produktion von IgE-Antikörpern in LPS-insensitiven Mäusen.

LPS-insensitive C3H/HeJ(BALB/c)-Mäuse (A) und C57BL/6-TLR-4-Mäuse (B) sowie die entsprechenden kongenen Wildtyp-Mäuse wurden durch wöchentliche subkutane Injektionen von 1 µg OVA (LD; weiße Balken) bzw. 1000 µg OVA (HD; schwarze Balken) sensibilisiert. Nach der vierten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Konzentration der OVA-spezifischen IgE-Antikörper im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Serumtitel ± SD individueller Mäuse (n=4 Tiere pro Gruppe). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen LD-Mäusen und HD-Mäusen (**p<0,01, ***p<0,001).

Außerdem wurden neben den C3H/HeJ- bzw. BALB/c-Tieren ebenfalls Mäuse verwendet, die eine weniger starke IgE Antwort ausbilden: C57BL/6-TLR-4 wurde erstmals von Hoshino et al. im Jahr 1999 beschrieben (150). Bei diesen Tiere wurden diejenigen Sequenzen des TLR-4 Gens, die für transmembran- und zytoplasmatische Domänen (Aminosäure 86-835) kodieren, durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt. Das Fehlen eines funktionellen TLR-4 Gens (Tlr4Lps-d) macht die Mäuse dieses Stammes hyporesponsiv für LPS-Stimulation. Das defekte Gen wird als TLR4- bezeichnet und ist gegenüber dem intakten Gen TLR-4+ rezessiv vererbt. Tiere mit dem Genotyp TLR4^{-/-} werden homozygot verpaart und daraus resultieren ausschließlich

TLR-4^{-/-} Tiere. Der genetische Hintergrund dieser Tiere ist C57BL/6. Die Veränderung in C57BL/6-TLR4-Mäusen unterscheidet sich von der Tlr4Lps-d Mutation in C3H/HeJ-Mäusen, da es sich in den CH3/HeJ um eine Punktmutation aber keine vollständige Deletion des Lokus handelt. Tiere dieser beiden Mausstämme sowie die entsprechenden Vergleichsmausstämme BALB/c bzw. C57BL/6 wurden in den Experimenten mit niedrigen OVA-Dosen (1 µg OVA; LD) bzw. hohen OVA-Dosen (1000 µg OVA; HD) sensibilisiert und der Verlauf der spezifischen IgE-Produktion wurde bestimmt.

Falls die Kontamination des Antigens mit LPS bei der Inhibition der IgE-Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt, so ist zu erwarten, dass diese Regulation in den Knock-Out-Mäusen, die LPS-insensitiv sind, außer Kraft gesetzt ist und die IgE-Titer nach hochdosiger Immunisierung deutlich ansteigen. Tatsächlich aber hatte die Immunisierung mit der hohen OVA-Dosis sowohl in den TLR-4-defekten C3H/HeJ-Mäusen als auch in den C57BL/6-TLR4-Mäusen – ähnlich wie in den Vergleichsmäusen – eine signifikant niedrigere IgE-Produktion zur Folge als in den mit der niedrigen Dosis sensibilisierten Knock-Out-Tieren (Abb. 2.4). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die LPS-vermittelte Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren nicht für die Suppression der IgE-Produktion nach Applikation hoher Antigen Dosen verantwortlich ist.

III.2.2. Analyse des Effekts der prophylaktischen bzw. therapeutischen Applikation von hohen OVA-Dosen auf die Induktion einer IgE-Immunantwort

Wie in Kapitel III.1.2 gezeigt ist es möglich durch die prophylaktische Applikation hoher KLH-Dosen eine nachfolgende IgE-Produktion zu verhindern. Die folgenden Versuche sollten klären, ob diese Regulation auch für das klinisch relevante Modellallergen OVA zu beobachten ist. Dazu wurden analog zu den mit KLH durchgeführten Experimenten HD-Versuchsmäuse zunächst mit 1000 µg OVA immunisiert, bevor sie im Anschluss durch wiederholte Injektion von 1 µg OVA sensibilisiert wurden (Abb. 2.5 oben).

Die Abbildung 2.5 zeigt die Entwicklung der OVA-spezifischen IgE-Titer in HD-Mäusen, die nachfolgend mit unterschiedlichen OVA-Dosen behandelt wurden, sowie in LD- bzw. HD-Kontrolltieren.

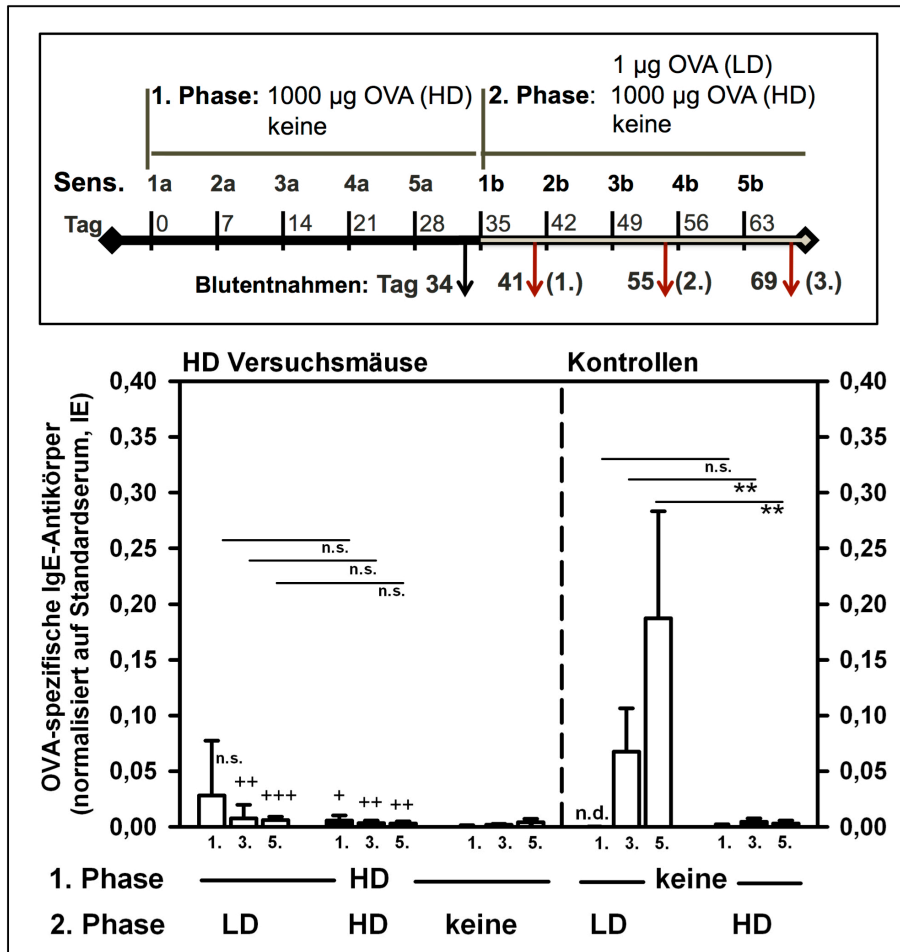


Abb. 2.5 Einfluss einer prophylaktischen Immunisierung mit hohen OVA-Dosen auf die Induktion einer nachfolgenden IgE-Immunantwort.

BALB/c-Mäuse wurden fünfmal repetitiv im wöchentlichen Abstand (Immunisierung 1a bis 5a) mit 1000 µg OVA subkutan sensibilisiert (HD-Versuchsmäuse). Nach der 5. Sensibilisierung wurde der Gehalt des OVA-spezifischen IgE im Serum der Tiere bestimmt und die Tiere wurden in drei Gruppen mit vergleichbarem mittlerem IgE-Gehalt eingeteilt. Eine Woche nach der initialen Sensibilisierungsphase wurden die HD-Versuchsmäuse sowie naive Kontrolltiere fünfmal (Immunisierung 1b bis 5b) subkutan mit 1 µg OVA (weiße Balken) oder 1000 µg OVA s.c (schwarze Balken) immunisiert. Eine dritte Gruppe der HD-Versuchsmäuse wurde nicht weiter sensibilisiert (schraffierte Balken). Allen Tieren wurde in der zweiten Versuchsphase nach der 1., 3. und 5. Sensibilisierung Blut entnommen und die Konzentration der OVA-spezifischen IgE-Antikörper im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Entwicklung der relativen Seruntiter der HD-Versuchsmäuse während der zweiten Versuchsphase dargestellt, auf der rechten Seite sind die Seruntiter der Kontrolltiere ohne initiale Immunisierungsphase dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittels eines Standardserums normierten Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer individueller Mäuse ($n=4$ Tiere pro Gruppe) aus dem Experiment, die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Signifikante Unterschiede der LD- bzw HD-Versuchsmäuse (2. Phase) zu den jeweiligen Kontrolltieren sind mit Kreuzen gekennzeichnet $^+p<0,05$, $^{++}p<0,01$, $^{+++}p<0,001$. Die Unterschiede von LD- und HD-Versuchsmäusen zu den HD-Kontrolltieren waren nicht signifikant. Sternchen kennzeichnen Unterschiede zwischen den markierten Gruppen $^{**}p<0,01$; Abk.: n.s. = nicht signifikant., n.d.= nicht detektierbar.

Die LD-Kontrolltiere zeigten nach 5 Immunisierungen mit 1 µg OVA eine starke Induktion von IgE im Serum (0,187 IE), welche signifikant erhöht war im Vergleich zu HD-Kontrollmäusen (0,004 IE). In HD-Versuchstieren, die weiterhin mit der hohen OVA-Dosis immunisiert wurden (schwarze Balken) oder unbehandelt verblieben (schraffierte Balken), wurde auch in dieser zweiten Phase keine IgE-Produktion induziert. HD-Versuchsmäuse, die in der zweiten Phase mit 1 µg OVA immunisiert worden waren, zeigten ebenfalls eine nur marginale Produktion von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern (0,006 IE), die in ihrer Höhe signifikant unter der Produktion der LD-Kontrollmäuse lag.

Ähnlich wie in den K100-Mäusen wurde also in den mit 1000 µg OVA immunisierten HD-Mäusen ein Suppressionsmechanismus in Gang gesetzt, der aktiv eine nachfolgende IgE-Induktion inhibiert.

Eine wichtiger Gesichtspunkt der Antigen dosis-abhängigen Regulation ist die Frage nach der Antigen-spezifität der Suppression der IgE-Produktion. Ich habe daher untersucht, ob durch die Immunisierung mit hohen OVA-Dosen ausschließlich die OVA-spezifische IgE-Antwort unterdrückt wird oder ob auch IgE-Antworten gegen andere, irrelevante Antigene betroffen sind. Dazu wurden Versuchsmäuse mit 100 µg OVA (HD-Mäuse) nach dem in Abb. 2.6 oben dargestellten Schema immunisiert. Anschließend wurden diese Mäuse repetitiv entweder mit niedrigen Dosen des relevanten Antigens OVA (1 µg) oder des Neoantigens KLH (0,1 µg) immunisiert, um eine antigenspezifische IgE-Immunantwort in den Tieren zu induzieren.

Um die Stärke der IgE-Produktion, die durch diese Sensibilisierung eigentlich generiert wird, mit der Antwort in den vorbehandelten Tieren vergleichen zu können, wurden parallel Kontrollmäuse nur mit den niedrigen Dosen OVA oder KLH immunisiert.

In Abb. 2.6 sind die Titer der OVA-spezifischen und KLH-spezifischen IgE-Antikörper in den Tieren nach fünf Sensibilisierungen mit den niedrigen Antigen-dosen dargestellt. Wie zuvor bereits dargestellt wurde die Produktion des OVA-spezifischen IgE durch die prophylaktische Immunisierung mit hohen OVA-Dosen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant supprimiert (um ca. 86%). Die nachträgliche Immunisierung mit KLH hatte keinen Einfluss auf die OVA-spezifische IgE-Immunantwort. Im Gegensatz dazu weisen die durch die Vorbehandlung mit hohen OVA-Dosen für die OVA-spezifische IgE-Produktion supprimierten Tiere nach der Sensibilisierung mit

KLH eine unbeeinträchtigte KLH-spezifische IgE-Immunantwort auf, die in ihrer Höhe vergleichbar ist mit der Antwort in den nicht vorbehandelten Kontrolltieren (Abb. 2.6 unten, rechte Seite). Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass der Mechanismus der Inhibition der IgE-Antwort, ausgelöst durch die Applikation hoher Antigendosen, antigenspezifisch wirkt.

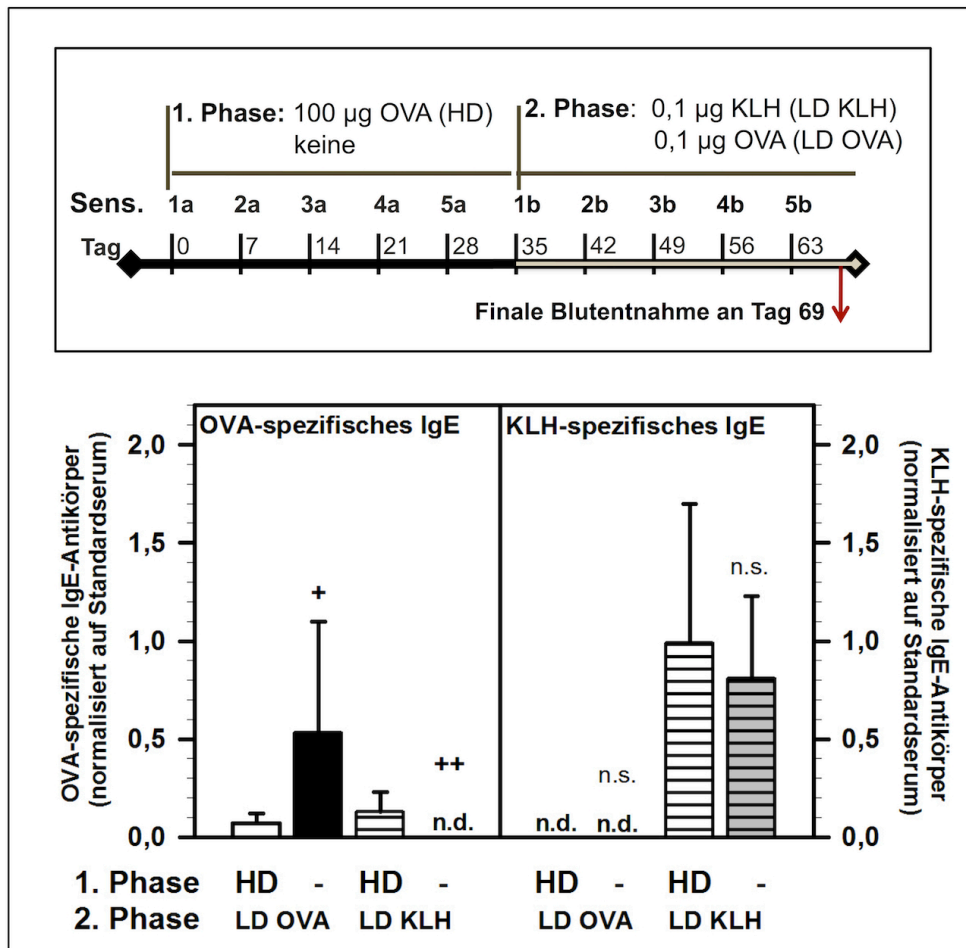


Abb. 2.6 Der durch Immunisierung mit hohen Antigendosen ausgelöste Suppressionsmechanismus wirkt antigenspezifisch.

(A) BALB/c-Mäuse wurden fünfmal repetitiv im wöchentlichen Abstand (Immunisierung 1a bis 5a) mit 100 µg OVA subkutan sensibilisiert (HD). Nach der 5. Sensibilisierung wurde der Gehalt des OVA-spezifischen IgE im Serum der Tiere bestimmt und die Tiere wurden in drei Gruppen mit vergleichbarem mittlerem IgE-Gehalt eingeteilt. Eine Woche nach der initialen Sensibilisierungsphase wurden die HD-Versuchsmäuse sowie naive Kontrolltiere fünfmal (Immunisierung 1b bis 5b) subkutan mit 0,1 µg OVA (LD OVA) oder 0,1 µg KLH s.c. (LD KLH) immunisiert. (B) Sechs Tage nach der letzten Sensibilisierung der 2. Phase (Tag 69) wurde den Tieren Blut abgenommen und sowohl OVA-spezifische als auch KLH-spezifische IgE-Antikörper im Serum der Tiere bestimmt. Die Abbildung zeigt die normierten Mittelwerte \pm SD individueller Seren von 4 Tieren pro Gruppe aus einem Experiment repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Kreuze kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen vakzinierten HD-Mäusen und unvakzinierten Kontrolltieren ($^+p=0,05$, $^{++}p=0,01$). N.s. = nicht signifikant, nd= nicht detektierbar.

Die Tiere wurden wie in Abbildung 2.7 A gezeigt in 2 Phasen sensibilisiert. In der 1. Phase wurden Mäuse fünfmal mit niedrigen Dosen (1 µg OVA s.c.) sensibilisiert, um eine IgE-Produktion zu induzieren. Dann wurden diese LD-Mäuse gemäß des IgE-

Titers im Serum in Gruppen mit vergleichbarem OVA-spezifischem IgE eingeteilt (mittlerer Serومتiter 0,229 IE).

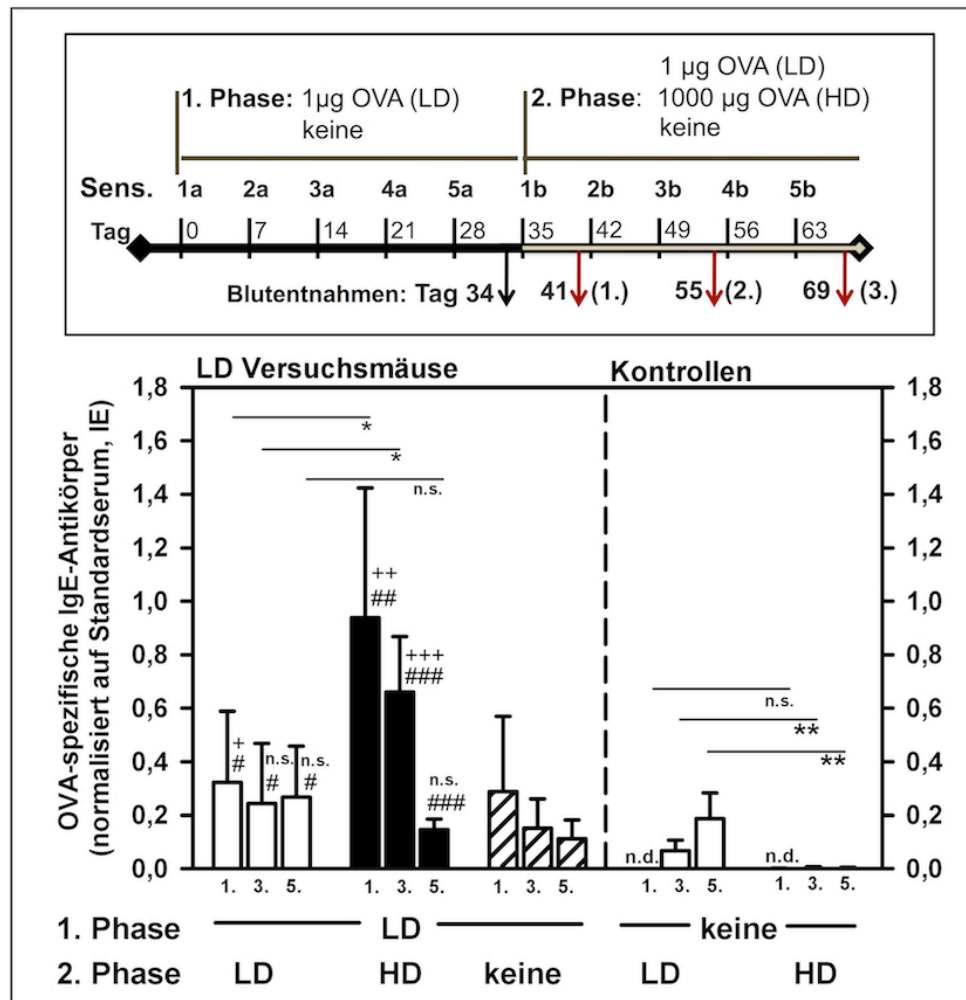


Abb. 2.7 Einfluss einer Applikation von hohen Dosen OVA auf eine etablierte IgE-Immunantwort

(A) BALB/c-Versuchsmäuse wurden fünfmal repetitiv im wöchentlichen Abstand (Immunisierung 1a bis 5a) mit 1 µg OVA subkutan sensibilisiert (LD-Versuchsmäuse). Nach der 5. Sensibilisierung wurde der Gehalt des OVA-spezifischen IgE im Serum der Tiere bestimmt und die Tiere wurden in drei Gruppen mit vergleichbarem mittlerem IgE-Gehalt eingeteilt. Eine Woche nach der initialen Sensibilisierungsphase wurden die LD-Versuchsmäuse sowie naive Kontrolltiere fünfmal (Immunisierung 1b bis 5b) subkutan mit 1 µg OVA (weiße Balken) oder 1000 µg OVA s.c. (schwarze Balken) immunisiert. Eine dritte Gruppe der LD-Versuchsmäuse wurde nicht weiter sensibilisiert (schraffierte Balken). Allen Tieren wurde in der zweiten Versuchsphase nach der 1., 3. und 5. Sensibilisierung Blut entnommen und die Konzentration der OVA-spezifischen IgE-Antikörper im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. (B) Auf der linken Seite der Abbildung ist die Entwicklung der relativen Serومتiter der LD-Versuchsmäuse während der zweiten Versuchsphase dargestellt, auf der rechten Seite sind die Serومتiter der Kontrolltiere ohne initiale Immunisierungsphase dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittels eines Standardserums normierten Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer individueller Mäuse (n=4 Tiere pro Gruppe) aus dem Experiment, die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Signifikante Unterschiede der LD- bzw HD-Versuchsmäuse (2. Phase) zu den LD-Kontrolltieren sind mit Kreuzen (*p=0,05, +p=0,01, +++p=0,001) und zu den HD-Kontrolltieren mit Rauten (#p=0,05, ##p=0,01, ###p=0,001) gekennzeichnet. Sterne geben Signifikanzen zwischen den markierten Gruppen an (*p=0,05, **p=0,01).

Abk.: n.s. = nicht signifikant, n.d.= nicht detektierbar.

Anschließend wurden die Mäuse während der 2. Phase entweder mit 1 µg OVA s.c. weiterbehandelt (weiße Balken) bzw. mit 1000 µg OVA s.c. immunisiert (schwarze Balken) oder wurden nicht weiter sensibilisiert (schraffierte Balken). Kontrolltieren wurde analog zu den Versuchen in Kapitel ausschließlich in der 2. Phase niedrige (LD Kontrolle) bzw. hohe Dosen verabreicht (HD Kontrolle). LD-Kontrollmäuse denen in der 2. Phase niedrige Dosen injiziert wurden, zeigten eine signifikant stärkere IgE-Induktion als HD-Kontrollmäuse. Zuvor mit niedrigen Dosen sensibilisierte LD-Mäuse, zeigten eine starke Induktion von IgE im Serum, die nach der letzten Immunisierung eine Art Plateau (0,269 IE) erreichte (Abb. 2.7 B).

Die LD-Mäuse, die während der 2. Phase mit hohen Dosen behandelt wurden zeigten nach der 1. Sensibilisierung eine sehr starke Produktion von IgE-Antikörpern (0,939 IE), welche sich aber über die weiteren Sensibilisierungen mit hohen Dosen auf einen Wert von 0,147 IE reduzierte. Dieser Wert lag unter dem von Tieren, die ausschließlich mit niedrigen Dosen behandelt wurden, die Reduktion war aber nicht statistisch signifikant. Die LD-Mäuse die während der 2. Phase keine weiteren Sensibilisierungen erfahren hatten, zeigten eine Abnahme der IgE-Konzentrationen im Serum um ca. 39%. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von hohen Dosen OVA eine etablierte IgE-Immunantwort zunächst verstärkt, im weiteren Verlauf jedoch zu einer Reduktion des OVA-spezifischen IgE-Gehalts führte. Die Applikation hoher Dosen hatte allerdings über den Messzeitraum von 5 Wochen keinen signifikanten therapeutischen Effekt auf die Sensibilisierung.

Neben der starken IgE-Induktion bzw. -Repression kam es wie bereits gezeigt (Abb. 2.1) nach mehreren hochdosigen Sensibilisierungen zu einer massiven Produktion von IgG1 und IgG2a-Antikörpern im Serum der Mäuse, die in Gruppen, die mit hohen Dosen behandelt wurden, am stärksten war (Abb. 2.2). Um durch diese verstärkte Produktion von IgG-Antikörpern bedingte Detektionsprobleme von IgE-Antikörpern im ELISA aufgrund des Hook-Effekts auszuschließen und die zuvor beschriebenen Resultate bezüglich der IgE-Immunantwort mit einem anderen Messverfahren zu verifizieren, wurden die Seren der Tiere im RBL-Test analysiert (Abb. 2.8). Die Seren der Gruppen wurden vereinigt, um die Analyse von allen Entnahmezeitpunkten in einem Test durchführbar zu machen.

Die Inkubation der RBL-2H3-Zellen mit den Seren, die nach der 5. Sensibilisierung der

Kontrollmäuse gewonnen worden waren, resultierte in der Freisetzung von 8,6 % für LD-Kontrolltiere und 1,4 % für HD-Kontrolltiere und entspricht somit den Ergebnissen der IgE-Titer-Bestimmung per ELISA. Wie schon im ELISA gezeigt, führte die Sensibilisierung der LD-Mäuse mit hohen Dosen in der 2. Phase zunächst zu einem sehr starken Anstieg der IgE-vermittelten β -Hexfreisetzung (32,6 %), welche sich dann aber nach der 5. Sensibilisierung auf 7,1% reduzierte. Dieser Wert lag nur leicht über dem Wert für die Seren nach 5. Sensibilisierung aus LD-Mäusen (weiße Balken), die konstant mit 1 μ g OVA s.c. behandelt wurden.

Vergleicht man die Ergebnisse aus ELISA und RBL-Test, so konnten durch den RBL-Test die Daten des ELISA bestätigt werden. Die Sensibilisierung mit hohen Antigendosen hatte über den gezeigten Messzeitraum keinen signifikanten therapeutischen Effekt auf die IgE-Immunantwort.

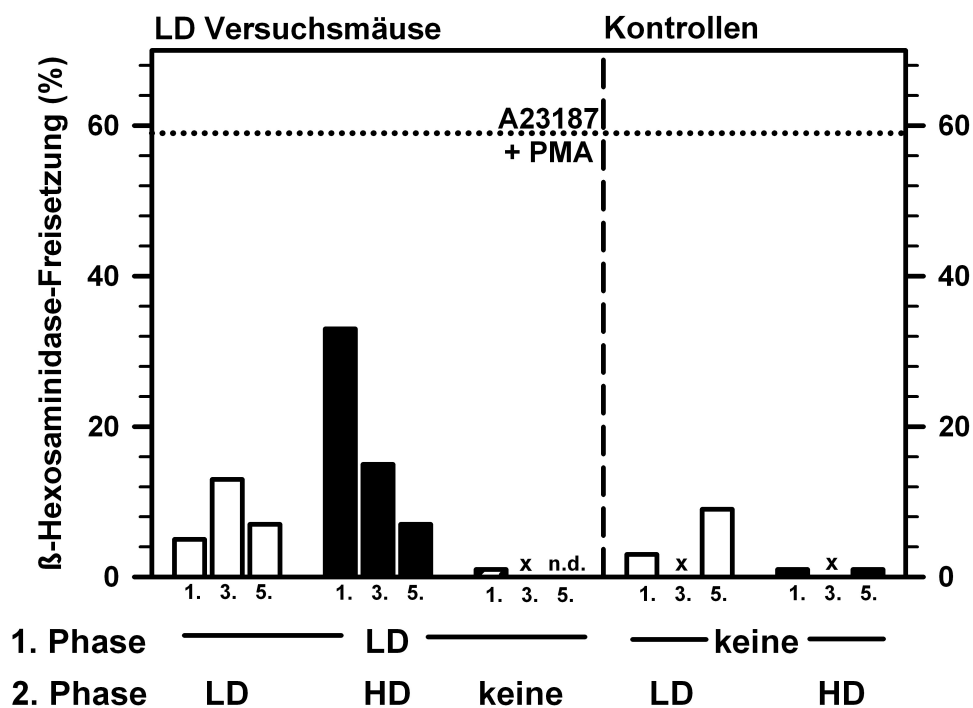


Abb. 2.8 Funktionelle Bestimmung von antigenspezifischen IgE-Antikörpern im Serum der Tiere aus Abbildung 2.7

RBL-2H3-Zellen wurden mit den gruppenweise vereinigten Seren der Tiere aus Abb. 2.7 inkubiert bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen ohne und mit 30 μ g OV/ 100 μ l stimuliert. Zusätzlich wurden zur maximalen Stimulation der RBL-2H3-Zellen Kulturen mit A23178 + PMA inkubiert (kariierter Balken). Im Anschluss wird die Freisetzung von β -Hexosaminidase in das Kulturmedium durch aktivierte RBL-2H3-Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Werte der β -Hex-Freisetzung \pm SD durch vereinigte Seren (n=4), repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimenten als Differenz von OVA-stimulierten und unstimulierten Ansätzen.

III.3. Induktion von T-Zell-Toleranz nach Applikation hoher OVA-Dosen

Die Induktion von peripherer Toleranz bezüglich des Allergens, gegen das eine Sensibilisierung vorliegt, ist ein Mechanismus, der für den Erfolg einer SIT entscheidend ist (161). Das Vorliegen einer Toleranz im T-Zell-Kompartiment lässt sich anhand einer verminderten Proliferation von T-Zellen sowie die reduzierte Sekretion von Zytokinen durch T-Zellen belegen. Die Analyse der immunregulatorischen Mechanismen nach intraperitonealer Sensibilisierung mit hohen KLH-Dosen hatte in Gegenwart von Alum gezeigt, dass beide Eigenschaften in diesem Fall zutrafen (99).

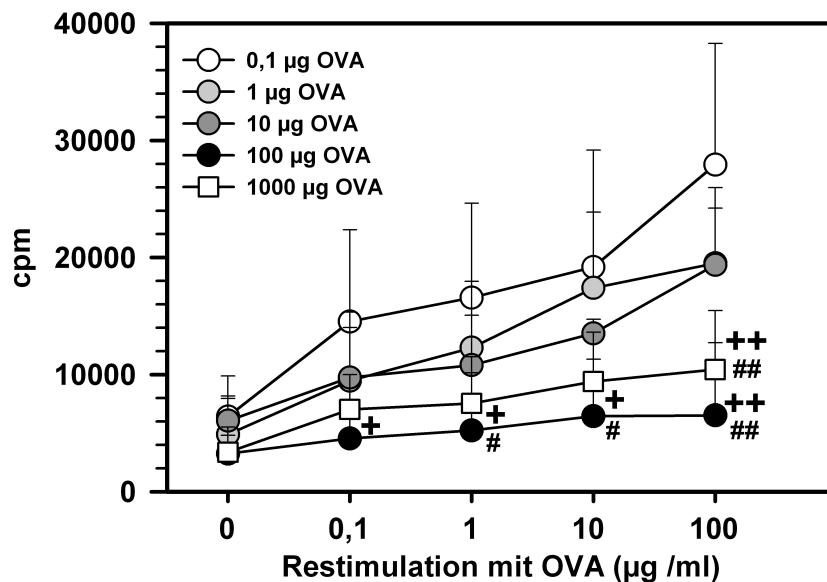


Abb. 3.1 OVA-spezifische Proliferation von Milzzellen nach subkutaner Sensibilisierung mit dem Allergen OVA

BALB/c-Mäuse wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit den dargestellten Dosen des Antigens OVA subkutan sensibilisiert. Sieben Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurden die Milzen der Mäuse isoliert, gruppenweise vereinigt und Einzelzellsuspensionen hergestellt. 1×10^6 Milzzellen wurden in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen OVA bei 37 °C und 10% CO₂ für 72 Stunden kultiviert. Im Anschluß wurden die Kulturen mit 0,25 µCi ³H-Thymidin versetzt und weitere 16 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf Glasfaserfilter geerntet. Danach wurde im Szintillationszähler die Menge des in die DNA eingebauten ³H-Thymidins als cpm (counts per minute) gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD der Proliferation in Kulturen (n=6 pro Gruppe), die in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestimmt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Kreuze (vs. 0,1 µg OVA: +p<0,05, +p<0,01) und Rauten (vs. 1 µg OVA: #p<0,05, ##p<0,01) gekennzeichnet.

Aus diesem Grunde habe ich untersucht, ob auch die antigenspezifische Immunreaktion nach subkutaner Applikation von hohen OVA-Dosen durch eine verringerte Reaktivität der T-Zellen gekennzeichnet ist. Dazu wurden die Milzzellen von Mäusen, die auf diese Weise mit unterschiedlichen Dosen OVA immunisiert wurden, isoliert und für drei Tage mit dem nominellen Antigen OVA in vitro restimuliert. Im Anschluss wurde die

Proliferation der Zellen in Kultur anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA quantifiziert sowie das Zytokinprofil der T-Zellen bestimmt.

In Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse der Proliferationsmessung der restimulierten Milzzellen aus den mit unterschiedlichen OVA-Dosen sensibilisierten Tieren dargestellt. Als Kontrolle zur Bestimmung der spontanen Proliferation der Zellen wurden jeweils Kulturansätze mitgeführt, in denen Milzzellen ohne die Anwesenheit von OVA kultiviert wurden. Die Inkubation der Milzzellen mit ansteigenden Dosen OVA führte bei allen Gruppen zu einem Einbau radioaktiven Thymidins in die DNA der proliferierenden Zellen. Im Vergleich zu der Proliferation der Milzzellen aus mit 0,1 µg oder 1 µg OVA sensibilisierten Mäusen, die in Abhängigkeit von der zur Restimulation verwendeten OVA-Konzentration signifikant anstieg (Maximalwerte: 277923 cpm, 0,1 µg OVA s.c.; 19505 cpm, 1 µg OVA s.c.), wiesen die Milzzellen der Tiere, die mit 100 µg oder 1000 µg OVA immunisiert wurden, eine verminderte Kapazität zur Proliferation (Hypoproliferation) auf, welche sich bei einer hohen OVA-Konzentration (Maximalwerte: 6515 cpm, 100 µg OVA s.c.; 10431 cpm, 1000 µg OVA s.c.) in der Restimulation signifikant von der der Milzzellen aus Tieren, die mit den niedrigen OVA-Dosen sensibilisiert worden waren, unterschied.

Als ein weiterer Anhaltspunkt für das Vorliegen einer antigenspezifischen Toleranz ist das Ausmaß der Zytokinproduktion der mit 100 µg/ml OVA restimulierten Milzzellen zu werten. Dazu wurde zunächst der Gehalt verschiedener Zytokine wie IL-5, IL-13 (TH2), IL-10 (TH2/ Treg), IL-17A (TH17) und IFN-γ (TH1) in den Kulturüberständen von Zellen, die aus mit 1 µg OVA (LD) bzw. 1000 µg OVA (HD) immunisierten Mäusen stammen, mittels ELISA bestimmt. Die OVA-spezifische Zytokinproduktion ergibt sich dabei aus der Differenz der Zytokinmengen in den Überständen stimulierter Zellen sowie unstimulierter Kontrollkulturen.

Milzzellen aus niedrigdosig immunisierten LD-Mäusen sezernierten große Mengen der Zytokine IL-5 und IL-13 (Abb. 3.2), was auf eine deutliche Polarisierung der T-Zell-Antwort in Richtung TH2 hindeutet. Das präferentiell von TH17-Zellen produzierte Zytokin IL-17A wurde in diesen Kulturen nur in vergleichsweise geringen Mengen detektiert. Im Vergleich dazu wurde in den Kulturüberständen der Milzzellen aus den hochdosig HD-Mäusen sowohl signifikant weniger IL-5, IL-10 und IL-13 als auch weniger IL-17A gemessen. Die Kapazität der T-Zellen aus den HD-Mäusen zur

Zytokinproduktion nach Restimulation ist demnach deutlich reduziert und weist ebenfalls auf die Induktion einer antigenspezifischen Toleranz hin.

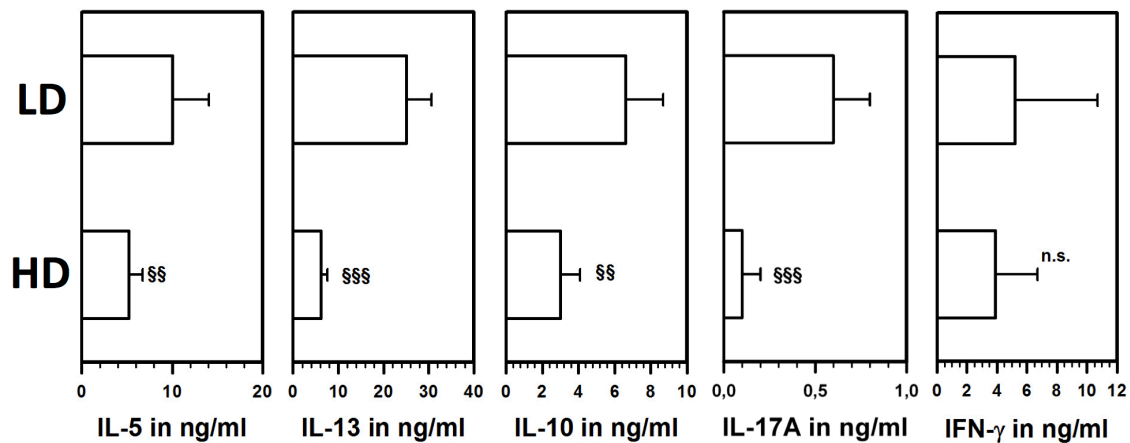


Abb. 3.2 OVA-spezifische Zytokinproduktion nach subkutaner Sensibilisierung mit dem Allergen OVA.

BALB/c-Mäuse (n=16) wurden repetitiv im wöchentlichen Abstand mit 1 µg OVA (LD) oder 1000 µg OVA (HD) subkutan sensibilisiert. Sieben Tage nach der sechsten Sensibilisierung wurden die Milzen der Mäuse isoliert und individuell Einzelzellsuspensionen hergestellt. 1×10^7 Milzzellen wurden in Triplikaten mit 100 µg/ml OVA bzw. ohne OVA bei 37 °C und 10% CO₂ für 72 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der Zellkulturen gewonnen. Mittels ELISA wurde der Gehalt an IFN-γ, IL-17A, IL-5, IL-10 und IL-13 in den Kulturüberständen gemessen. In der Grafik wurden die Werte für Kulturen mit OVA abzüglich der Werte für Kulturen ohne OVA dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD der Zytokinbestimmung in Kulturen (n=16 pro Gruppe), die in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erhoben wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Paragraphen (§§p<0,01, §§§p<0,001) gekennzeichnet. N.s.= nicht signifikant.

Eine Verschiebung der Immunantwort in TH1-Richtung nach Applikation von hohen Sensibilisierungsdosen kann ausgeschlossen werden, da die IFN-γ-Sekretion in den Kulturen beider Gruppen sehr niedrig war und keine signifikanten Unterschiede zwischen den IFN-γ-Mengen in den Kulturüberständen gemessen wurden.

III.4. Effekt der Sensibilisierungsdosis im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Eine Ausprägungsform der TypI-Allergie ist das allergische Asthma. Die systemische Sensibilisierung eines Individuums gekennzeichnet durch die Produktion von IgE-Antikörpern, über die Aktivierung von Gewebsmastzellen kann auch lokal, z.B. in der Lunge, Probleme verursachen. Im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung ist es möglich den Zusammenhang zwischen systemischer Sensibilisierung mit dem Allergen und lokaler Inflammation nach Provokation mit dem Allergen näher zu

untersuchen. Die Verwendung unterschiedlicher Sensibilisierungsrouten, verschiedener Mausstämme und Provokationsprotokolle spielt eine maßgebliche Rolle für die Induktion einer Atemwegshyperreaktivität (AHR) und kann diese in unterschiedlicher Weise beeinflussen. So ist zum Beispiel der Einfluss der Dosis des Antigens, das im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung zur Sensibilisierung der Mäuse oft intraperitoneal injiziert wird, auf die Stärke der inflammatorischen Reaktion in der Lunge, die nach lokaler Provokation mit dem Antigen ausgelöst wird, in verschiedenen Publikationen untersucht und kontrovers diskutiert worden (162–164). Die Sensibilisierung von C57BL/6-Tieren mit niedrigen Dosen löste zum Beispiel eine TH2-Antwort in der Lunge aus, wohingegen BALB/c-Tiere eine TH1-Polarisation in der Lunge bei einer gleichzeitigen starken IL-4 und IL-5-Produktion in der Milz aufwiesen. Die Ausbildung einer AHR und Eosinophilie war außerdem unabhängig von B-Zellen und der Produktion von allergenspezifischem IgE (165). Für die subkutane Immunisierungsrouten wurde bisher noch nicht beschrieben, ob eine Korrelation zwischen der Antigendosis, welche für die Sensibilisierung genutzt wird, und einer nach Provokation möglicherweise ausgelösten Atemwegsinflammation besteht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die für die Sensibilisierung verwendete Antigendosis einen Einfluss auf das Ausmaß der Atemwegsentzündung hat. Aus diesem Grund wurden BALB/c-Mäuse wie zuvor beschrieben wiederholt subkutan mit niedrigen Dosen (1 µg OVA; LD) bzw. hohen Dosen (1 mg OVA; HD) immunisiert. Nach der letzten Sensibilisierung wurde in den Mäusen entsprechend des in Abb. 4.1 gezeigten experimentellen Verlaufs nach intranasaler Provokation mit dem OVA-Protein bzw. nach Applikation von PBS zur Kontrolle die lokale pulmonale Entzündungsreaktion anhand der Messung der Atemwegsreaktivität, der Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der BAL und der Messung der Zytokinproduktion in der Lunge analysiert.

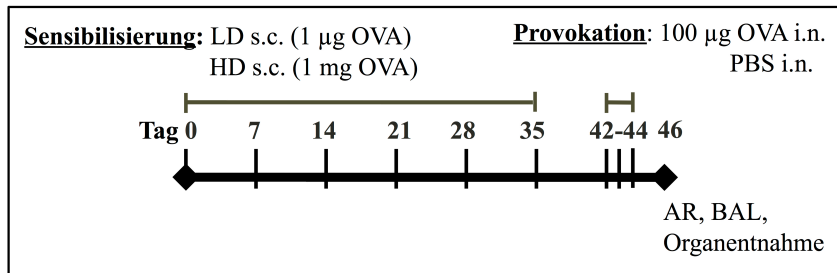


Abb. 4.1 Schema des Behandlungsprotokolls des Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung

BALB/c-Mäuse wurden wiederholt im Abstand von sieben Tagen mit 1 µg OVA (LD) bzw. 1 mg OVA (HD) subkutan immunisiert. Sieben Tage nach der letzten Applikation wurden die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen mit 100 µg OVA bzw. mit PBS (Kontrolle) intranasal provoziert. Nach 48 Stunden wurde die Atemwegsreaktivität (AR) der Tiere in Abhängigkeit von der Methacholindosis mittels invasiver Lungenfunktionsmessung bestimmt. Des Weiteren wurde eine Spülung der Lunge mit 1 ml PBS durchgeführt. Die Zellen der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden mittels einer Zytospinzentrifuge auf Objektträger zentrifugiert, mittels einer spezifischen Färbung gefärbt und im Anschluss differentiell charakterisiert. In der BAL-Flüssigkeit wurde der Gehalt von IFN- γ und IL-5 mittels ELISA bestimmt. Die Lungenzellen wurden *in vitro* restimuliert und im Anschluss durchflusszytometrisch auf die Zytokinproduktion untersucht.

In Abbildung 4.2 ist das Ausmaß der Atemwegsreaktivität (AR) von LD- und HD-Mäusen dargestellt. Die intranasale Applikation von PBS führte in diesen Kontrollmäusen unabhängig von der Sensibilisierungsdosis nach Provokation mit ansteigenden Methacholin-Dosen im Vergleich zur Grundaktivität – in Abb. 4.2 A dargestellt als prozentualer Anstieg – nur zu einer schwachen Erhöhung der AR. Dieser Umstand wird auch durch im Mittel vergleichbar hohe PC100-Werte dokumentiert, die für die AR dieser Tiere ermittelt wurden (Abb. 4.2 B). Der PC100-Wert (PC = „provocative concentration“) gibt individuell für jedes Versuchstier die mittels linearer Regressionsanalyse berechnete Methacholindosis an, durch die eine 100%ige Steigerung der AR erreicht wird. Je niedriger demnach die durch den PC100-Wert beschriebene Methacholindosis ist, desto stärker ist die Atemwegsreaktivität des Tieres. LD-Mäuse, die intranasal mit OVA provoziert wurden, entwickelten als funktionelles Symptom einer Entzündungsreaktion in der Lunge eine AHR, d.h. die Atemwegsreaktivität der Tiere war im Vergleich zu den mit PBS behandelten LD-Kontrollmäusen nach Applikation von ansteigenden Methacholindosen signifikant erhöht (Abb. 4.2 A). Als Folge war auch der für diese Mäuse berechnete PC100-Wert hochsignifikant niedriger als der PC100-Wert der entsprechenden Kontrolltiere (Abb. 4.2 B).

Im Gegensatz zu der Situation bei den LD-Mäusen wurde in den mit OVA provozierten HD-Mäusen bei Gabe der verschiedenen Methacholin-Dosen nur eine geringfügig höhere Atemwegsreaktivität als in den entsprechenden HD-Kontrollmäusen gemessen (Abb. 4.2 A). Der Unterschied zu den Tieren, die intranasal mit PBS behandelt worden

waren, war nur bei einer Dosis von 6,25 mg/ml Methacholin signifikant. Daraus resultierend war der PC100-Wert für die mit OVA provozierten HD-Mäuse im Mittel zwar geringer als der PC100-Wert der Kontrolltiere, aber auch hier erreichte die Reduktion keine statistische Signifikanz (Abb. 4.2 B). In der Gesamtsicht der Daten entwickelten die mit Antigen provozierten HD-Mäuse demnach eine deutlich geringere AHR als die LD-Mäuse.

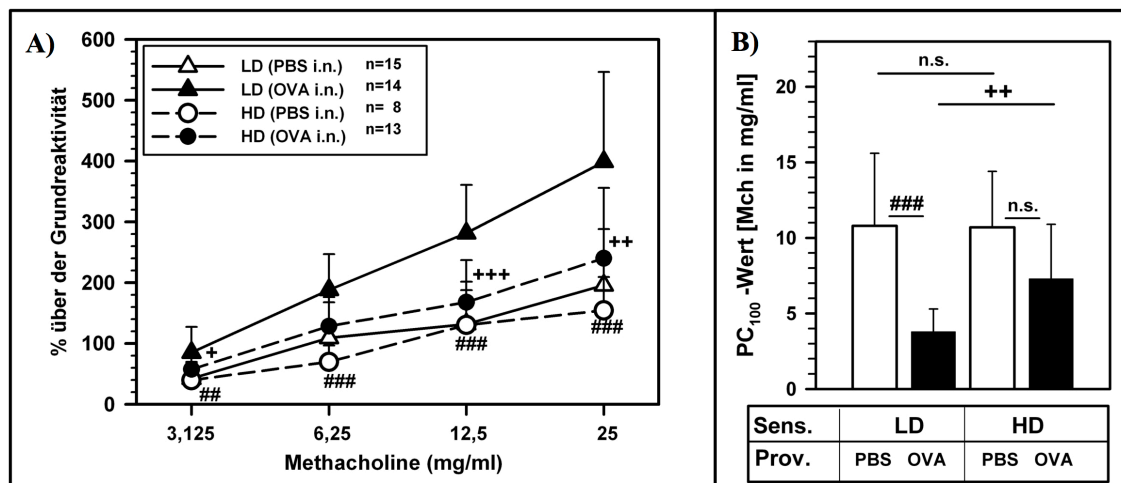


Abb. 4.2 Analyse der Atemreaktivität nach Sensibilisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigen Dosen
BALB/c-Mäuse wurden wie in Abb. 4.1 gezeigt s.c. sensibilisiert und mit 100 µg OVA (offene Symbole/Balken) bzw. PBS i.n. (geschlossene Symbole/Balken) provoziert. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die LD- bzw. HD-Mäuse einer invasiven Lungenfunktionsmessung unter Stimulation der Atemwege mit ansteigenden Dosen Methacholin unterzogen. Zunächst wurde die Grundreaktivität für 5 Minuten gemessen und anschließend der Atemwiderstand unter Provokation mit Methacholine (3,125, 6,25, 12,5 und 25 mg/ml) detektiert. Die Abbildung A zeigt die Mittelwerte \pm SD der Änderung der Atemwiderstände abzüglich der Grundreaktivität als % über der Grundreaktivität erhoben in 4 unabhängigen Experimenten. Für die Darstellung der Daten in B wurde anhand der Werte aus Abb. A in Abhängigkeit von der Methacholindosis mittels linearer Regression der PC₁₀₀-Wert für individuelle Tiere ermittelt. Dieser Wert gibt an bei welcher Methacholinkonzentration eine 100%ige Steigerung der Grundreaktivität zu erwarten ist. Abb. B zeigt die mittleren PC₁₀₀-Werte \pm SD der untersuchten Tiere. Rauten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen PBS und OVA provozierten Tieren (##p=0,01, ###p=0,001). Kreuze geben Signifikanzen zwischen OVA i.n. provozierten LD und HD-Mäusen an (+p=0,05, ++p=0,01, +++p=0,001) Die Unterschiede zwischen PBS-behandelten LD- und HD-Mäusen waren statistisch nicht signifikant (n.s.).

Ein weiterer wichtiger Parameter, der sowohl bei Patienten mit allergischem Asthma als auch im verwendeten Mausmodell der IgE-vermittelten Atemwegsinflammation für eine durch TH2-Zellen induzierte Entzündung der Atemwege charakteristisch ist, ist die massive Einwanderung von eosinophilen Granulozyten (Eosinophilie) in das Gewebe sowie das Lumen der Lungen. Allerdings legen frühere Untersuchungen den Schluss nahe, dass die allergen-spezifische IgE-Produktion mit der Eosinophilie und der AHR nicht zwingend korreliert sind (166).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem Ausmaß der AHR als funktionellem Parameter der Atemwegsentzündung auch die zelluläre Zusammensetzung der BAL in

den Versuchstieren untersucht (Abb. 4.3).

Die Auswertung der zellulären Infiltration nach intranasaler Behandlung von LD- und HD-Mäusen mit PBS bzw. OVA ergab, dass in beiden Versuchsgruppen nach lokaler Provokation mit dem Antigen eine massive Zunahme der Infiltration mit Eosinophilen in die Lunge zu verzeichnen war. Interessanterweise war die Eosinophilie in der Gruppe der mit hohen Dosen sensibilisierten Mäuse signifikant sogar stärker als in der niedrigdosig immunisierten Vergleichsgruppe. Neben der ausgeprägten Eosinophilie war in den provozierten LD-Mäusen auch eine signifikante, aber in Vergleich dazu insgesamt schwache Infiltration von Neutrophilen in die Lunge messbar, in HD-Mäusen hingegen konnte zwischen mit PBS behandelten und mit OVA provozierten Mäusen kein Unterschied in der Zahl der Neutrophilen in der BAL gemessen werden.

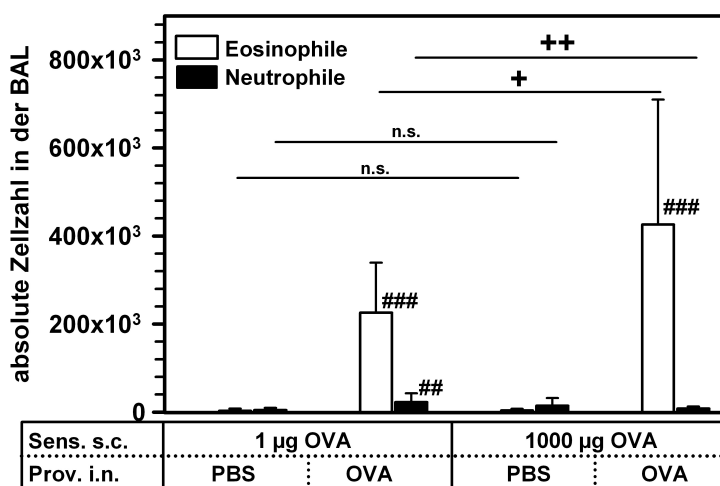


Abb. 4.3 Analyse der Atemwegsinfektion nach Sensibilisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigenosen

BALB/c-Mäuse wurden wie in Abb. 4.1 gezeigt behandelt. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Lungen der Mäuse mit 1 ml BAL-Spüllösung gespült. Die Spüllösung wurde wieder herausgezogen und abzentrifugiert. Die gewonnenen Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und anschließend einer differenziellen Zellfärbung mittels DiffQuick® unterzogen. Die absolute Anzahl der Monozyten, Lymphozyten (Daten nicht gezeigt), Eosinophilen (weiße Balken) und Neutrophilen (schwarze Balken) in der BAL wurde bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von individuellen Mäusen (n=8-15, s. Abb. 4.2 A) erhoben in 4 unabhängigen Experimenten. Rauten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen PBS oder OVA provozierten Tieren (##p=0,01, ###p=0,001). Kreuze geben Signifikanzen zwischen OVA i.n. provozierten LD und HD-Mäusen an (+p=0,05, ++p=0,01). Die Unterschiede zwischen PBS-behandelten LD- und HD-Mäusen waren nicht signifikant (n.s.).

Die Werte für Monozyten und Lymphozyten wurden in die Auswertung mit einbezogen, sind jedoch nicht dargestellt, da sie offenbar keiner antigendosis-abhängigen Regulation unterworfen waren. Die Induktion einer Eosinophilie scheint also den dargestellten Ergebnissen zufolge nicht zwingend mit einer AHR assoziiert zu sein. Um zu untersuchen, ob die Eosinophilie von TH2-Zellen induziert wurde, wurde in den

Versuchstieren das Zytokinmuster der in der Lunge residierenden T-Zellen bestimmt. Dazu wurden die sich in der BAL-Flüssigkeit befindlichen Zytokine mittels ELISA quantifiziert.

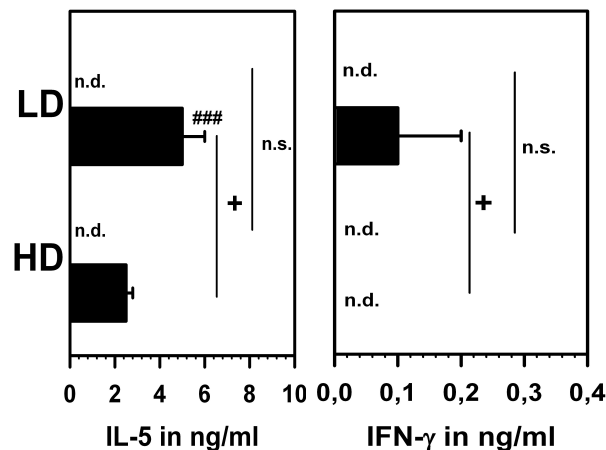


Abb. 4.4 Analyse der Zytokinkonzentration in der BALF von LD und HD-Mäusen.

In der BAL-Flüssigkeit von LD- und HD-Mäusen (sechs Sensibilisierungen) wurden mittels Zytokin-ELISA die IL-5- und IFN-γ-Konzentration bestimmt. Gezeigt sind die Werte für i.n. mit OVA (schwarze Balken) bzw. PBS (weiße Balken) provozierte Tiere als Mittelwerte \pm SD von 3 Mäusen pro Gruppe aus einem Experiment repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Signifikanzen sind durch Rauten (PBS vs. OVA: ### $p=0,001$) und Kreuze (LD vs. HD: + $p=0,05$) gekennzeichnet; n.s.=nicht signifikant. In den intranasal mit PBS behandelten Gruppen waren Zytokine nicht detektierbar (n.d.).

In der allergischen Reaktion sind vor allem die von CD4⁺-T-Zellen produzierten TH2-Zytokine wichtige Entzündungsparameter. Durch die subkutane Sensibilisierung wurde in der Milz eine TH2 Antwort induziert (Abb. 3.2). Die verstärkte Konzentration von IL-5 im Überstand der BAL-Zellen der Lunge deutet auch auf eine pulmonale TH2 polarisierte Antwort hin (Abb. 4.4), was auch schon die starke Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge nach OVA-Provokation deutlich machte (Abb. 4.3). Jedoch war die Konzentration von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit (BALF) in HD-Mäusen nicht deutlich erhöht, was die starke Eosinophilie in diesen Tieren nahe legen würde, sondern im Gegenteil signifikant reduziert im Vergleich zu LD-Tieren (Abb. 4.4). Die BALF von LD-Mäusen wies im Vergleich mit HD-Mäusen größere Mengen IFN-γ auf. Die Sekretion von IFN-γ befand sich mit 0,1 ng/ml für BALF von LD-Mäusen auf sehr geringem Niveau. IL-17A und IL-13 konnten in der BALF in keinem Experiment detektiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass insgesamt eine geringere T-Zell-Aktivierung in der Lunge nach Sensibilisierung mit hohen Dosen und Provokation der Atemwege und daraus resultierend trotz massiver eosinophiler Infiltration eine schwächere funktionelle Beeinträchtigung der Lunge (AHR) festgestellt

wurde. Diese schwächere Aktivierung von TH2 und TH1-Zellen in HD-Tieren könnte ein Zeichen für eine Toleranzinduktion darstellen. Die Induktion einer Toleranz wurde auch von van Oosterhout in dem von seiner Arbeitsgruppe entwickelten und publizierten Mausmodell der spezifischen Immuntherapie postuliert (167). Es sollte nun abschließend untersucht werden, ob die in dieser Arbeit genutzte Sensibilisierungsstrategie nach Applikation von hohen Antigen Dosen ähnliche therapeutische Auswirkungen auf die Atemwegsreaktivität hat.

Mehrere Studien belegen, dass bei der Behandlung von Allergikern nach erfolgreicher spezifischer Immuntherapie und der damit verbundenen Applikation von ansteigenden Allergendosen ein reduzierender Einfluss auf die IgE-Produktion beobachtet werden konnte. Die Erfolge in der Therapie von allergischem Asthma sind kontrovers diskutiert und die größten Erfolge erzielte die Therapie von Bienengiftallergikern oder Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass in Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis die Ausbildung von asthmatischen Symptomen verhindert werden konnte (8, 168).

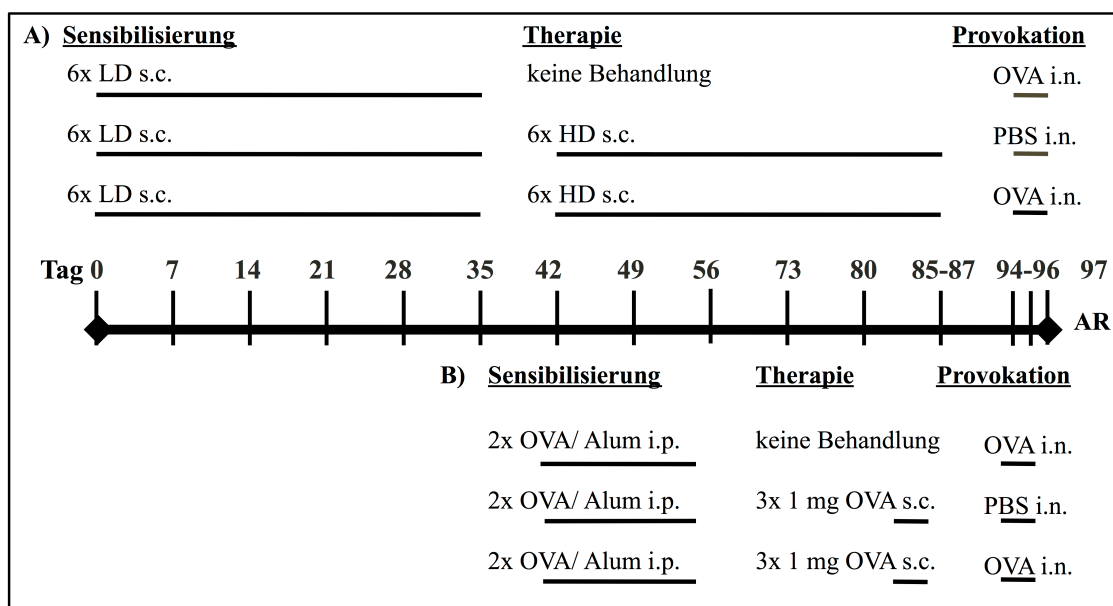


Abb. 4.6 Behandlungsschema des Mausmodells der spezifischen Immuntherapie

(A) BALB/c-Mäuse wurden im Abstand von 7 Tagen sechsmal mit 0,1 µg OVA (LD) s.c. sensibilisiert. Anschließend wurden die Tiere in 3 Gruppen mit ähnlichem IgE-Titer eingeteilt. Die Mäuse wurden daraufhin mit weiteren sechs Injektionen von 100 µg OVA s.c. (HD) einer Therapie unterzogen bzw. nicht weiter behandelt. (B) BALB/c Mäuse wurden im Abstand von 14 Tagen zweimal mit 10 µg OVA/Alum i.p sensibilisiert und in 3 Gruppen mit ähnlichem IgE-Titer eingeteilt. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere mit 1 mg OVA s.c. behandelt (Therapie) oder wurden nicht weiter behandelt. 7 Tage nach der letzten Sensibilisierung wurden alle Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen mit 100 µg OVA bzw. PBS intranasal provoziert. Nach 24 Stunden wurden die Atemwegsreaktivität (AR) der Tiere in Abhängigkeit von der Methacholindosis mittels Ganzkörperplethysmographie bestimmt.

Im Mausmodell der spezifischen Immuntherapie konnte durch die dreifache Gabe einer

hohen Dosis OVA in sensibilisierten Mäusen eine signifikante Reduktion der Eosinophilie und AHR, sowie der OVA-spezifischen Produktion von IgE-Antikörpern beobachtet werden (167, 169). Ähnliche Untersuchungen wurden auch im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt. BALB/c Mäuse wurden nach dem in Abb. 4.6 gezeigten Sensibilisierungsschema mit niedrigen Dosen OVA entweder fünfmal subkutan (1 µg OVA) bzw. zweimal intraperitoneal adsorbiert an Alum (10 µg) nach van Oosterhout immunisiert. Die Tiere wurden anhand der Konzentration der OVA-spezifischen IgE-Antikörper in drei Gruppen mit vergleichbarem Sensibilisierungsstatus eingeteilt und anschließend einer Immuntherapie (SIT) unterzogen. Die subkutane Gruppe erhielt fünf weitere subkutane Injektionen mit 100 µg OVA. Der intraperitoneal behandelten Gruppe von Mäusen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen 1 mg OVA subkutan verabreicht.

Jeweils eine Gruppe von s.c. bzw. i.p. sensibilisierten Mäusen blieb ohne SIT und diente somit als Positivkontrolle für die Ausbildung einer AHR nach intranasaler Provokation mit OVA. Die SIT-Mäuse wurden intranasal mit PBS (Negativkontrolle) oder OVA provoziert. Die Abbildung 4.7 zeigt die Entwicklung der prozentualen Steigerung der AR gegenüber der Grundreaktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Methacholinkonzentration im Test. In Abbildung 4.7 A sind die Werte für subkutan sensibilisierte Tiere dargestellt und Abbildung 4.7 B zeigt die AR für intraperitoneal sensibilisierte Mäuse.

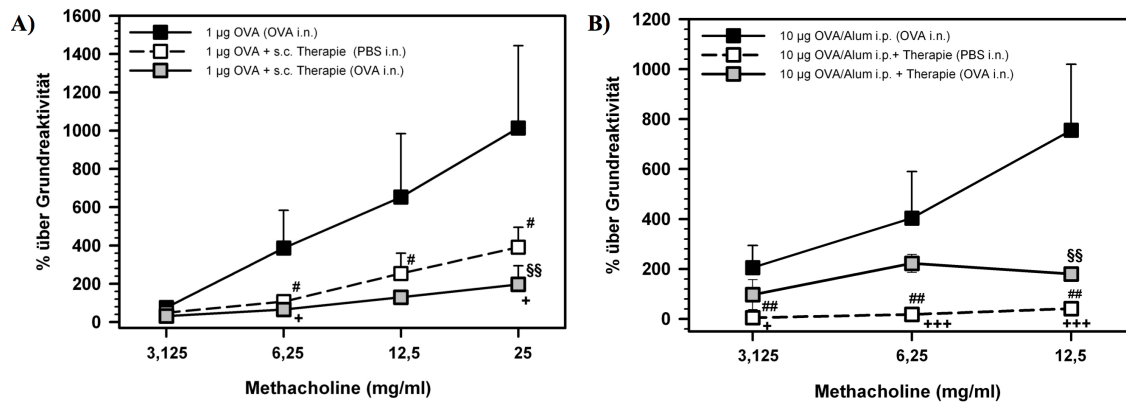


Abb. 4.7 Analyse der therapeutischen subkutanen Applikation von hohen Antigen Dosen im Mausmodell der spezifischen Immuntherapie

Die Lungenfunktion der Versuchstiere wurde unter dem Einfluss von ansteigenden Methacholindosen (3,125, 6,25, 12,5 und 25 mg/ml) gemessen. Die Grafik zeigt den prozentualen Anstieg (% über Grundreaktivität) der AR im Verhältnis zur Grundreaktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Experiments (n=4 Mäuse/Gruppe). Kreuze kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen OVA und PBS i.n. behandelten Tieren ($^+p=0,05$, $^{++}p=0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen Positivkontrolle (schwarz) und PBS-Kontrolle (weiß) sind mit Rauten markiert ($^{\#}p=0,05$, $^{\#\#}p=0,01$). Signifikante Abweichungen zwischen der Positivkontrolle und SIT-Tieren, die mit OVA i.n. behandelt wurden sind mit Paragraphen angegeben ($^{\S\S}p=0,01$).

Es konnte für die Positivkontrolle für beide Immunisierungsrouten ein signifikanter Anstieg der AR im Vergleich zur PBS-Kontrolle nach intranasaler Provokation detektiert werden. Die subkutane Immunisierung induzierte trotz des Fehlens eines Adjuvanz eine etwas stärkere Steigerung der Atemwegsreaktivität von 1014% gegenüber 882% bei der intraperitonealen Applikationsform. Für beide Sensibilisierungsrouten konnte in OVA-provozierten Tieren eine signifikante Reduktion der AHR nach Applikation der SIT erfasst werden, die im subkutan Modell sogar unterhalb des Niveaus der PBS behandelten Mäuse lag. Es konnte somit auch für das in dieser Arbeit verwendete Modell ein therapeutischer Einfluss auf die Ausbildung einer AHR festgestellt werden.

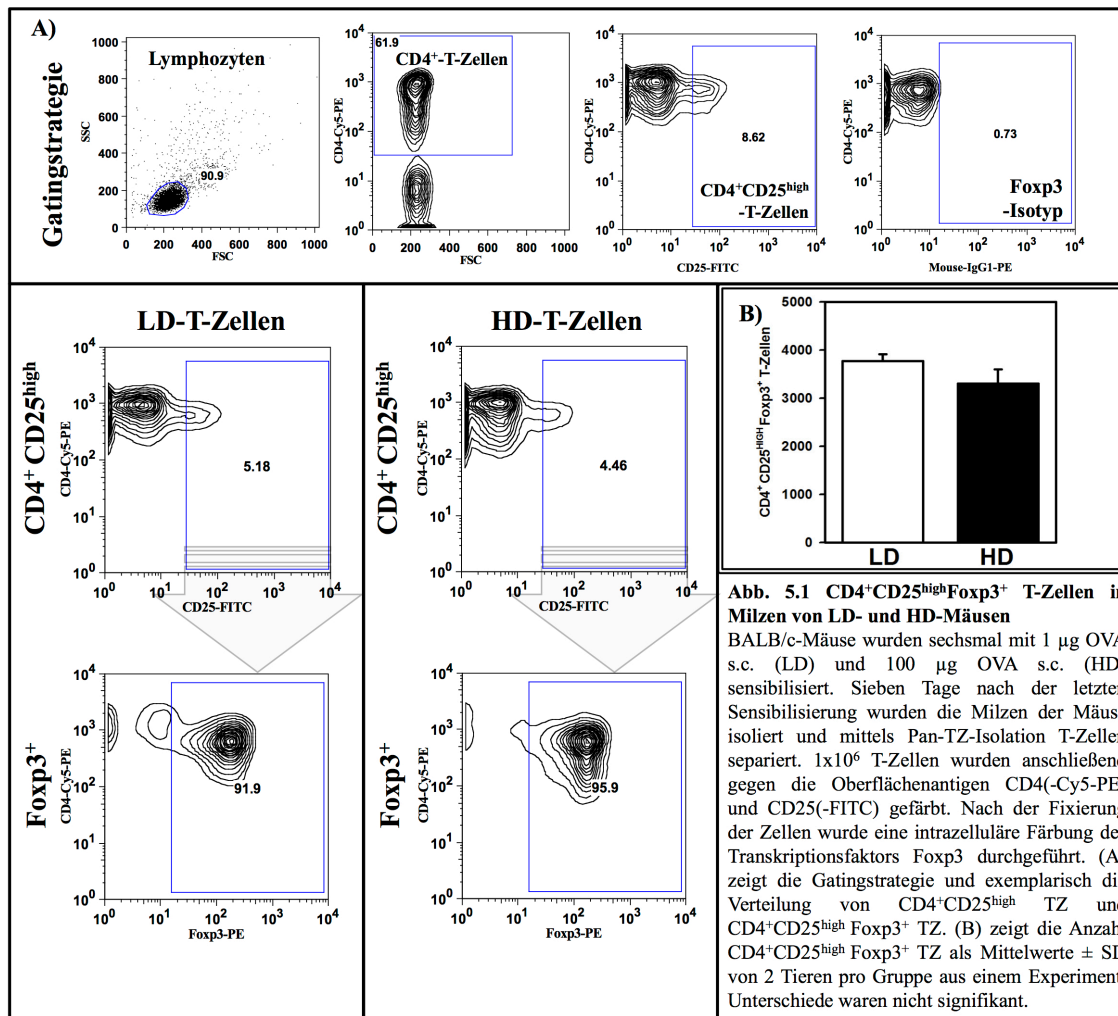
III.5. Analyse der Induktion von regulatorischen T-Zellen nach Applikation von Hochdosen

Die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ist eine wichtige Aufgabe von regulatorischen T-Zellen. In den früheren Arbeiten von Barwig et al. wurden keine Unterschiede in der Induktion von konventionellen Treg nach hochdosiger Immunisierung gefunden (99). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb nicht das gesamte Spektrum der Tregs abgedeckt, sondern lediglich die Induktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg) als einer repräsentativen Gruppe der konventionellen

Treg untersucht.

Natürliche regulatorische CD4⁺ T-Zellen, welche durch eine hohe Expression von CD25 (IL-2 Rezeptor) gekennzeichnet sind (CD4⁺CD25^{high} T-Zellen) und den Transkriptionfaktor Foxp3 konstitutiv exprimieren, können zum Beispiel in der Peripherie die Proliferation und Zytokinproduktion von CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen inhibieren (43).

Die Depletion von Foxp3⁺ Treg in einem Modell der atopischen Dermatitis konnte außerdem die Produktion von TH2-Zytokinen und die Induktion der IgE-Sekretion steigern (170). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob nach hochdosiger Immunisierung verstärkt T-Zellen induziert werden, welche regulatorisch wirksam sein könnten. Die Abbildung 5.1 zeigt die Anzahl von CD4⁺CD25^{high} T-Zellen in MACS aufgereinigten T-Zellen von LD- und HD-Mäusen. Die T-Zellen wurden mithilfe des Pan T-Zell-Isolations-Kit der Firma Miltenyi aus Milzzellen von LD- Und HD-Mäusen isoliert und anschließend mittels FACS-Färbung gegen die Oberflächenantigene CD4 und CD25, sowie intrazellulär gegen den Transkriptionsfaktor Foxp3 gefärbt. CD4⁺ T-Zellen wurden anhand eines Isotypkontrollantiköpers auf eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors CD25 eingegrenzt und der prozentuale Anteil in den Gesamt-T-Zellen untersucht.



Die Analyse der Frequenz und Anzahl von CD4⁺CD25^{high} T-Zellen in LD- und HD-T-Zellen ergab vergleichbare Häufigkeiten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der CD4⁺CD25^{high} T-Zellen von LD-T-Zellen und HD-T-Zellen festgestellt werden (Daten repräsentativ gezeigt). Auch die absolute Anzahl der Tregs Abb. 5.1 B unterschied sich nicht zwischen LD- (3775) und HD-T-Zellen (3305). Desweiteren wurden keine Unterschiede in der Expression von Foxp3 auf den Tregs gefunden (Daten repräsentativ gezeigt). Es scheint also in dem verwendeten Modell der subkutanen Sensibilisierungen mit hohen Antigen Dosen keine Veränderung in der Anzahl oder dem Phänotyp der untersuchten Treg-Population zu geben.

Da konventionelle Tregs in dieser Arbeit als Regulatoren der IgE-Produktion in HD-Mäusen ausgeschlossen werden konnten und auch in der vorausgegangenen Publikation unserer Arbeitsgruppe zum intraperitonealen KLH-Modell keine regulatorische Rolle für unterschiedliche Subpopulationen von regulatorischen T-Zellen beschrieben wurde, sollte nun mittels adoptivem Transfer untersucht werden inwieweit der regulatorische

Mechanismus in subkutan mit hohen Dosen immunisierten Mäusen generell auf Empfängertiere übertragbar ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 2010 zeigen, dass nach intraperitonealer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit 100 µg KLH adsorbiert an Alum (K100) die IgE-Produktion regulierende Mechanismen induziert werden, die nach adoptivem Transfer von Milzzellen aus K100-Mäusen auf Empfängertieren übertragbar sind (99). Es sollte nun geklärt werden, ob nach subkutaner Immunisierung mit hohen Dosen OVA ebenfalls Zellen mit regulatorischer Kapazität induziert werden können. Dazu wurden zunächst Milzzellen bzw. Lymphknotenzellen aus LD- und HD-Mäusen isoliert und in naive BALB/c-Mäuse transferiert. Naive Kontrolltiere und die Rezipienten wurden daraufhin mit 1 µg OVA s.c. behandelt, um eine IgE-Produktion in den Mäusen zu induzieren.

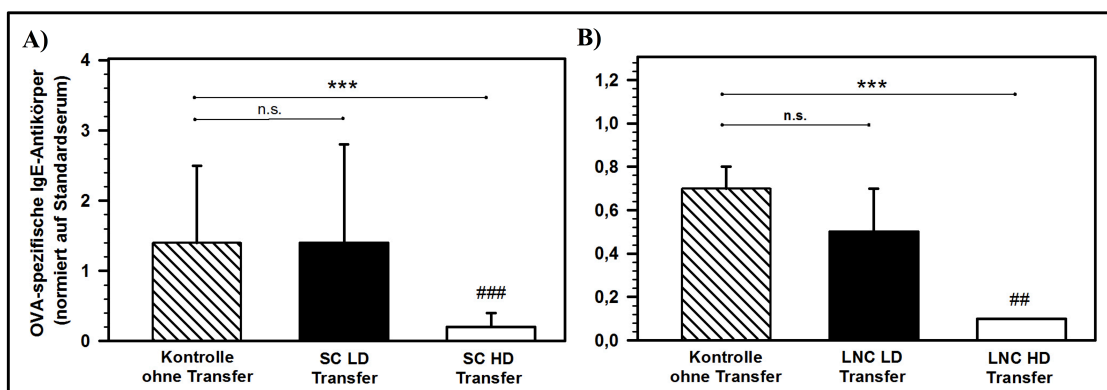


Abb. 5.2 Adoptiver Transfer von Milzzellen (A) und Lymphknotenzellen (B) aus LD- und HD-Donoren

BALB/c-Mäuse wurden 8-10 mal im wöchentlichen Abstand mit 1 µg OVA s.c. (LD) und 100 µg OVA s.c. (HD) sensibilisiert. Sieben Tage nach der letzten Sensibilisierung wurden die Milzen (A) und cervikalen Lymphknoten (B) der Donor-Mäuse isoliert und individuelle Einzelzellsuspensionen hergestellt. 1×10^7 Milzzellen (SC) bzw. 1×10^7 Lymphknotenzellen (LNC) wurden intravenös in naive BALB/c Mäuse injiziert. Am Tag nach dem Transfer wurden die Empfängertiere sowie naive Kontrolltiere mit 1 µg OVA s.c. sensibilisiert. Nach fünf Sensibilisierungen wurde den Mäusen Blut entnommen und das Serum präpariert. Anschließend wurde mittels OVA-spezifischem ELISA die IgE-Konzentration in den individuellen Seren bestimmt und mit den Werten eines mitgeführten Standardserum ins Verhältnis gesetzt. Die Werte in A repräsentieren die relativen mittleren Titer \pm SD von 18 individuellen Mäusen pro Gruppe erhoben in vier unabhängigen Experimenten. Die Werte in B stammen aus einem Experiment und 4 Mäusen pro Gruppe. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Rezipienten (** $p=0,001$). Rauten geben Unterschiede zwischen LD- und HD-Rezipienten an (## $p=0,01$, ### $p=0,001$). N.s.= nicht signifikant.

Die subkutane Immunisierung von naiven Kontrolltieren mit 1 µg OVA zeigte nach fünf subkutanen Applikationen eine starke Induktion von IgE-Antikörpern im Serum (schraffierter Balken). Die IgE-Produktion konnte durch einen Transfer von Milzzellen (Abb. 5.2 A) und Lymphknotenzellen (Abb. 5.2 B) aus LD-Mäusen nicht signifikant inhibiert werden (schwarze Balken). Mäuse, die einen adoptiven Transfer von Milz-

bzw. Lymphknotenzellen aus HD-Mäusen erhalten hatten, zeigten eine signifikant geringere IgE-Induktion im Vergleich zu Kontrolltieren und zu Tieren, die einen LD-Zelltransfer erhalten hatten. Durch den adoptiven Transfer von Milz- und Lymphknotenzellen aus HD-Mäusen, nicht aber LD-Mäusen, konnte somit eine Inhibition der IgE-Produktion nach Applikation von niedrigen Antigendosen auf die Rezipienten übertragen werden.

Da es in den hochdosig immunisierten Mäusen aufgrund der reduzierten Reaktivität von Immunzellen zu einer generalisierten Reduktion der IgE-Immunantwort kommen könnte, wurde untersucht, ob der Transfer von Milzzellen aus hochdosig mit KLH sensibilisierten Mäusen nur die KLH-spezifische IgE-Immunantwort in den Rezipienten inhibiert oder ob, auch die OVA-spezifische IgE-Produktion reduziert würde. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen den subkutanen Modellen mit KLH und OVA wurde die Spezifität des Milzzelltransfers nur im KLH-Modell getestet. K01 und K100-Mäusen wurden die Milzzellen entnommen und adoptiv in naive Rezipienten übertragen. Anschließend wurden die Rezipienten und unbehandelte Kontrolltiere mit niedrigen Dosen des für den Transfer relevanten Antigens KLH bzw. dem irrelevanten OVA sensibilisiert, um eine IgE-Produktion in den Tieren zu induzieren. Anschließend wurden sowohl KLH, als auch OVA-spezifische IgE-Antikörper im Serum der Mäuse analysiert.

Durch den Transfer von K100 Milzzellen (SC) wurde die IgE-Produktion in den Rezipienten signifikant inhibiert. Im Gegensatz dazu wurde jedoch durch einen adoptiven Transfer von Milzzellen aus K01-Mäusen die KLH-spezifische IgE-Antwort nicht beeinflusst. Außerdem war die Inhibition durch den K100 SC Transfer spezifisch für KLH, denn die Produktion von OVA-spezifischem IgE konnte nicht inhibiert werden.

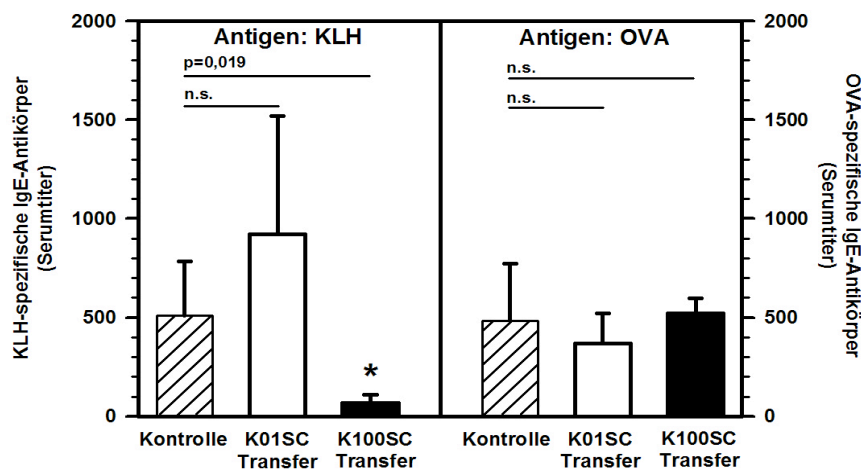


Abb. 5.3 Antigenpezifität der Regulation der IgE-Produktion nach Transfer von Milzzellen aus hochdosig immunisierten Mäusen

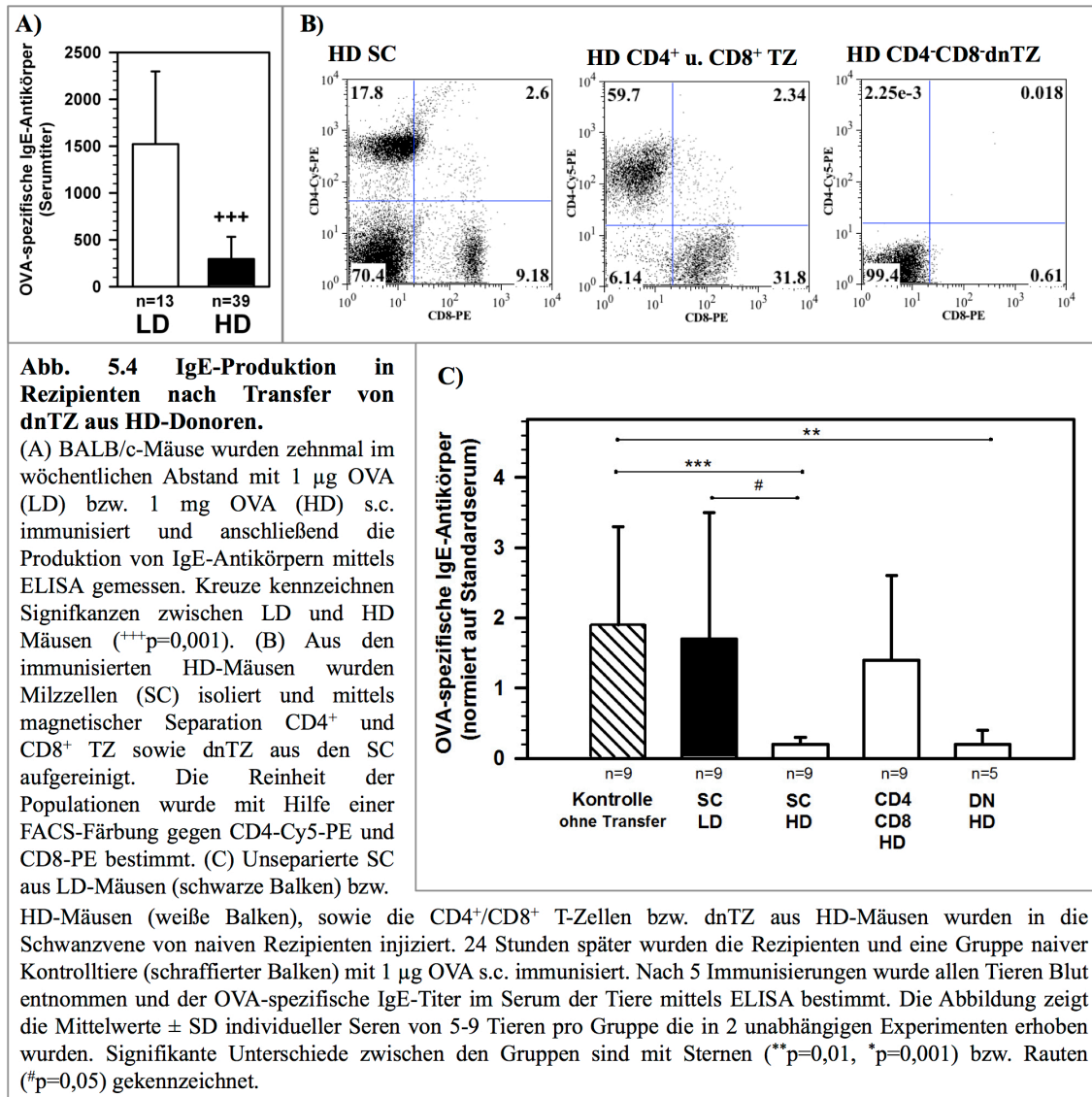
BALB/c-Mäuse wurden 8-10 mal im wöchentlichen Abstand mit 0,1 µg KLH s.c. (K01) und 100 µg KLH s.c. (K100) sensibilisiert. Sieben Tage nach der letzten Sensibilisierung wurden die Milzen der Donoren isoliert und individuelle Einzelzellsuspensionen hergestellt. 1×10^7 Milzzellen (SC) wurden intravenös in naive BALB/c Mäuse injiziert. Am Tag nach dem Transfer wurden die Empfängertiere sowie naive Kontrolltiere viermal im wöchentlichen Abstand mit 0,1 µg KLH (linke Darstellung) bzw. 1 µg OVA s.c. (rechte Darstellung) sensibilisiert. Nach fünf Sensibilisierungen wurde den Mäusen Blut entnommen und das Serum präpariert. Anschließend wurde mittels KLH- bzw. OVA-spezifischem ELISA, die IgE-Konzentration in den individuellen Seren bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 4 bzw. 5 individuellen Seren pro Kontroll- bzw. Rezipientengruppe erhoben in einem Experiment. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen K01- und K100-Rezipienten (**p=0,001). N.s.= nicht signifikant.

Es stellte sich nun weiter die Frage, ob im subkutanen Modell mit Ovalbumin ebenfalls dnTZ die regulatorisch aktive Population ausmachen, wie es bereits von Barwig et al. nach intraperitonealer Applikation von hohen Dosen KLH beschrieben wurde. Dazu wurden neben den Milzzellen aus LD- und HD-Mäusen, auch dnTZ und $CD4^+/CD8^+$ TZ hochrein aus HD-Mäusen aufgereinigt (99). Zunächst wurden mit Hilfe der MACS-Separation negativ selektionierte T-Zellen (PanTZ) gewonnen. Diese T-Zellen wurden anschließend mit Micro-Beads gegen CD4 und CD8 Oberflächenantigene inkubiert und über eine Separationssäule in einem magnetischen Feld gegeben. Aufgrund der magnetischen Anziehung wurden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen auf der Säule zurückgehalten und die von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen depletierte dnTZ-Fraktion im Durchlauf wurde aufgefangen. Anschließend wurden sowohl die von der Säule eluierten $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen (CD4 CD8 HD) in Empfängertiere übertragen, als auch die zu etwa 97-99% reinen dnTZ (HD DN). Am Tag nach dem Transfer wurden die Rezipienten und naive Kontrolltiere mit 1 µg OVA subkutan behandelt und diese Behandlung vier weitere Male im Abstand von 6-7 Tagen wiederholt.

Nach der fünften Sensibilisierung wurde den Versuchstieren Blut entnommen und die

individuellen Seren präpariert. Die Abbildung 5.4 zeigt die Entwicklung der individuellen Serumtiter von Rezipienten, wie Kontrollmäusen normiert auf ein im ELISA mitgeführtes Standardserum. Die Applikation von niedrigen Dosen OVA führte in naiven Kontrolltieren nach 5 Sensibilisierungen zu einer starken Induktion von IgE-Antikörpern im Serum (schraffierter Balken). Die IgE-Produktion konnte durch einen Transfer von 1×10^7 Milzzellen aus HD-Mäusen (SC HD) signifikant inhibiert werden, wohingegen ein Transfer von 1×10^7 Milzzellen aus LD-Mäusen (SC LD) wie zuvor bereits gezeigt keine Auswirkung auf die IgE-Produktion in den Rezipienten hatte. Die Rezipienten, die mit $2,5 \times 10^6$ dnTZ aus HD-Mäusen behandelt wurden, zeigten eine signifikant geringere IgE-Produktion als Tiere die einen Transfer von $2,5 \times 10^6$ $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen erhalten hatten. Durch den Transfer von $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen konnte eine leichte Inhibition erreicht werden, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte und unter Umständen den verbliebenen 6,14% dnTZ (siehe Abb. 5.4 B Mitte, l.u.) innerhalb der $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen geschuldet ist.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass auch im Modell der subkutanen Sensibilisierung mit hohen Dosen OVA regulatorische dnTZ induziert werden, die eine Inhibition der IgE-Produktion nach adoptivem Transfer vermitteln können.



III.6. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von dnTZ

Die in der Literatur bereits mehrfach beschriebenen regulatorischen CD4⁺CD8⁻ dnTZ stellen eine heterogene T-Zellpopulation dar und machen etwa 1% bis 5% der peripheren T-Zellen aus. Sie sind negativ für CD4 und CD8 und verfügen über einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (128, 171). Diverse Subpopulationen von CD4⁺CD8⁻ dnTZ lassen sich aufgrund von Oberflächenmarkern und durch ihre Differenzierungswege unterscheiden (127, 129, 132, 171, 172). Die Oberflächen-Expression von Molekülen wie CD90 (Thy1), CD25, CD28, CD30, CD44, NK1.1 und $\alpha\beta$ TCR wurde als charakteristisch für Subpopulationen von regulatorischen CD4⁺CD8⁻ dnTZ beschrieben (129, 143). Laut Literatur sind dnTZ in der Lage über Fas/FasL-Interaktion die Suppression von

autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen herbeizuführen (133). Außerdem konnten dnTZ in einem murinen Xenotransplantations-modell Alloantigene von anderen antigenpräsentierenden Zellen übernehmen (Trogozytose) und an aktivierte CD8⁺ T-Zellen präsentieren (131). Die suppressiven Wirkmechanismen, denen die Kontrolle der IgE-Produktion durch dnTZ unterliegt sind jedoch noch nicht erforscht. Im Zuge dieser Arbeit konnten nach subkutaner hochdosiger Applikation von OVA dnTZ mit regulatorischer Funktion induziert werden. Die folgenden Untersuchungen beschäftigten sich mit der komparativen phänotypischen Charakterisierung dieser seltenen Zellpopulation in LD und HD-Tieren.

III.6.1. Untersuchungen zur Häufigkeit von dnTZ in LD- und HD-Mäusen

Zunächst stellten wir uns die Frage, ob es durch die Immunisierung mit hohen Antigen Dosen zu einer antigendosisabhängigen Expansion von dnTZ in HD-Tieren kommt. Dazu wurden anhand einer FACS-Analyse die Zahl von CD90⁺CD4⁻CD8⁻ dnTZ in PanTZ aus LD- und HD-Mäusen bestimmt. Hierfür wurden BALB/c- Mäuse wiederholt mit 1 µg (LD) bzw. 100 µg OVA (HD) subkutan behandelt und anschließend individuelle Milzzellsuspensionen aus den Tieren gewonnen. Aus den Milzzellen wurden mittels magnetischer Separation PanTZ isoliert. Die T-Zellen wurden gegen CD90.2-APC, CD4-FITC und CD8-FITC gefärbt und 50000 Zellen je Röhrchen im FACS gemessen. Anhand der in Abb. 6.1 A gezeigten Gatingstrategie wurden zunächst CD90.2⁺ T-Zellen eingegrenzt und schließlich CD4⁺/CD8⁺, sowie CD4⁻CD8⁻ T-Zellen (grau unterlegt) eingegrenzt. Die % Anteile der dnTZ in Milzen von LD (weiße Balken)- und HD-Mäusen (schwarze Balken), sowie die absolute Anzahl der eingegrenzten Zellen wurden in Abb. 6.1 B erfasst. In den T-Zellen aus Milzen von LD-Mäusen konnten 1419 ± 259 dnTZ in 50000 Milzzellen detektiert werden, was einen prozentualen Anteil von $3,01 \pm 0,5$ % ausmacht.

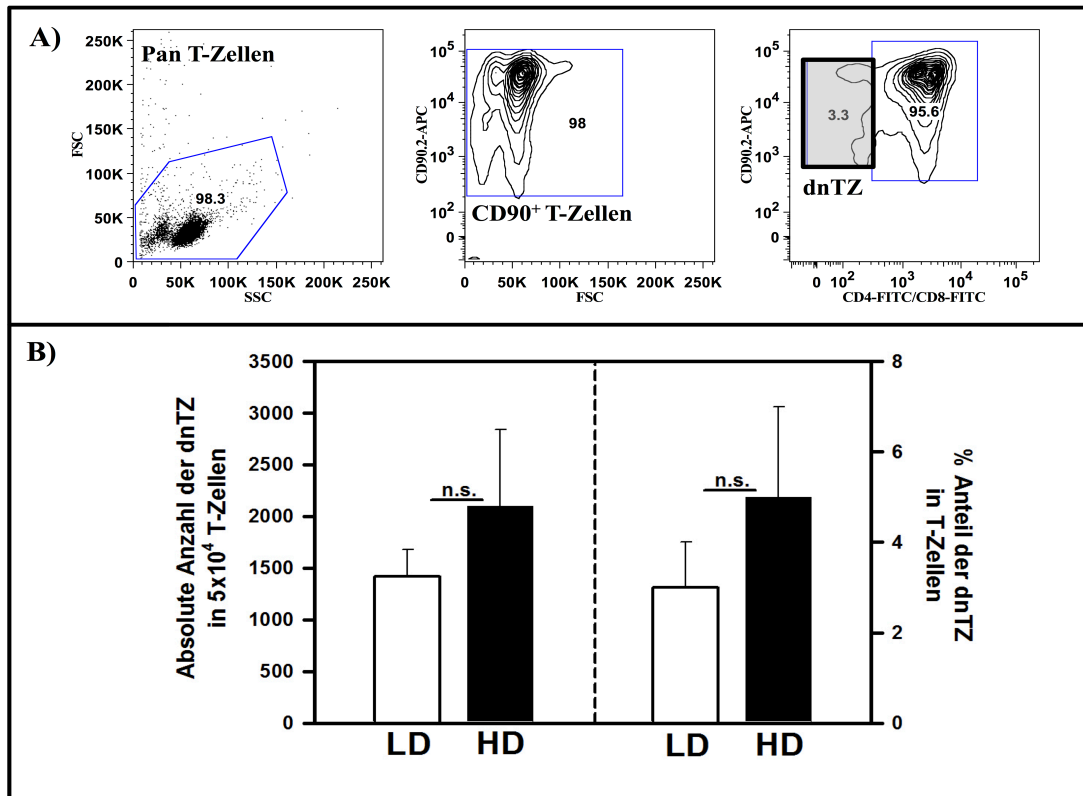


Abb. 6.1 Verteilung von CD90.2⁺ CD4⁻CD8⁻ dnTZ in Pan T-Zellen der Milz von LD- und HD-Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden 6 mal im wöchentlichen Abstand mit 1 µg OVA s.c. (LD) und 100 µg OVA s.c. (HD) sensibilisiert. Sechs Tage nach der letzten Sensibilisierung wurden die Milzen der Tiere entnommen und aufgeschlossen. (A) Aus den Milzzellen wurden mittels magnetischer negativ Selektion unmarkierte Pan T-Zellen gewonnen und eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD90.2-APC und CD4/CD8-FITC durchgeführt. Es wurden 50 000 Zellen je Probe im FACS gemessen und die Populationen wie in A gezeigt eingegrenzt, um CD90.2⁺ CD4⁻CD8⁻ dnTZ (grau unterlegt) detektieren zu können. Abbildung B zeigt die absolute Anzahl (linke Darstellung), sowie den prozentualen Anteil (rechte Darstellung) der dnTZ in der Milz. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± SD von 4 individuellen Mäusen eines Experiments. Es wurden außerdem 3 weitere Experimente (vereinigte Milzzellpopulationen, n=5 Mäuse) mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Im Gegensatz dazu konnten in HD-Mäusen 2099 ± 741 dnTZ ($4,7\% \pm 1,7$) gemessen werden. Die Anzahl und auch der prozentuale Anteil der dnTZ war also in Mäusen, die mit hohen OVA-Dosen sensibilisiert wurden erhöht, erreichte jedoch keine Signifikanz im Vergleich zur Häufigkeit von dnTZ in LD-Mäusen. Dieses Bild zeigte sich in allen drei durchgeführten Versuchen.

III.6.2. Untersuchungen zur Oberflächenexpression LD und HD dn-T-Zellen

In der Literatur werden dnTZ (-Klone) von Zhang et al. (2000) vor allem als $\alpha\beta$ -TCR⁺CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD28⁻CD30⁺CD44⁻ T-Zellen beschrieben. Die von Zhang et al. beschriebenen dnTZ-Klone zeigten keine Unterschiede in der Expression von $\alpha\beta$ -TCR, CD25, CD69, CD62L and CTLA-4 im Vergleich mit einem nicht-regulatorischen 1B2⁺CD8⁺ T-Zell-Klon oder primären aktivierten 1B2⁺CD8⁺ T-Zellen (132). Es stellte sich nun die Frage, ob sich die nicht regulatorischen dnTZ aus LD- und die regulatorischen dnTZ aus HD-Mäusen phänotypisch unterscheiden lassen.

Die zu untersuchenden T-Zellen wurden aus LD- und HD-Milzzellen gewonnen und wie zuvor in Abb. 6.1 beschrieben gegen CD90.2, CD4 und CD8 gefärbt und analysiert. Außerdem wurden die T-Zellen gegen Oberflächenmarker wie $\alpha\beta$ -TZR, $\gamma\delta$ -TZR, CD25, CD28, CD30, CD44, CD62L, CD69, GITR und CTLA-4 und die intrazellulären Marker FasL, Perforin und Granzym B gefärbt.

Die Abbildung 6.2 zeigt die Unterschiede in der TZR-Expression von LD- und HD-CD4⁻CD8⁻ T-Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der $\alpha\beta$ -TZR⁺ bzw. $\gamma\delta$ -TZR⁺ dnT-Zellen in der Milz von LD- bzw. HD-Mäusen. Bei einer Reinheit der isolierten CD90⁺ T-Zellen von ca. 98% sind etwa 45% der LD dnTZ positiv für den $\alpha\beta$ -TZR und 39% für den $\gamma\delta$ -TZR. Es war also in etwa eine gleichmäßige Verteilung von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZR in der dnTZ-Population zu beobachten. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen LD- und HD-Mäusen.

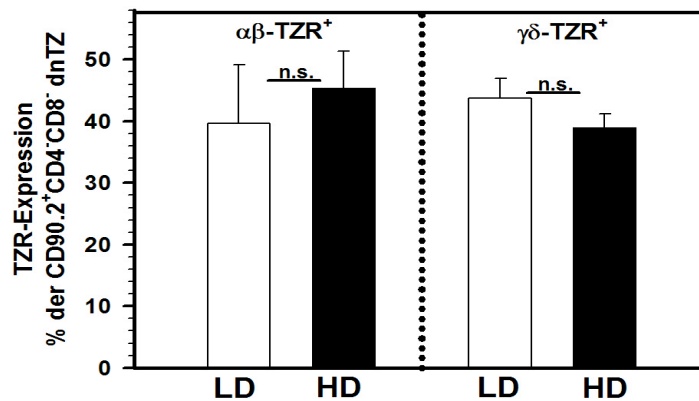


Abb. 6.2 TZR-Expression von Pan T-Zellen aus LD- und HD-Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden 6 mal im wöchentlichen Abstand mit 1 μg OVA s.c. (LD) und 100 μg OVA s.c. (HD) sensibilisiert. Aus den Milzzellen der Tiere wurden Pan-T-Zellen gewonnen und gegen CD90.2, CD4, CD8 sowie $\alpha\beta$ -TZR und $\gamma\delta$ -TZR gefärbt. Es wurden 50 000 Zellen je Probe im FACS gemessen und die Populationen wie in 6.1 gezeigt eingegrenzt, um CD90.2⁺ CD4⁺ CD8⁻ dnTZ (grau unterlegt) detektieren zu können. Die Werte repräsentieren Mittelwerte der prozentualen Verteilung \pm SD erhoben in 3 unabhängigen Experimenten (n= je 4 Mäuse/Gruppe).

Um zu untersuchen, über welchen TZR-Phänotyp T-Zellen verfügen, die eine Suppression der IgE-Produktion nach adoptivem Transfer in Rezipienten vermitteln können, wurden PanTZ aus LD- und HD-Donormäusen isoliert und in naive Empfängertiere transferiert. Ein Teil der PanTZ von $\gamma\delta$ -TZR⁺ Zellen wurde mittels der MACS Separation depletiert (II.2.2.14.3) und ebenfalls transferiert.

Zur Feststellung der Depletionseffizienz mittels FACS-Analyse wurden CD3⁺ Zellen eingegrenzt und anschließend die Expression von CD4/CD8 gegen die $\gamma\delta$ -TZR-Expression untersucht (Abb. 6.3 oben). Die Frequenz von $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen betrug vor der Depletion insgesamt (mittlere Abbildung, Quadranten rechts) ca. 2,24% in HD-Mäusen. Die von $\gamma\delta$ -TZR⁺ Zellen depletierten Pan T-Zellen (rechte Abbildung) wiesen lediglich noch 0,057% $\gamma\delta$ -TZR⁺ Zellen auf. Die so auf ihre Reinheit getesteten $\gamma\delta$ -TZR⁺ Pan T-Zellen, wie auch die $\gamma\delta$ -TZR⁻ Pan T-Zellen wurden intravenös in naive Rezipienten transferiert. Die Rezipienten und naive Kontrolltiere wurden 24 Stunden später mit 1 μg OVA s.c. sensibilisiert und im wöchentlichen Abstand weitere viermal sensibilisiert.

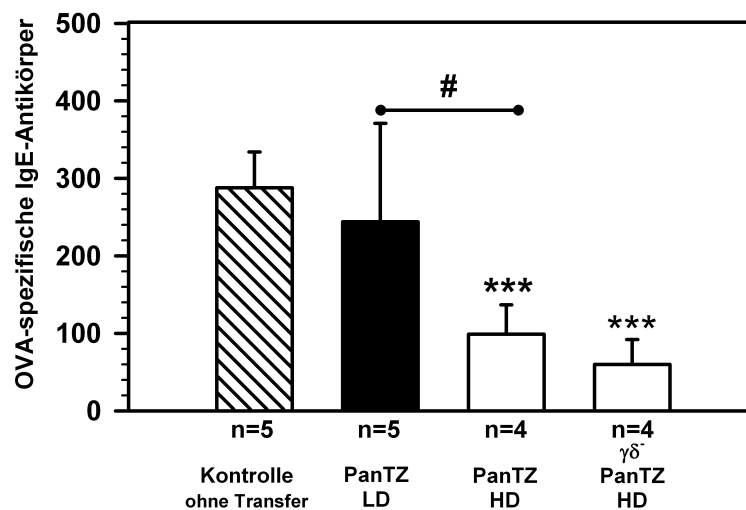
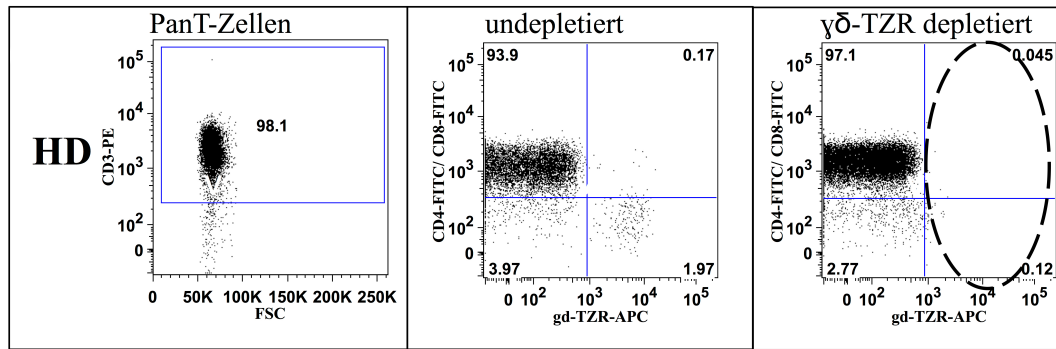


Abb. 6.3 Einfluss der Depletion von $\gamma\delta$ -TZR⁺ Zellen auf die suppressive Kapazität von HD PanTZ
 BALB/c-Mäuse wurden 8 mal im wöchentlichen Abstand mit 1 μ g OVA s.c. (LD) und 100 μ g OVA s.c. (HD) sensibilisiert. Die Milzzellen von LD- und HD-Donoren (n=5) wurden mit einem Gemisch biotinylierter Antikörper gegen CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1), Ter-119 inkubiert. Einem Teil der zu depletierenden Zellen wurde $\gamma\delta$ -TZR-Biotin zugegeben, der andere nicht zu depletierende Teil wurde mit dem Isotyp Hamster-IgG-Biotin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Biotin-MicroBeads versetzt und magnetisch aufgereinigt. Die zu transferierenden Zellen wurden gegen CD3-PE, CD4-FITC, CD8-FITC und $\gamma\delta$ -TZR-APC gefärbt. Depletierte T-Zellpopulationen sind mit einem Kreis markiert. 1×10^7 PanTZ bzw. $\gamma\delta$ -TZR⁻ T-Zellen wurden i.v. in naive Empfängertiere transferiert. An Tag 1 nach dem Transfer beginnend wurden die Tiere wöchentlich mit 1 μ g OVA s.c. behandelt. Abbildung A zeigt die FACS-Analyse von den transferierten HD-PanTZ. Abbildung B zeigt die OVA-spezifischen IgE-Antikörpertiter nach 3 Sensibilisierungen an Tag 22 nach dem Transfer. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD eines Experiments. Sterne und Raute kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (***) bzw. zwischen LD- und HD-Gruppen (#p=0,05).

Nach der fünften Sensibilisierung wurde der OVA-spezifische IgE-Antikörpertiter im Serum der Mäuse bestimmt. Es konnte durch die Sensibilisierung der Kontrolltiere eine IgE-Produktion induziert werden, die durch einen Transfer von LD-PanTZ nicht wesentlich beeinflusst wurde (Abb. 6.3 unten).

Mäuse, die HD PanTZ erhalten hatten, produzierten signifikant weniger IgE-Antikörper, als LD-PanTZ-Rezipienten. Die Depletion von $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Fähigkeit von HD-T-Zellen die IgE-Produktion in Rezipienten im Vergleich zu Kontrolltieren und LD-PanTZ signifikant zu inhibieren. Durch die Depletion der $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen kam es, da identische Zellzahlen transferiert wurden, zur Anreicherung

von $\alpha\beta$ -TZR⁺ Zellen, was zu einer tendenziell verbesserten Inhibition durch HD $\gamma\delta$ -depletierte TZ führte. HD $\gamma\delta$ -TZR⁺ haben demnach keinen Einfluss in der Inhibition der IgE-Immunantwort.

Die von Zhang et al. beschriebenen regulatorischen dnTZ-Klone zeigten keine Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern wie CD25, CD69, CD62L, CTLA-4 verglichen mit nicht-regulatorischen Klonen. In dieser Arbeit wurden nach subkutaner Applikation von hohen OVA-Dosen dnTZ mit regulatorischer Funktion nachgewiesen. Es stellte sich nun die Frage, ob dnTZ aus HD-Mäusen sich in ihrem Expressionsmuster von dnTZ aus LD-Mäusen unterscheiden. Um dieser Frage nachzugehen wurden dnTZ mit der bereits in Abb. 6.1 vorgestellten FACS-Strategie auf die Expression von CD25, CD28, CD44, CD62L, CD69, GITR, CTLA-4 getestet. Außerdem wurde eine Expression des NK-Zellmarkers Nkp46 untersucht. LD- und HD-dnTZ zeigten im Vergleich eine ähnliche Expression aller untersuchten Marker (Abb. 6.6).

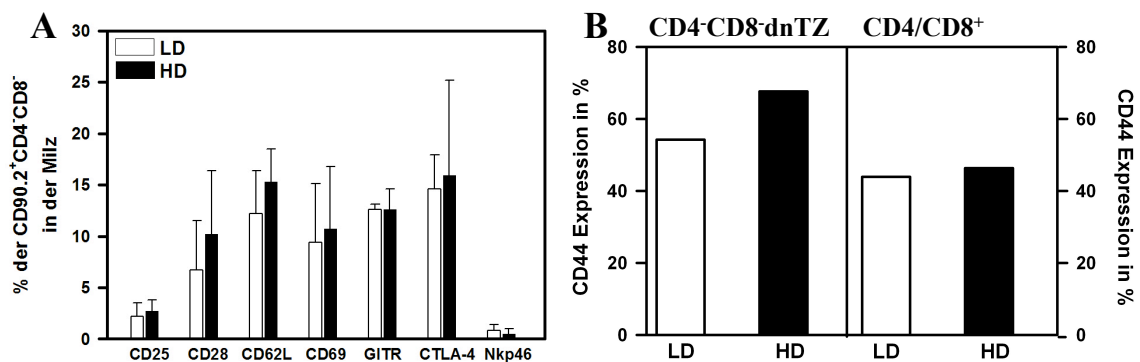


Abb. 6.4 Vergleich der Oberflächenexpression von CD90.2⁺ CD4⁺CD8⁻ dnTZ aus LD- und HD-Mäusen

Aus den Milzzellen von LD und HD-Mäusen wurden mittels magnetischer negativer Selektion unmarkierte Pan T-Zellen gewonnen und eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD90.2-APC und CD4/CD8-PE durchgeführt. Es wurden 50 000 Zellen je Probe im FACS gemessen und die Populationen wie in Abb. 6.1 bereits gezeigt eingegrenzt, um die Expression von (A) CD25, CD28, CD62L, CD69, GITR, CTLA-4 und Nkp46 und (B) CD44 auf CD4⁺CD8⁻ dnTZ und in (B) auch für CD4⁺CD8⁺ detektieren zu können. Die Abbildung zeigt die Frequenz der Zellen in %, die für den jeweiligen Marker positiv waren. Die Werte in A repräsentieren Mittelwerte \pm SD erhoben in drei unabhängigen Experimenten (je n=5 Mäuse/Gruppe). Die Werte in B wurde in einem Experiment erhoben (je n=5 Mäuse/Gruppe) Statistische Signifikanz wurde zwischen LD- und HD-Zellen nicht erreicht.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen, wie CD25, CD62L und CD69 zwischen dnTZ aus LD und HD-Mäusen festgestellt werden (Abb. 6.4 A). Dies bestätigte die Ergebnisse von Zhang et al, die ebenfalls keine Unterschiede in der Expression dieser Moleküle auf regulatorischen und nicht-regulatorischen dnTZ-Klonen fanden. Außerdem konnten Zhang et al weder

CD28 noch CD44 auf den regulatorischen Klonen detektieren. Die von uns untersuchten HD dnTZ zeigten eine Expression von CD44 und CD28. Die Expression von CD28 war in der Tendenz erhöht im Vergleich zu LD dnTZ, wobei jedoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde und der Unterschied fand sich außerdem auch auf CD4⁺/CD8⁺ (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Expression von CD44 differierte zwischen LD- und HD-dnTZ, wobei der Unterschied auf CD4⁺/CD8⁺ nicht detektiert werden konnte (Abb. 6.4 B). Es gibt Berichte, dass NK-Zellen, die ebenfalls keine Expression von CD4 und CD8 zeigen, regulatorische Kapazitäten haben können (173, 174). In unserem Modell werden Nk-Zellen bei der Gewinnung der PanTZ über CD49b depletiert. In FACS-Analysen konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression des in geringem Maße exprimierten NK-Zellmarkers Nkp46 zwischen dnTZ aus LD- und HD-Mäusen festgestellt werden (Abb. 6.6 A). Mehrere Studien zur Wirkungsweise von regulatorischen dnTZ belegen einen Fas/FasL abhängigen Mechanismus oder fanden eine cytolytische Aktivität von dnTZ über einen Perforin/ GranzymB-abhängigen Weg (131, 141). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ebenfalls die ex vivo Expression von CD178 (FasL) auf dnTZ untersucht. FasL konnte sowohl auf LD- als auch HD-dnTZ detektiert werden. Diese Expression war in der Tendenz auf dnTZ aus hochdosig immunisierten Tieren erhöht. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz, da bei zwei von vier Tieren der HD-Gruppe keine FasL⁺ Zellen im FACS detektiert wurden. Die auf dnTZ beobachtete Tendenz zu einer erhöhten Expression von FasL in HD-Mäusen konnte jedoch auch auf CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um einen generellen Unterschied im Aktivierungsstatus der Zellen nach Applikation von unterschiedlichen Sensibilisierungsdosen handelt (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben FasL auch die Expression von Perforin und GranzymB untersucht (Daten nicht gezeigt). GranzymB konnte auf dnTZ aus LD- und HD-Mäusen nicht detektiert werden. Bezüglich der Expression von Perforin gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen LD und HD-Mäusen und damit keine antigendosis-abhängige Regulation der Perforin-Expression.

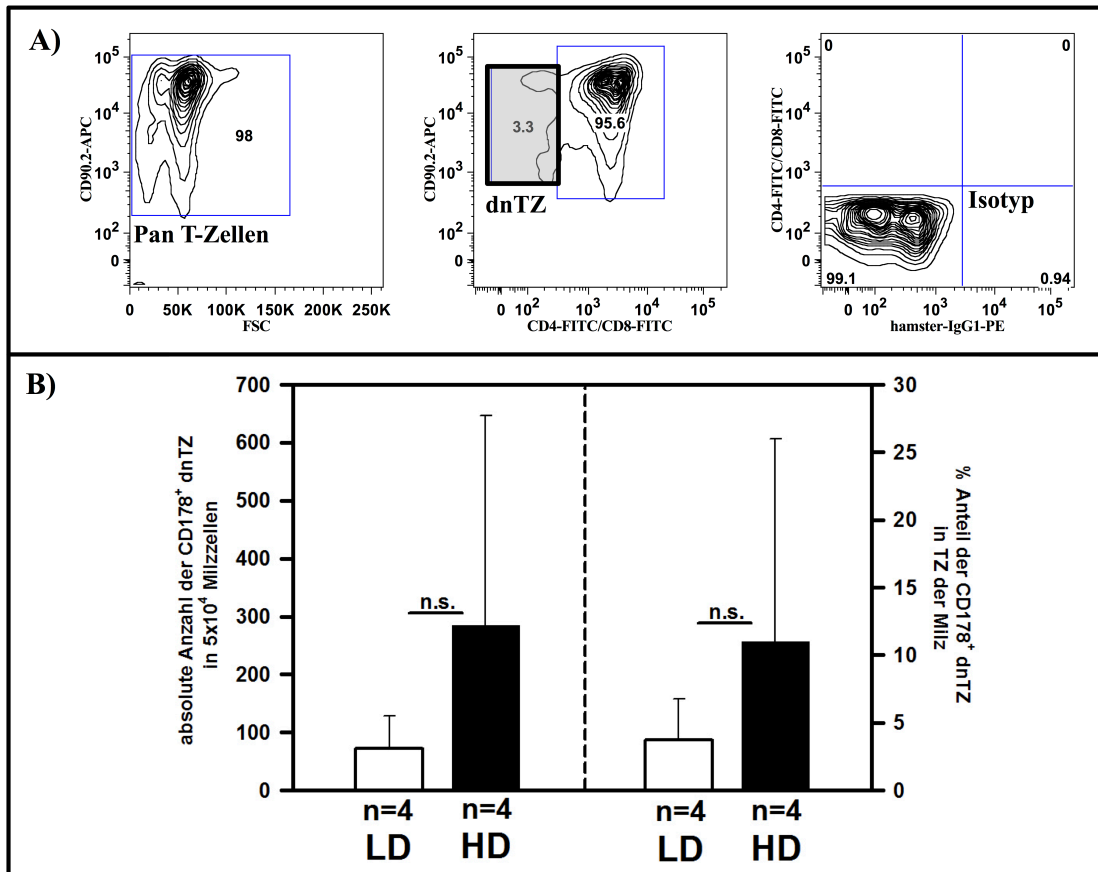


Abb. 6.5 Expression von CD178 (FasL) auf CD90.2⁺ CD4⁻CD8⁻ dnTZ in der Milz von LD- und HD-Mäusen

Die Analyse der Expression von FasL auf dnTZ erfolgte analog zu den Versuchen in Abb. 6.1. Es wurden 50 000 Zellen je Probe im FACS gemessen. Die Populationen wurden wie in A gezeigt analysiert, um CD90.2⁺ CD4⁻CD8⁻ dnTZ (grau unterlegt) detektieren zu können. Die zu Kontrollzwecken mit dem Isotyp Hamster IgG-PE (in A, rechts außen dargestellt) gefärbte Probe erlaubte die Identifikation der CD178⁺ Zellen. Abbildung B zeigt die absolute Anzahl (linke Darstellung), sowie den prozentualen Anteil (rechte Darstellung) der CD178⁺ dnTZ in der Milz. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von 4 individuellen Mäusen eines Experiments. Signifikante Unterschiede zwischen LD- und HD-Mäusen wurden nicht erreicht.

III.6.3. Untersuchungen der Zytokinproduktion von restimulierten dn-T-Zellen aus LD- und HD-Mäusen

Für die bereits beschriebenen dnTZ mit regulatorischer Funktion in Transplantationsmodellen wurde mehrfach die Bedeutung der Sekretion von IFN- γ diskutiert (139). Es stellte sich nun die Frage, ob es Unterschiede in der Zytokinproduktion von dnTZ aus LD bzw. HD-Mäusen gibt. Dazu wurden die CD4⁺CD8⁻ TZ für 72 Stunden mit OVA restimuliert, wie in Abb. 6.6 A gezeigt analysiert und die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-17A, IL-5, IL-4 und IL-10 intrazellulär nachgewiesen.

Die Abbildung 6.6 zeigt die Frequenz von Zytokin produzierenden dnTZ in der Milz von LD und HD-Mäusen. Die Restimulation der dnTZ mit OVA führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl IFN- γ ⁺dnTZ. Es gab jedoch nur tendenzielle keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz IFN- γ ⁺dnTZ aus LD- und HD-Mäusen. Die Frequenz IL-17⁺ dnTZ und IFN- γ ⁺ IL-17⁺ dnTZ war unabhängig von der Sensibilisierungsdosis der Tiere gering. Auf Ebene der TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 konnte eine Reduktion der Zytokine in HD dnTZ detektiert werden, die jedoch keine Signifikanz erreichte. IL-10⁺ IL-4⁺ Zellen waren in HD-Mäusen ebenfalls in geringerer Frequenz zu finden. DnTZ scheinen demnach generell nach Restimulation vermehrt IFN- γ zu produzieren, jedoch konnte keine erhöhte Anzahl IFN- γ HD dnTZ im Vergleich zu LD dnTZ festgestellt werden.

A
Gatingstrategie

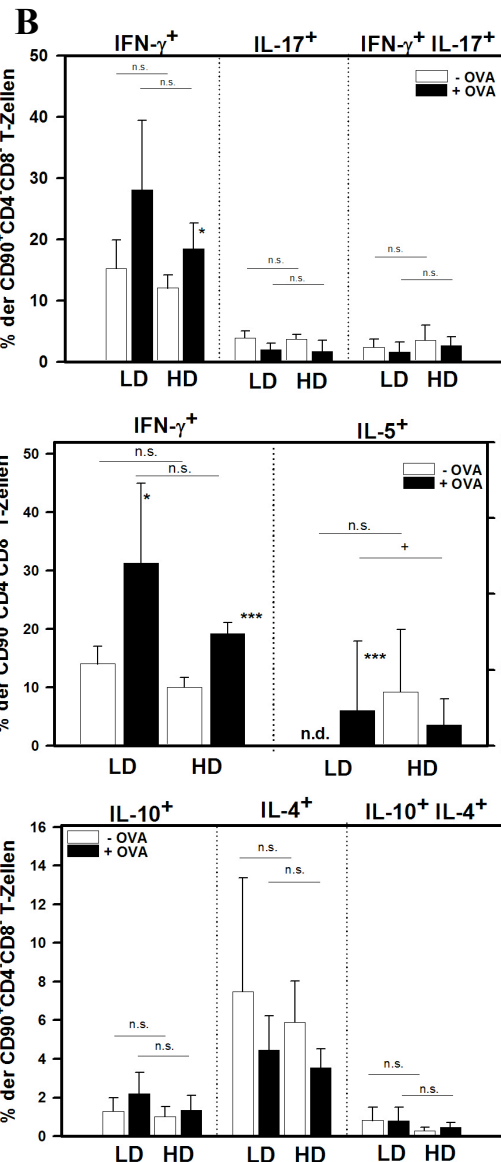
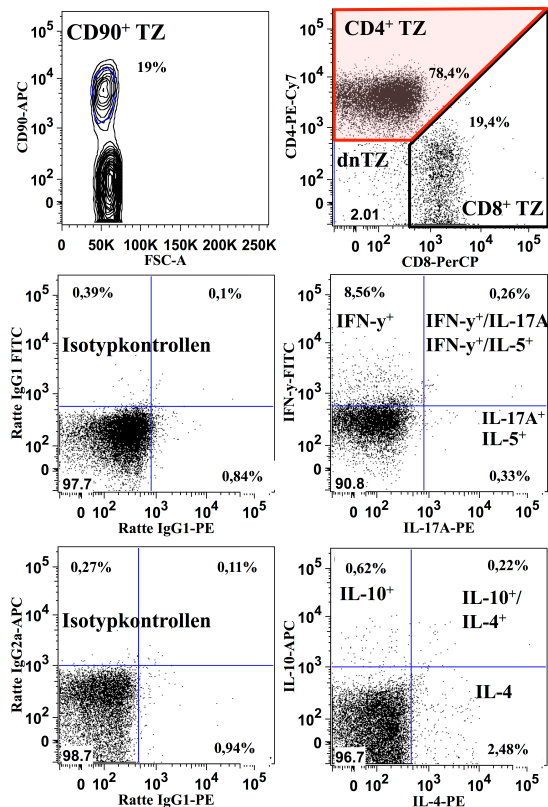


Abb. 6.6 Zytokinproduktion von dnTz in der Milz von LD- und HD-Mäusen

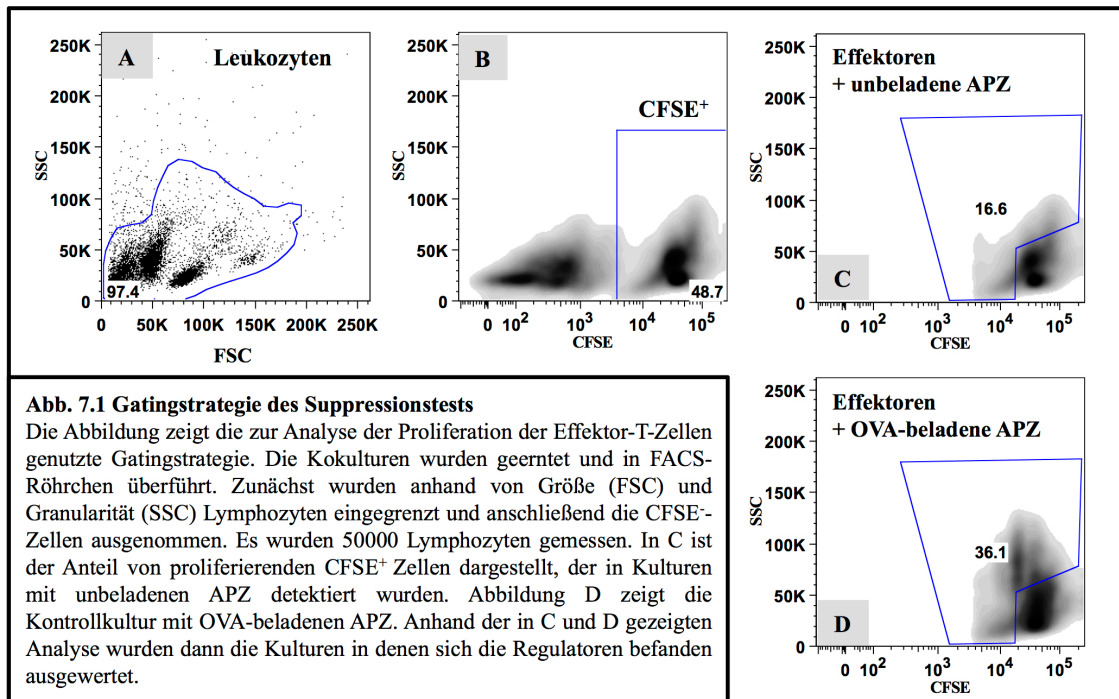
5x10⁶/ml Milzzellen aus LD und HD-Mäusen wurden ohne (weiße Balken) und mit 100 µg OVA (schwarze Balken) bei 37°C und 10% CO₂ für 72 h kultiviert. Nach der Kulturphase wurden die Zellen geerntet und mit Ionomycin, PMA und Brefeldin A für 4 Stunden stimuliert. (A) Anschließend wurden die Oberflächenantigene CD90.2, CD4 und CD8 mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Zur spezifischen Analyse wurden zunächst die CD90.2⁺ T-Zellen eingegrenzt. Anschließend wurden innerhalb dieser Population die CD4⁺ T-Zellen (rote Markierung) auf die Expression von IL-5, IL-10 und IL-4 und IFN-γ, IL-17A untersucht. Als Isotypkontrollen für die Färbung der intrazellulären Zytokine dienten Ratte IgG1-FITC (IFN-γ) IgG1-PE (IL-5, IL-17A), und IgG2a-APC (IL-4, IL-10). (B) Die Werte repräsentieren die Mittelwerte als % ± SD von 4 individuellen Mäusen pro Gruppe erhoben in einem Experiment repräsentativ für 2 Experimente. Kreuze geben Signifikanzen zwischen LD und HD-Mäusen an (*p=0,05). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen - OVA und + OVA (*p=0,05, ***p=0,001). N.s.= nicht signifikant.

III.7. Funktionelle Analyse der dnTZ aus LD- und HD-Mäusen

Die Rolle von dnTZ in der Xenotransplantation wurde bereits eingehend untersucht. Es wurde beschrieben, dass dnTZ supprimierend auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wirken können (139, 140). DnTZ können in vitro MHC/Peptid-Komplexe von APZ übernehmen und in Kombination mit dem TZR an autoreaktive CD8⁺ T-Zellen präsentieren, ein Vorgang der Trogozytose genannt wird (131). Die cytolytische Wirkung von dnTZ wurde von anderen Gruppen untersucht. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass dnTZ über einen Fas/FasL- abhängigen bzw Perforin/ GranzymB- abhängigen Mechanismus CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen supprimieren können (131, 138, 141). Auch in der Konkurrenz um den T-Zell-Waschtumsfaktor IL-2 werden dnTZ diskutiert (131, 133, 141, 175).

Die Wirkungsweise von dnTZ wurde bislang hauptsächlich an artifiziellen dnTZ-Klonen untersucht. In dieser Arbeit sollte die ex vivo regulatorische Kapazität von T-Zellen aus LD- bzw. HD-Mäusen untersucht werden. Dazu wurde ein OVA-spezifisches Kokultursystem entwickelt, in dem zunächst PanTZ aus LD und HD-Mäusen als Regulatoren getestet wurden.

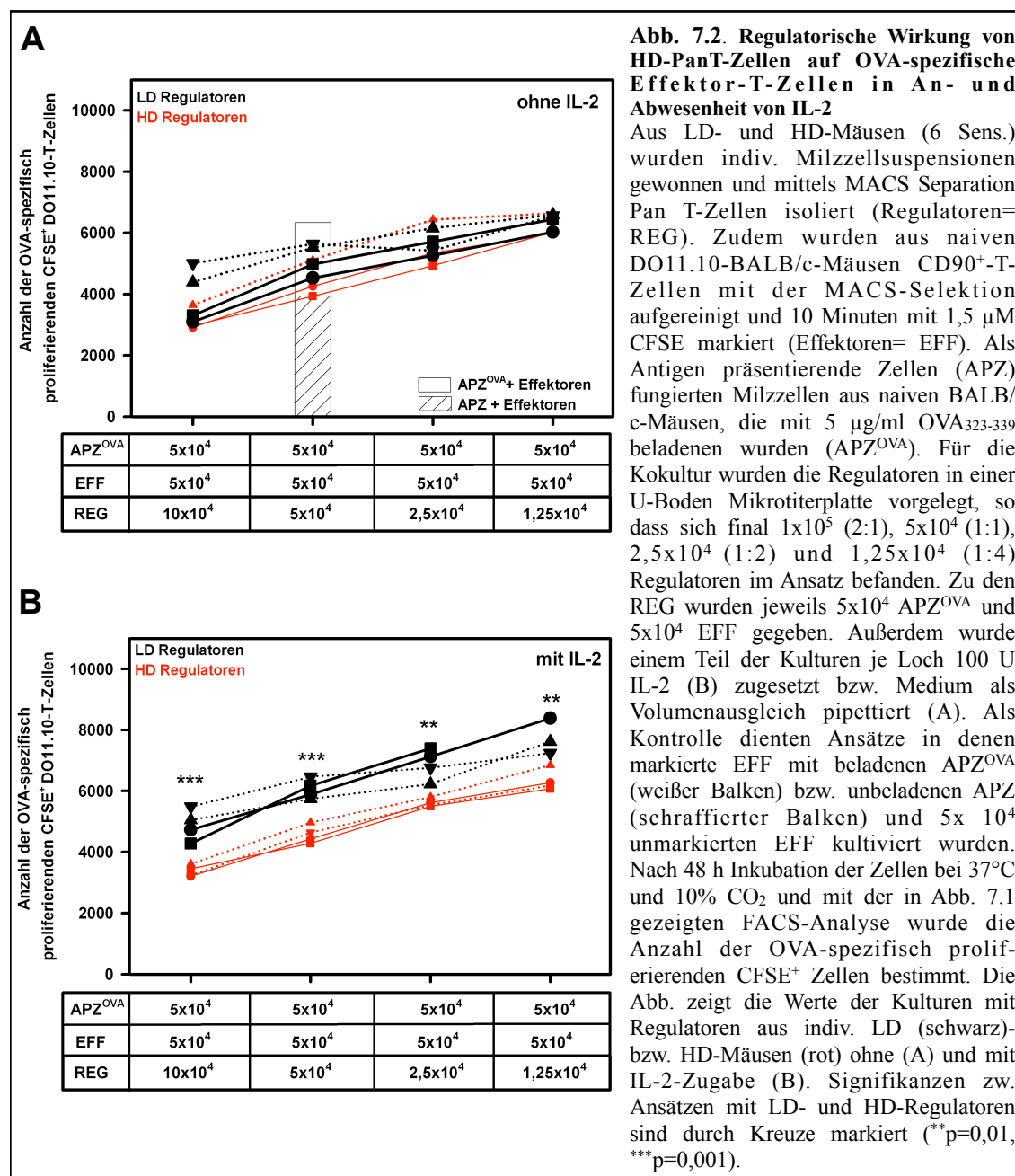
Als Effektoren dienten CD90⁺ T-Zellen aus DO11.10 BALB/c Mäusen, die zu über 98% einen für OVA spezifischen TZR tragen. Diese Effektoren wurden mit fluoreszierendem CFSE markiert, um später deren Proliferation messen zu können (Abb. 7.1 B). Die Menge des von den Zellen gebundenen CFSE wird bei der Zellteilung halbiert und an Tochterzellen übertragen. Somit war es möglich über die Abnahme des CFSE-Signals in der durchflusszytometrischen Analyse eine Aussage zur Proliferation der markierten OVA-spezifischen T-Zellen zu treffen. Zur OVA-spezifischen Stimulation der Effektoren wurden Milzzellen aus naiven BALB/c Mäusen isoliert und unbeladelt belassen (APZ) bzw. mit 5 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid beladen (APZ^{OVA}). Die Kokultur von Effektoren mit unbeladenen APZ führte zu einer spontanen Proliferation der mit CFSE markierten T-Zellen von 16,6% (Abb. 7.1 C).



Effektoren, die mit APZ^{OVA} stimuliert wurden zeigten eine Erhöhung der Proliferation auf 36,1% (Abb. 7.1 D). Anhand dieser OVA-spezifischen Proliferation wurden die Kokulturen denen Regulatoren zugesetzt wurden ausgewertet.

Zur Gewinnung der Regulatoren aus LD (schwarze Linien) und HD-Mäusen (rote Linien) wurden PanTZ mittels magnetischer Separation aus je 4 Tieren separat aufgereinigt und in absteigender Zellzahl zu den Kokulturen aus 5×10^4 Effektoren und 5×10^4 APZ^{OVA} gegeben. Die Abbildung 7.2 A zeigt die Anzahl proliferierender CFSE⁺-T-Zellen in 50000 gemessenen Leukozyten. Die Balkendiagramme geben die Proliferation von Effektoren an, die mit unbeladenen APZ kultiviert wurden (schraffiert) bzw. mit APZ^{OVA} (weiß) OVA-spezifisch stimuliert wurden. Außerdem wurden diesen Kontrollkulturen 5×10^4 unmarkierte T-Zellen zugesetzt, um eine vergleichbare Zelldichte zu den Kokulturen mit Regulatoren zu erreichen. Allerdings wurde dies aufgrund der Menge der Ansätze nur für das Verhältnis 1:1 von Effektoren zu Regulatoren durchgeführt. Durch die Zugabe von LD-Regulatoren konnten im Vergleich zu OVA stimulierten Kontrollen (6332 proliferierende Zellen) im Mittel 5165 OVA-spezifisch proliferierende Zellen detektiert werden. Ebenso führte die Anwesenheit von HD-Regulatoren zu einer schwachen Inhibition der Effektor-Proliferation (5312). Es konnte demnach kein signifikanter Unterschied in der regulatorischen Kapazität von LD und HD-Regulatoren festgestellt werden. Dies ist vielleicht der Anwesenheit von

natürlichen Treg in den PanTZ-Präparationen geschuldet. Tregs vermitteln ihre suppressive Kapazität unter anderem über die Limitation von IL-2. Durch die exogene Zugabe von IL-2 sollte die Wirkung von nTreg im Test gehemmt werden.



Die Abbildung 7.2 B zeigt die Kokulturen mit exogener Zugabe von IL-2. In Anwesenheit von IL-2 konnte ein signifikanter Unterschied in der suppressiven Kapazität von LD- und HD-Regulatoren festgestellt werden. In den Kokulturen (1:1) denen HD-Regulatoren zugegeben wurden waren signifikant weniger OVA-spezifische proliferierende CFSE⁺ T-Zellen zu finden (4582) als in Kulturen mit LD-Regulatoren (6982). Die Angaben der proliferierenden Zellen wurden in Abb. 7.2 in absoluten

Zellzahlen angegeben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Auswertung der prozentualen Anteile proliferierender Zellen keine Unterschiede zwischen LD- und HD-Ansätzen lieferten (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung erklärte sich dadurch, dass bei einem EFF:REG-Verhältnis von z.B. 1:1 in den Ansätzen mit HD-Regulatoren die Gesamtanzahl der CFSE⁺ DO11.10 T-Zellen (Abb. 7.3 B) signifikant reduziert war (11532) im Vergleich zu Ansätzen mit LD-Regulatoren (14573).

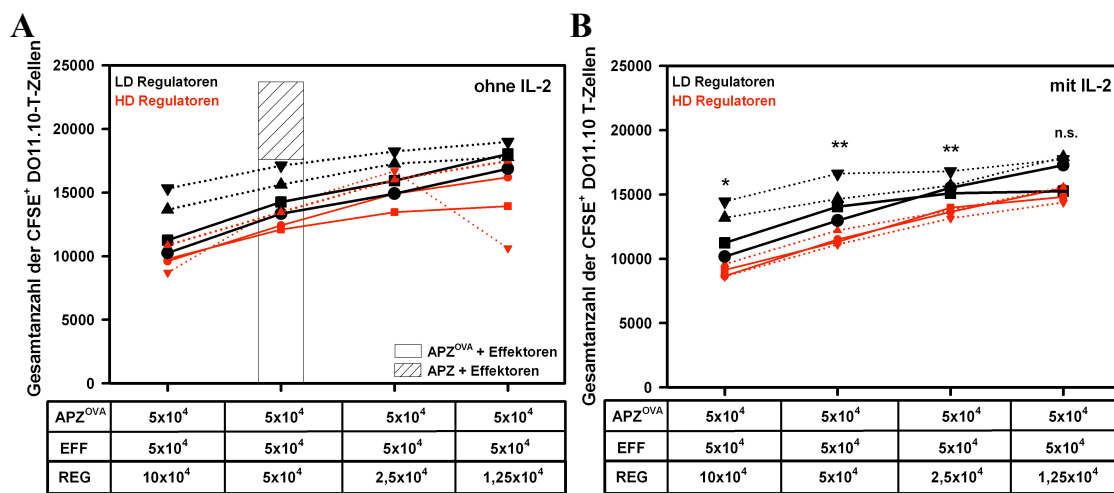


Abb. 7.3 Anzahl der verbliebenen CFSE⁺ Effektor-T-Zellen in Kulturen mit LD- und HD-Regulatoren in An- und Abwesenheit von IL-2

Die Abbildung zeigt die Anzahl der CFSE⁺ Effektor-T-Zellen in den Kokulturen mit OVA-beladenen APZ (APZ^{OVA}) und unterschiedlichen Zellzahlen von Pan-T-Zellen (Regulatoren) aus LD (schwarz)- und HD-Mäusen (rot). Die Darstellung A bezieht sich auf Kulturen ohne IL-2-Zugabe und B auf Kulturen mit Zusatz von 100 U IL-2. Die Balken geben die Werte für Kontrollkulturen an, denen unbeladene APZ (schraffierte Balken) bzw. APZ^{OVA}, jedoch keine Regulatoren, sondern unmarkierte Effektor-T-Zellen zum Dichteausgleich zugesetzt wurden. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kulturen mit LD- bzw. HD-Regulatoren (*p=0,05; **p=0,01). N.s.= nicht signifikant.

Die Anwesenheit von HD-Regulatoren führte somit zu einem dosisabhängigen Zellverlust auf Seite der CFSE⁺ Effektor-T-Zellen, der in den Ansätzen mit IL-2 (Abb. 7.3 B) im Vergleich zu LD-Regulatoren statistische Signifikanz erreichte ohne exogenes IL-2 jedoch auch auftrat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Applikationen von hohen Antigen Dosen T-Zellen induziert werden, die OVA-spezifische Effektor-T-Zellen in Anwesenheit von exogenem IL-2 in ihrer Proliferation hemmen können.

IV. Diskussion

IV.1. Die Rolle der Antigenexposition in der Regulation der IgE-Produktion im Mausmodell

Die Applikation von hohen Antigenexpositionen im Rahmen der spezifischen Immuntherapie (SIT) bietet derzeit die einzige kausale Therapiemöglichkeit von Allergikern. Es ist bekannt, dass aus der wiederholten Applikation von tolerierten hohen Antigenexpositionen über eine Zeitspanne von drei bis fünf Jahren langanhaltende Therapieeffekte resultieren (176, 177). Die Wirkmechanismen denen die SIT unterliegt, sind hierbei noch nicht vollständig untersucht. Ziel einer erfolgreichen SIT ist das Erreichen einer peripheren Toleranz und eine Reduktion der IgE-vermittelten Freisetzung von Mediatoren aus Basophilen und Gewebsmastzellen (178).

Für Bienengift- und Katzenhaarallergene wurde bereits veröffentlicht, dass die Exposition mit hohen Antigenexpositionen eine Toleranzinduktion zur Folge hatte (86, 179). Imker, die zu Beginn der Bienensaison Bienenstichen und damit dem Allergen ausgesetzt waren, litten zu Anfang der Saison noch unter starken kutanen Spätreaktionen. Im Verlauf der Saison führte jedoch der vermehrte Kontakt mit dem Allergen in Form von erhöhtem Stichaufkommen zu einer Reduktion der kutanen Spätreaktion. Außerdem war die Produktion von TH1- und TH2-Zytokinen und die Proliferationskapazität von allergenspezifischen T-Zellen in Zeiten hoher Allergenexposition reduziert. Darüber hinaus wurde diese Toleranzinduktion durch IL-10 produzierende Tr1-Zellen vermittelt (86, 180). Nach Ende der Bienensaison, also mit dem Wegfallen der Allergenexposition, kehrte die Reaktivität auf die Bienenstiche zur Ausgangssituation vor der Saison zurück. Für Katzenhaarallergene wurde berichtet, dass eine hochdosierte Exposition mit dem Allergen eine Toleranzinduktion zur Folge hat, die durch den Anstieg des allergenspezifischen IgG4-Gehalts im Serum und die Induktion von IL-10 produzierenden Tr1-Zellen gekennzeichnet ist (179). Während einer erfolgreichen SIT werden adaptive regulatorische T-Zellen (Tregs) gebildet, die IL-10 produzieren und suppressiv auf allergenspezifische T-Zellantworten in der Peripherie wirken (161).

In ähnlicher Weise führt die Sensibilisierung mit hohen Antigenexpositionen in Mausmodellen zu einer geringeren IgE-Produktion, einhergehend mit einer gesteigerten IgG-

Produktion. Die Immunisierung mit niedrigen Dosen eines Antigens hat dagegen eine effektivere Induktion von IgE-Antikörpern zur Folge (97, 181). Das Fehlen von IgE-Antikörpern in hochdosig immunisierten Mäusen ist jedoch nicht bedingt durch eine vermehrte Aktivierung von TH1-Zellen in diesen Tieren (98, 99). B-Zellen aus hochdosig immunisierten Mäusen produzieren nach Restimulation mit dem relevanten Antigen *in vitro* große Mengen von spezifischen IgE-Antikörpern (182). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es *in vivo* einen suppressiven Mechanismus geben muss, der die Entwicklung IgE-produzierender B-Zellen in einem IgG1-exprimierenden Stadium arretiert hält. In den beschriebenen Untersuchungen zur antigendosis-abhängigen Regulation von IgE-vermittelten Immunantworten wurde in den meisten Fällen das Antigen zusammen mit dem Adjuvanz Aluminiumhydroxid (Alum) intraperitoneal verabreicht. In den Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit hatte die intraperitoneale Applikation von hohen Dosen KLH/Alum nur geringere IgE-Antwort zur Folge wohingegen niedrige Dosen eine sehr effektive IgE-Produktion nach sich zogen (99). Die Verwendung von Alum ist jedoch in antigenspezifischen Mausmodellen aufgrund seiner starken antigenunabhängigen Wirkungsweise zum Beispiel über die Aktivierung des Inflammasoms mehrfach kontrovers diskutiert worden (78, 156). Auch KLH ein natürlich vorkommendes respiratorisches Protein aus der Schlüssellochschncke, gilt als sehr immunogen und potent in der Auslösung von T- und B-Zellantworten. KLH wird aufgrund seiner adjuvanten Wirkung in der Klinik im Zusammenhang mit Tumorstoffen eingesetzt (183, 184). In weiterführenden Studien im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde aus diesem Grund das klinisch relevante Allergen aus dem Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) ohne die Verwendung eines Adjuvanz subkutan in das Nackenfell der Versuchstiere injiziert, um der klinischen Situation während der spezifischen Immuntherapie von Patienten auch mit dem verwendeten Mausmodell möglichst nahe zu kommen (157).

Zunächst konnte mittels ELISA bestätigt werden, dass die adjuvanzfreie subkutane Applikation von niedrigen Dosen KLH (0,1 µg; K01) eine IgE-Produktion induzierte, die nach subkutaner Applikation von hohen Dosen KLH (100 µg; K100) ausblieb (Abb. 1.1). Die Induktion der IgE-Produktion nach subkutaner Applikation von Antigenen ist demnach wie die intraperitoneale Applikationsroute einer antigendosis-abhängigen Regulation unterworfen. Neben der Reduktion der IgE-Produktion, kam es in den in

K100-Tieren zu einer starken Produktion von antigenspezifischen IgG-Antikörpern, die in K01-Tieren deutlich reduzierter auftrat (Abb. 1.2). Die massive Induktion von IgG-Antikörpern, die vor allem nach Applikation von hohen Antigen Dosen auftrat, machte es notwendig die mittels ELISA gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf die IgE-Produktion anhand eines funktionellen Tests zu verifizieren. Um auszuschließen, dass die geringere Frequenz von IgE-Antikörpern im Serum von K100-Mäusen aufgrund eines kompetitiven blockierenden Effekts der IgG-Antikörper im ELISA zu Stande gekommen war, wurden die Seren der Tiere im RBL-Test auf ihre Fähigkeit untersucht eine IgE-vermittelte Degranulation der Granulozyten-Zelllinie RBL (rat basophilic leukemia) hervorzurufen. Die Inkubation von RBL-Zellen mit den Seren aus K01-Mäusen führte im Vergleich zu Seren aus K100-Mäusen zu einer signifikant stärkeren Freisetzung von β -Hexosaminidase aus den RBL-Zellen (Abb. 1.3). Sowohl quantitativ im ELISA, wie auch funktionell im RBL-Test wurde bestätigt, dass es auch nach subkutaner Applikation von hohen Antigen Dosen ohne Adjuvanz zu einer reduzierten Produktion von funktionellen IgE-Antikörpern kommt. Die antigen dosisabhängige Regulation der IgE-Antwort, die nach Applikation von KLH gefunden wurde, bestätigte sich auch mit dem Allergen OVA. Nach Applikation von niedrigen OVA-Dosen wurde eine starke IgE-Induktion beobachtet, die mit hohen Dosen nur marginal ausfiel. Außerdem wurde wie bereits für KLH s.c. beschrieben wurde im Gegenzug vermehrt IgG1 und IgG2a nach Applikation von Hochdosen gefunden. Auch für andere klinische relevante Antigene, wie Phospholipase A₂ wurde eine antigen dosisabhängige Regulation der IgE-Produktion beschrieben, so dass man von einem generalisierten Mechanismus der IgE-Regulation durch Hochdosen sprechen kann (97).

Im Zusammenhang mit OVA-basierten Allergiemodellen in der Maus wird auch immer wieder die Rolle von LPS-Kontaminationen in den verwendeten OVA-Präparationen auf die ausgelöste Immunantwort beschrieben. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Applikation von OVA/Alum in Kombination mit TLR-4 Liganden wie LPS dosisabhängig die IgE und IgG-Induktion, sowie die Ausbildung einer Atemwegs-inflammation vermindern kann (185). Andere Studien belegen, dass LPS/OVA-stimulierte BMDC über die vermehrte Produktion von IL-10 durch interagierende T-Zellen eine reduzierte IFN- γ und IL-5 Sekretion in vitro zeigten (186). Für das in dieser Arbeit verwendete subkutane OVA-Modell konnte gezeigt werden, dass in LPS-

insensitiven Mausstämmen unabhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse ebenfalls eine antigendosis-abhängige Regulation der IgE-Produktion beobachtet werden kann (Abb. 2.4). Die Reduktion der IgE-Produktion durch hohe Antigendosen ist also nicht der erhöhten Applikation von LPS-Kontaminationen innerhalb der hohen Allergendosis geschuldet.

Im Hinblick auf die vielfach diskutierten protektiven Effekte einer hochdosigen Allergenexposition z.B. bei Katzenhaarallergien (179), war nun interessant zu sehen, ob die wiederholte Injektion von hohen Antigendosen einen Effekt auf eine spätere Sensibilisierung und die damit verbundene IgE-Produktion hat und somit einer Vakzinierung gegen die entstehende Typ 1 Sensibilisierung gleichkäme. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum prophylaktischen Effekt einer hochdosigen Vakzinierung zeigen, dass in Tieren, die mit hohen Dosen behandelt wurden, die spätere Auslösung einer IgE-Antwort durch die Applikation von niedrigen Antigendosen nicht mehr möglich ist. Es konnte sowohl für die prophylaktische subkutane Applikation von KLH (Abb. 1.4) wie auch für die subkutane Gabe von OVA (Abb. 2.5) nachgewiesen werden, dass in mit hohen Dosen vakzinierten Tieren keine signifikante IgE-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr induzierbar war. Die Sensibilisierung mit hohen Antigendosen führte somit in den Mäusen zu regulatorischen Mechanismen, welche die Ausbildung einer Sensibilisierung gegen das Antigen verhinderten.

Es stellte sich weiter die Frage, ob die beobachtete Inhibition der IgE-Produktion nach wiederholter Applikation von Hochdosen spezifisch für das verabreichte Antigen ist oder ob auch die spezifische IgE-Produktion gegen andere Antigene unterdrückt ist. Die Vakzinierung mit hohen Dosen OVA bedingte zwar eine Inhibition der OVA-spezifischen, nicht aber der KLH-spezifischen IgE-Produktion und bestätigte somit eine OVA-spezifische Inhibition der IgE-Produktion durch die Applikation von hohen OVA-Dosen (Abb. 2.6).

Für die Therapie von Patienten, bei denen eine Sensibilisierung erfolgt und damit allergenspezifisches IgE messbar ist, wird die wiederholte Gabe von Hochdosen als Therapie eingesetzt. Ein Ziel der Versuche in dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die therapeutische Gabe von hohen Antigendosen eine Auswirkung auf die etablierte IgE-Antwort im Mausmodell hat und welche Mechanismen in den Mäusen, die mit

hohen Dosen therapiert wurden wirken. Dazu wurde zunächst untersucht, ob eine etablierte IgE-Immunantwort in den Tieren durch die Gabe von hohen Antigen Dosen im KLH-Modell, wie im OVA-Modell reduziert werden kann. Durch die therapeutische Gabe von hohen Dosen KLH (Abb. 1.5) bzw. OVA (Abb. 2.7) in niedrigdosig sensibilisierte Mäuse konnte zunächst nach der ersten Applikation ein sehr starker Anstieg der IgE-Produktion beobachtet werden, welcher über den weiteren Verlauf von insgesamt fünf Applikationen abnahm. Der starke Anstieg der IgE-Produktion nach der ersten Applikation ist durch die Existenz von IgE-produzierenden B-Gedächtniszellen zu erklären, die in der Peripherie zirkulieren und durch den erneuten Kontakt mit hohen Konzentrationen des Antigens zur Produktion von IgE-Antikörpern angeregt werden (187, 188). Allerdings konnte über die Behandlungsdauer von fünf therapeutischen Applikationen kein statistisch signifikanter Therapieerfolg im Hinblick auf die IgE-Produktion festgestellt werden, es zeigte sich aber eine Tendenz zu einer Reduktion des IgE-Gehalts. Die Ergebnisse sind konsistent mit bereits veröffentlichten Daten zur SIT bei Bienengiftallergikern (VIT= venom immunotherapy) mithilfe eines Ultrarush-Verfahrens. Bei dieser Variante der VIT wird die Erhaltungsdosis durch mehrfache Injektionen pro Tag bereits früher erreicht, was die Behandlungsdauer auf wenige Wochen verkürzen kann. Zu Anfang der Therapie zeigten die Patienten ebenfalls einen Anstieg der allergenspezifischen IgE-Produktion die über den Therapieverlauf jedoch abnahm (189). In der vorliegenden Arbeit, konnte die IgE-Produktion jedoch nicht soweit reduziert werden, dass die IgE-Titer statistisch signifikant unterhalb derer von Tieren lagen, die durchgängig mit niedrigen, IgE-induzierenden Dosen des Allergens behandelt wurden. Dies kann zum einen daran liegen, dass der Analysenzeitraum von 5 Injektionen zu kurz gewählt war und die gezeigte Tendenz zu einer Abnahme der IgE-Produktion über einen längeren Analysenzeitraum sich weiter verstärken würde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die fünfmalige Gabe der therapeutischen Hochdosis zwar die zirkulierenden IgE-produzierenden B-Gedächtniszellen beeinflusst werden, die langlebigen Plasmazellen im Knochenmark jedoch nicht angreifbar sind und es somit nicht möglich war die IgE-Produktion unter ein gewisses Niveau zu reduzieren (187, 188). Dass IgE-produzierende Plasmazellen nicht kurzlebig sind, sondern unter Umständen Monate in Milz und Knochenmark persistieren können, wurde bereits 2009 gezeigt (190). Die Inhalation von OVA-Aerosolen führte in

systemisch sensibilisierten Mäusen zur Aktivierung von IgE-, IgA und IgG-produzierenden Plasmazellen. Eine Behandlung mit Cyclophosphamid hatte eine Depletion von proliferierenden Plasmablasten in der Lunge zur Folge. Terminal differenzierte Plasmazellen in Milz und Knochenmark überlebten aber und waren auch nach der Cyclophosphamid-behandlung noch in der Lage IgE, IgA und IgG zu produzieren (190).

Neben den Auswirkungen einer Verabreichung von Hochdosen auf die humorale Immunantwort wurde auch der Einfluss auf die systemische Produktion von TH2-Zytokinen in der Milz untersucht. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Antigenosis Einfluss auf die Polarisierung von T-Zellantworten haben kann. So gibt es Untersuchungen, dass die Applikation von hohen Antigenosen oder eine stärkere T-Zell-Rezeptoraffinität T-Zellen in TH1-Richtung polarisiert und es somit zur vermehrten Sekretion von IFN- γ und einhergehend damit zu einer verminderten IL-5 Produktion kommt (191). Auch die Struktur des Antigens kann neben der Dosis einen starken Einfluss auf die ausgelöste Immunantwort haben. Cunningham et al. publizierten 2012, dass die Proteaseaktivität des Hausstaubmilbenantigen Der p1 in niedrigen Dosen einen Adjuvanzeffekt auf die TH2-Antwort hat. In den Untersuchungen zur Rolle der Antigenosis im subkutanen Modell der IgE-vermittelten Immunantwort konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die subkutane Sensibilisierung insgesamt zu einer TH2-polarisierten Immunantwort führte (192). Die TH2-polarisierte Antwort war signifikant reduziert in HD-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen. Die Analyse von stimulierten Milzzell-Kulturüberständen aus HD-Mäusen hatte eine signifikant reduzierte Sekretion der TH2-Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 und des TH17 Zytokins IL-17A im Vergleich zu LD-Mäusen im Überstand von Kulturen zur Folge. Im Gegenzug wurde jedoch keine vermehrte Induktion der IFN- γ -Produktion beobachtet (Abb 3.2). Die Ergebnisse der Zytokinmuster und auch die beobachtete Hypoproliferanz von restimulierten HD-Milzzellen (Abb. 3.1) lassen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Barwig et al., darauf schließen, dass es nach Applikation von hohen Antigenosen nicht zu einer verminderten TH-2-Antwort aufgrund einer Verschiebung der T-Zellantwort in TH1-Richtung kommt. Barwig et al konnten zeigen, dass in Mausstämmen, die Defizienzen in der TH1-Polarisation aufweisen, ebenfalls eine antigenosisabhängige Regulation der IgE-Antwort zu finden ist (99). Aufgrund

der reduzierten TH2-Zytokinsekretion und der Hypoproliferation von Milzzellen ist anzunehmen, dass es nach Applikation von Hochdosen zu einer verminderten Reaktivität im T-Zellkompartiment kommt.

IV.2. Die Rolle der Antigenosis im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Dass die Antigenosis nicht nur auf Ebene des IgE eine entscheidende Rolle spielt, zeigt sich bei jedem Allergiker, der in Zeiten erhöhten Pollenflugs die lokalen Auswirkungen seiner Allergie in Nase und Augen, als Rhinokonjunktivitis spürt. Eine immer häufigere Form der allergischen Symptomatik vor allem bei Kindern ist das allergische Asthma, welches wie andere allergische Erkrankungen mit der Bildung von IgE-Antikörpern verbunden ist (193). IgE-Antikörper können von zwei Rezeptoren erkannt werden. Der niedrigaffine FcERII-Rezeptor (CD23) wird vor allem von B-Zellen und myloiden Zellen exprimiert und ist an der Regulation der IgE-Synthese durch B-Zellen beteiligt. Außerdem gibt es Berichte, dass CD23 eine Rolle bei der Antigenpräsentation spielt (194). Im Menschen exprimieren Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten vor allem den hochaffinen IgE-Rezeptor (FceRI). Die physiologische Bedeutung der IgE-Antikörper liegt in der Abwehr von Parasiten, wie zum Beispiel Helminthen. IgE hat in der parasitären Immunabwehr eine opsonisierende Wirkung und kann im Zusammenspiel mit den hochaffinen IgE-Rezeptoren auf Effektorzellen die Zerstörung des Parasiten durch die Freisetzung von u.a. biogenen Aminen und toxischen Mediatoren aus den Effektoren herbeiführen. In der Allergie ist die mastzellstimulierende Wirkung von allergenbindenden IgE-Antikörpern und deren Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors mit den klinischen Symptomatiken, wie Gewebeschädigung und Bronchokonstriktion assoziiert. Dass die Aktivierung des FceRI-Signalwegs eine entscheidende Rolle beim Asthma spielt, wurde durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen IgE (Omalizumab) gezeigt. Die Neutralisation von löslichem IgE durch die therapeutische Einnahme von Omalizumab in moderaten bis schweren Asthmatikern hatte eine Reduktion der Eosinophilie und der Anzahl von submukosalen B- und T-Zellen zur Folge. Außerdem zeigte sich in Patienten mit allergischer Rhinitis eine Reduktion des saisonalen Anstiegs von zirkulierenden und lokalen Eosinophilen (195). Im Mausmodell gibt es zur Korrelation zwischen

Atemwegsentzündung und IgE-Konzentrationen im Serum unterschiedliche Berichte. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die, durch die hochdosig Immunisierung ausgelöste, reduzierte Produktion von IgE-Antikörpern einen Einfluss auf das Ausmaß der Atemwegsentzündung hat. Die Ergebnisse in Abb. 4.2 zeigen, dass eine Sensibilisierung mit niedrigen Antigen Dosen zu einer Atemwegshyperreaktivität (AHR) nach intranasaler Provokation mit dem Antigen führte, wohingegen Tiere, die mit hohen Antigen Dosen sensibilisiert wurden eine signifikant reduzierte AHR aufwiesen. Zur Klärung der Frage, ob die Menge der IgE-Antikörper direkt mit der Atemwegsreaktivität korreliert, müssten allerdings Experimente durchgeführt werden, in denen die IgE-Produktion blockiert ist. Solche Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es gibt allerdings Berichte, die zeigen dass die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen IgE auch in einem OVA basierten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung die Ausbildung einer AHR verhindern konnte (196). Hamelmann et al. (1999) konnten auf der anderen Seite in älteren Studien zeigen, dass die Korrelation von IgE-Sensibilisierung und allergischer Inflammation sehr stark abhängig ist von der Applikationsroute der Sensibilisierung (165). Sie fanden, dass in Mäusen, die passiv mit OVA-spezifischen IgE-Antikörpern behandelt wurden die Anwesenheit von IgE für die Ausbildung einer AHR essentiell ist, jedoch nicht per se an der Ausbildung der Atemwegsinfammation beteiligt ist. Ebenso korrelierte in systemisch mit OVA und Adjuvanz behandelten Mäusen die IgE-Antwort nicht mit der allergischen Atemwegsinfammation. Das zeigte sich besonders eindrucksvoll in B-Zell-defizienten and Mastzell-defizienten Tieren, sowie in Mausstämmen, die dafür bekannt sind eine geringe IgE-Antwort auszubilden (C57BL/6) und in mit Anti-IgE-behandelten BALB/c-Mäusen, die eine starke IgE-Antwort zeigen, denn auch diese Stämme waren in der Lage eine Atemwegsinfammation zu entwickeln (165). Die Applikation von hohen Antigen Dosen über die subkutane Route hatte nicht nur eine Reduktion der AHR zur Folge, sondern zeigte außerdem eine reduzierte Produktion von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit (Abb. 4.4). Die Wirkung von IL-5 wird vor allem in der Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen diskutiert. Aus diesem Grund wurde die Einwanderung von Granulozyten in die Lunge untersucht. Es zeigte sich, dass die beobachtete Reduktion der IL-5 Sekretion in der Lunge keine Auswirkung auf die Einwanderung von Eosinophilen hatte (Abb. 4.3). Die Applikation von hohen Antigen Dosen führte

zwar zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen, resultierte jedoch in einer starken Eosinophilie. Es bestätigte sich die Annahme, dass es nach Applikation von hohen Dosen OVA nicht zu einer Verschiebung der T-Zell-Polarisation kommt, sondern, dass die Aktivierung der TH2-Zellen reguliert wird, da die Produktion von IFN- γ in der BAL-Flüssigkeit von HD-Mäusen nicht erhöht war (Abb. 4.4). Durch die subkutane Immunisierung wurde eine TH2-Antwort in der Lunge induziert, gekennzeichnet durch eine starke Produktion von IL-5. Die Sensibilisierung von Mäusen mit hohen Antigendosen führte demnach zu einer reduzierten AHR und einer geringeren Aktivierung von TH2-polarisierten T-Zellen in der Lunge. Allerdings spiegelte sich die reduzierte pulmonare TH2-Antwort nicht im Ausmaß Infiltration von der eosinophilen Granulozyten in die Lunge wieder. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls keine Korrelation zwischen Eosinophilie und AHR fanden (197, 198).

In Abb. 4.7 konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die subkutane Gabe von hohen Antigendosen im Mausmodell der spezifischen Immuntherapie eine therapeutische Reduktion der Atemwegsreaktivität erreicht werden konnte. Die Immunisierung mit hohen Antigendosen scheint demnach nicht nur die systemische IgE-Immunantwort (Abb. 2.1), sondern auch die bereits bestehende lokale TH2-vermittelte Immunreaktion in der Lunge zu beeinflussen. Wie schon für die systemische Reaktion in der Milz konnte auch für die Reaktion in der Lunge eine verminderte Reaktivität der T-Zellen in Form der Zytokinsekretion nach Applikation von hohen Antigendosen beobachtet werden. Diese Hinweise auf eine Toleranzinduktion im T-Zellkompartiment könnten auf die Induktion oder Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) hinweisen.

Barwig et al. beschrieben 2010 bereits für das KLH-Modell die Induktion von CD4⁺CD8⁻ dnTZ mit regulatorischer Kapazität (99). Außerdem gibt es Berichte, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen über Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion eine Rolle in der Suppression von allergenspezifischen TH1- und TH2-Antworten spielen (102, 199).

IV.3. Die Rolle von CD4⁺CD8⁻ doppelt negativen T-Zellen in der Regulation der IgE-Produktion

Die periphere T-Zell-Toleranz ist ein essentieller Schritt in einem erfolgreichen Therapieverlauf während einer Allergen-SIT. Hierbei werden zwei grundlegende Mechanismen unterschieden: zum einen die Anergie von Effektorzellen und die Induktion oder Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Treg). Unter Anergie versteht man die Entkopplung des Antigenrezeptors von den nachgeschalteten Signalwegen in zum Beispiel T-Zellen, wodurch diese unreaktiv werden. Bei regulatorischen T-Zellen unterscheidet man zwischen natürlich vorkommende CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Treg (nTreg), die im Thymus entstehen und den sogenannten induzierbaren Treg (iTreg), die sich z.B. vor allem durch die Sekretion des immunmodulatorischen Zytokins IL-10 auszeichnen (Tr1). Anomalien im Foxp3-Lokus haben beim Menschen den Verlust funktioneller nTreg zur Folge und ziehen schwere allergische und autoimmune Krankheitsbilder nach sich (115, 200). Das Fehlen von nTreg führt im Mausmodell zu einer allergischen Atemwegsentzündung, einer Überproduktion von IgE-Antikörpern (Hyper-IgE-Syndrom), sowie einer massiven Einwanderung von Eosinophilen in die Gewebe (201). Allergiker verfügen wie gesunde Menschen über Effektorzellen vom TH1- und TH2-Typ sowie regulatorisch wirksame T-Zellen. Bei einem Allergiker ist das Verhältnis dieser T-Zellpopulationen allerdings verschoben. Man nimmt an, dass die Kontrolle der TH2-Antwort durch regulatorische T-Zellen im allergischen Patienten gestört ist (202).

Natürliche und induzierbare Treg sind nicht nur in der Lage die TH2-Antwort durch eine Reduktion der Produktion von IL-4, IL-13, IL-9 und IL-5 zu modulieren (203), sondern haben auch direkten Einfluss auf Mastzellen, Basophile und dendritische Zellen. Regulatorische T-Zellen können zum Beispiel über die Interaktion von OX40/OX40L die Degranulation von Mastzellen regulieren (204) oder über die Kontrolle des Isotyp-Klassenwechsels die Induktion einer IgE-vermittelten Immunität zugunsten von IgG4 und IgA beeinflussen (86, 199). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Frequenz von CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl und Frequenz von CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T-Zellen zwischen LD- und HD-Mäusen nicht signifikant variierte (Abb. 5.1). Dies bestätigt frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe

aus dem Jahr 2010 (99). Nach der Applikation von hohen Dosen KLH (K100) adsorbiert an Alum konnten keine Unterschiede in der Frequenz von konventionellen regulatorischen T-Zellen gefunden werden, im Vergleich zu Tieren, die mit niedrigen Dosen KLH (K01) immunisiert wurden. Es zeigte sich außerdem, dass CD4⁺ T-Zellen aus K01- und K100-Mäusen keine Unterschiede in der Expression von Treg-assoziierten Molekülen, wie TGF-β1 und IL-10 aufwiesen (99). Ein vermehrtes Auftreten von CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T-Zellen nach Applikation von hohen Antigendosen scheint demnach nicht für die Regulation der IgE-Produktion in HD-Mäusen ursächlich zu sein. In den Arbeiten von Barwig et al. (2010) zeigte sich außerdem, dass es keine Unterschiede in der Frequenz von anderen Treg-Populationen wie CD8⁺ Suppressor-T-Zellen oder γδ-TZR⁺ Suppressorzellen gab. Allerdings konnte anhand von adoptiven Transferexperimenten CD4⁺CD8⁻ dnTZ aus hochdosig immunisierten Mäusen als regulatorisch wirksame Zellpopulation identifiziert werden (99).

Studien im Rahmen dieser Arbeit sollten klären, ob dnTZ auch im subkutanen Modell an der Regulation der IgE-Produktion beteiligt sind. Anhand von adoptiven Transferexperimenten konnte zunächst bestätigt werden, dass der regulatorische Effekt auf die IgE-Produktion, der in HD-Donortieren beobachtet wurde, durch den Transfer von Milzzellen in Empfängertiere übertragbar ist (Abb. 5.2). Der adoptive Transfer von HD- nicht aber LD-Milzzellen war in der Lage die IgE-Produktion in Rezipienten zu inhibieren, die nach dem Zelltransfer mit IgE-induzierenden niedrigen Dosen OVA behandelt wurden. Diese inhibitorische Wirkung auf die IgE-Induktion zeigte sich nicht nur für den Transfer von Milzzellen aus HD-Mäusen sondern ebenfalls für cervikale Lymphknotenzellen aus diesen Tieren. Im Weiteren wurde untersucht, ob die T-Zellen innerhalb der Milzzellpopulation in der Lage sind eine IgE-Inhibition in den Rezipienten zu vermitteln, wie es bereits 2010 von Barwig beschrieben wurde (99). Mithilfe der MACS-Technologie negativ selektionierte T-Zellen aus s.c. behandelten HD-Mäusen übten regulatorische Kapazität aus, nicht aber LD-T-Zellen (Abb. 5.4). Es bestätigten sich also die Ergebnisse von Barwig et al., dass in der IgE-vermittelten Immunantwort T-Zellen inhibitorische Funktionen ausüben (99). Der Transfer von dnTZ und CD4⁺CD8⁺ T-Zellen aus HD-Mäusen in Empfängertiere zeigte, dass die CD4⁺CD8⁻ TZ, nicht aber CD4⁺CD8⁺ T-Zellen aus HD-Mäusen in der Lage waren die IgE-

Produktion in den Rezipienten zu inhibieren. Somit konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass es auch nach der subkutanen Applikation von hohen Dosen OVA zur Induktion von CD4⁺CD8⁻ dnTZ kommt, welche regulatorische Kapazitäten auf die Produktion von IgE-Antikörpern haben (Abb 5.4).

CD4⁺CD8⁻ dnTZ sind als eine höchst heterogene Zellpopulation beschrieben worden, die mit einer Frequenz von 1-5% in der Peripherie einen kleinen Anteil an der Gesamt-T-Zellpopulation haben. 1989 konnten Strober et al erstmals sogenannte „Natürliche Suppressor-T-Zellen“ aus murinen Milzzellen klonen, die allogene Lymphytenreaktionen unterdrücken konnten und keine Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 aufwiesen (143). Im darauf folgenden Jahr untersuchte eine andere Arbeitsgruppe die Vorgänge bei der GVHD (Graft-versus-host-disease) und fanden, dass nach Transfer von $\alpha\beta$ -TZR⁺ CD4⁺CD8⁻ Milzzellen in den Rezipienten verminderte GVHD-Symptome auftraten (205). Dies lieferte schon in den 90er Jahren erste Hinweise, dass es auch CD4⁺CD8⁻ dnTZ mit regulatorischer Funktion geben muss. Regulatorische dnTZ (DN Treg) wurden bereits mehrfach in murinen Krankheitsmodellen für Transplantationsabstoßungsreaktionen oder Diabetes beschrieben. Zhang et al. charakterisierten neben anderen Arbeitsgruppen regulatorische $\alpha\beta$ -TZR⁺ CD4⁺CD8⁻ NK1.1⁻ Zellen, die alloantigen-spezifisch in vivo und in vitro regulatorisch auf CD8⁺ T-Zellen wirken konnten (132, 134). Das Vorkommen von DN Treg wurde auch in anderen Krankheitsmodellen der Maus (133, 140, 206), sowie in Krankheitsmodellen der Ratte (207) und auch im Menschen beschrieben (144, 208). DN Treg sind laut der Literatur nicht nur in der Lage CD8⁺ T-Zellen zu kontrollieren, sondern haben auch regulatorische Wirkung im Hinblick auf CD4⁺ T-Zellen (134, 209), B-Zellen (206, 210), NK-Zellen (211) und dendritische Zellen (212). So vielfältig wie ihre Wirkungsweise, so unterschiedlich sind auch die Berichte zum Ursprung von DN Treg. So gibt es frühe Studien, die berichten dass DN Treg direkt aus dem Thymus stammen (213), andere Untersuchungen gehen von einer Entstehung der dnTZ in der Peripherie aus (141). Während der T-Zellentwicklung im Thymus durchlaufen die einen T-Zellrezeptortragenden Zellen ein Stadium in dem sie negativ für die Korezeptoren CD4 und CD8 sind (DN), um dann in ein Stadium der Expression von beiden Korezeptoren (DP) einzutreten. Schließlich werden anhand verschiedener Selektionsvorgänge CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen generiert (SP). Ob DN Treg nun aus dem DN-Stadium des Thymus

stammen oder durch den Verlust der Expression des Korezeptors aus dem SP-Stadium (214) generiert werden, ist nicht vollständig geklärt. Es scheint aber unterschiedliche Generierungswege für DN Treg zu geben. So konnte 2006 gefunden werden, dass DN Treg auch in C57BL/6-Mäusen existieren und sogar verstärkt syngene CD8⁺ T-Zellen supprimieren können, wenn diese zuvor thymektomiert, bestrahlt und mit WT-Knochenmark rekonstituiert wurden (141). Es muss demnach auch DN Treg geben die außerhalb des Thymus ihren Ursprung haben. Diese unterschiedlichen Ursprünge der DN Treg spiegeln sich letztlich auch in der unterschiedlichen Oberflächenexpression der beschriebenen DN Treg Populationen wider. Zu diesen Schwierigkeiten in der Identifizierung von DN Treg kommt, dass Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen (MAIT) und invariante NK-T-Zellen (iNKT) ebenfalls negativ für CD4 und CD8 sind (215). Allerdings wurde bereits diskutiert, dass DN Treg MHC-I und MHCII-restringiert sind (144), wohingegen z.B. iNKT Lipidantigene unabhängig von MHC über CD1d-Moleküle erkennen (216). Durch das Fehlen eines distinkten DN Treg Makers ist es lediglich möglich DN Treg anhand ihres Expressionsmusters zu unterscheiden (139). DN Treg der Maus und des Menschen zeigen anders als zum Beispiel nTregs keine Expression von Foxp3 (129, 208). Klonierte DN Treg zeigen ein anderes Expressionsprofil (CD25⁺CD30⁺CD28^{lo}CD44⁻) (132), als DN Treg, die aus CD4⁺ T-Zellen konvertiert sind (CD25⁺CD28⁺CD44⁺CD69⁺) (129). Frisch isolierte humane DN Treg werden als CD25⁺CD28^{lo}CD127⁺Fas⁺Perforin⁺ gekennzeichnet, zeigen jedoch nach Stimulation *in vitro* eine vermehrte Expression von CD25 und CD69 (208), so dass man sagen kann, dass das phänotypische Auftreten von DN Treg abhängig sein kann vom ontogenetischen Ursprung der untersuchten Population und der verwendeten Stimulationsart *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von dnTZ aus LD und HD-Mäusen verglichen. Dabei wurde die T-Zell-Rezeptorexpression untersucht und außerdem Marker verwendet, die bereits in der Literatur für regulatorische T-Zellen und DN Treg beschrieben wurden, wie CD25, CD28, CD30, CD44, CD62L, CD69, aber auch CTLA-4, GITR, GARP und zur Abgrenzung von NK-Zellen der Marker Nkp46 (Abb. 6.6).

Die beobachteten regulatorischen Effekte auf die IgE-Produktion sind für das Antigen OVA spezifisch waren und scheinen somit T-Zellrezeptor vermittelt zu sein, daher sollte

zunächst geklärt werden, ob die in dieser Arbeit beschriebenen dnTZ, wie die von Zhang et al., 2007 beschriebenen dnTZ über die Expression eines $\alpha\beta$ -TZR verfügen (129). Die Analyse der Oberflächenexpression von dnTZ aus LD- und HD-Mäusen in dieser Arbeit wurde mit sogenannten „untouched“ T-Zellen durchgeführt, die zu ca. 96-98% für CD90.2⁺ waren. Anhand der Marker CD4 und CD8 wurden mithilfe eines Isotyp-Kontrollantikörpers dnTZ eingegrenzt und die Markerexpression als prozentualer Anteil der dnTZ bestimmt. Die Analyse der TZR-Expression von LD- und HD-PanTZ zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von $\alpha\beta$ -TZR⁺ und $\gamma\delta$ -TZR⁺ dnTZ (Abb. 6.2). Um zu klären, ob $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen an der Regulation der IgE-Produktion beteiligt sind, wurden adoptive Transferexperimente mit PanTZ und $\gamma\delta$ -TZR depletierten PanTZ aus LD und HD-Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 6.3 zeigen, dass der Transfer von PanTZ aus HD-Mäusen nicht aber LD-Mäusen die Bildung von IgE-Antikörpern in den Empfängertieren inhibiert. Die Depletion von $\gamma\delta$ -TZR-tragenden T-Zellen hatte keine Auswirkung auf die inhibitorische Kapazität der HD-T-Zellen. Die antigendosis-abhängige Regulation der IgE-Antwort in HD-Mäusen scheint demnach von $\alpha\beta$ -TZR⁺ dnTZ und weniger von $\gamma\delta$ -TZR⁺ T-Zellen vermittelt zu sein.

Es sollte nun geklärt werden, ob die regulatorischen Effekte in der Produktion von IgE-Antikörpern zwischen LD- und HD-Mäusen durch phänotypische bzw. funktionelle Unterschiede zwischen dnTZ aus LD- und HD-Mäusen zu Stande kommen, welche dann zu den Unterschieden in der Regulation führen.

Die Unterschiede zwischen LD- und HD- Mäusen variierten von Experiment zu Experiment sehr stark. Die dnTZ die in dieser Arbeit untersucht wurden, besaßen keine Expression von CD23 (niedrig affiner IgE-Rezeptor), CD40L, GARP und CD30 (Daten nicht gezeigt) und wenig Nkp46 (Abb. 6.4 A). Zwischen dnTZ aus LD- und HD-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD25, CD28, CD62L, CD69, CTLA-4 und GITR beobachtet werden. Die Oberflächenanalyse der dnTZ aus LD und HD-Mäusen lieferte somit für die zuvor genannten Marker keinen eindeutigen Hinweis auf einen phänotypischen Unterschied zwischen LD- und HD-Mäusen.

Weiter wurde untersucht, ob es in HD-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen zu einer Akkumulation von dnTZ kommt, welche die Unterschiede in der IgE-Regulation

bedingen könnten. Wie in Abb. 6.1 gezeigt ist, konnte zwar eine Tendenz zu einer leicht erhöhten Anzahl von $\alpha\beta$ -TZR⁺CD4⁺CD8⁻ dnTZ in der Milz beobachtet werden, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Der prozentuale Anteil von $\gamma\delta$ -TZR⁺CD4⁺CD8⁻ dnTZ war in HD-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen leicht reduziert. In der Literatur gibt es bislang keine Berichte darüber, dass es in allergischen Patienten zu einer Akkumulation von regulatorischen dnTZ kommt. In Patienten, die eine hematopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) erhalten hatten, konnte allerdings gezeigt werden, dass es in Patienten mit mehr als 1% dnTZ im Blut weniger häufig zu Komplikationen in Form einer GvHD (Graft versus Host Disease) kommt als in Patienten mit weniger zirkulierenden dnTZ (217). Niedrige dnTZ-Frequenzen waren verbunden mit einer gesteigerten T-Zellexpansion im Blut der HSCT-Patienten. Dies führte die Autoren zu der Annahme, dass dnTZ an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz über die Suppression von alloreaktiven T-Zellen beteiligt sind. Die Rolle von DN Tregs bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wurde vor allem im Zusammenhang mit Transplantationsreaktionen beschrieben. Dort sind sie in der Lage über Trogozytose MHC-Molekülen von APZ aufzunehmen (131), über diese an alloreaktive CD8⁺ T-Zellen zu binden und letztere z.B. über Fas-abhängige Mechanismen abzutöten (132, 136, 209). Mäuse mit einem Defekt für Fas (lpr-Mutation) und FasL (gld-Mutation) zeigen eine starke Lymphadenopathie und eine Akkumulation von dnTZ in der Peripherie (218, 219). Zum Wirkmechanismus von dnTZ in der allergischen Immunreaktion ist bislang nichts bekannt. Die Expression des Oberflächenmoleküls FasL jedoch war in dieser Arbeit zwischen einzelnen Tieren stark unterschiedlich. Es konnte eine Tendenz zu einer vermehrten Expression von FasL auf HD-dnTZ gefunden werden, die jedoch statistisch keine Signifikanz erreichte (Abb. 6.5). Die FasL-Expression von peripheren T-Zellen ist durch die Aktivierung von CD44 steigerbar (220). Anhand eines Experiments konnte eine verstärkte Expression von CD44 auf dnTZ aus HD-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen festgestellt werden. Dieser Unterschied wurde auf CD4⁺/CD8⁺ TZ nicht gefunden (Abb. 6.4 B). Um jedoch abschließend zu untersuchen, ob FasL in der Regulation der IgE-Produktion in HD-Mäusen eine Rolle spielt, müssten Studien durchgeführt werden, in denen FasL durch Antikörper blockiert wird bzw. Mausstämme verwendet werden, die einen Defekt in der FasL-Expression aufweisen (z.B. gld-Mutation). Dies war im Rahmen dieser Arbeit

nicht mehr möglich. Im Zuge dieser Arbeit wurden darüber hinaus Untersuchungen zur Expression von Perforin und GranzymB durchgeführt (Daten nicht gezeigt), da in den Arbeiten von Zhang et al, und anderen Forschergruppen ein Wirkmechanismus von DN Treg über einen Fas-unabhängigen Weg beschrieben wurde (138, 221). Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression der intrazellulären Moleküle Perforin und GranzymB in LD und HD-dnTZ gefunden werden.

Über die Zytokinproduktion von DN Treg in Maus und Mensch ist lediglich bekannt, dass sie vermehrt IFN- γ sekretieren. Ob IFN- γ jedoch eine Rolle im regulatorischen Mechanismus von DN Treg spielt, ist bislang nicht untersucht. Es konnte allerdings für nTregs gefunden werden, dass diese IFN- γ für die Kontrolle von allogenen Immunantworten benötigen (222). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass DN Treg aus der Milz über die Wirkung von IFN- γ eine wichtige Rolle in der Toleranzinduktion nach einer Organtransplantation spielen (223). Die IFN- γ -Produktion von dnTZ aus LD und HD-Mäusen konnte durch die in vitro Restimulation mit OVA signifikant gesteigert werden. Die dnTZ aus der Milz von HD-Mäusen verfügten im Vergleich zu dnTZ aus LD-Mäusen über eine tendenziell reduzierte Zahl von IFN- γ sekretierenden Zellen und es fand sich nur eine geringe Anzahl IL-17⁺ T-Zellen, sowie weniger IFN- γ ⁺IL-17⁺ dnTZ in der Milz von HD-Mäusen als in LD-Mäusen (Abb. 6.6 B, oben). Die Immunisierung mit hohen Antigen Dosen führte auch auf Ebene der dnTZ zu einer geringfügig verminderten Th2-Zytokin-Freisetzung in Form von IL-5⁺ dnTZ (Abb. 6.6 B, Mitte). Die Zytokinproduktion von dnTZ in der Lunge war durch die Restimulation mit OVA in vitro nicht steigerbar (Daten nicht gezeigt). Die dnTZ produzierten unabhängig von der Immunisierungsdosis IFN- γ und IL-17 und ein geringer Prozentsatz von IFN- γ ⁺IL-17⁺ dnTZ konnte ebenfalls detektiert werden. Jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den pulmonaren dnTZ aus LD und HD-Mäusen. Ähnliches konnte auch für die TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 festgestellt werden. Für dnTZ aus HD-Mäusen konnte in dieser Arbeit kein spezifisches Zytokinprofil gefunden werden.

In HD-Mäusen kommt es zu einer Regulation der IgE-Produktion, die spezifisch für das Allergen OVA ist und somit TZR-vermittelt zu sein scheint. In einem Suppressionsversuch sollte nun der direkte suppressive Einfluss von PanTZ aus HD-Mäusen bzw. LD-Mäusen auf T-Zellen aus OVA-transgenen DO11.10-Tieren getestet werden. Dabei

wurde einem Ansatz exogen IL-2 zugegeben, um auszuschließen, dass nTregs in den PanTZ-Populationen einen Einfluss auf die Effektoren über die Limitation von IL-2 ausüben (224, 225). In einem neu etablierten Kokultursystem wurden CFSE-markierte CD90.2⁺ T-Zellen aus naiven DO11.10-BALB/c-Tieren mit OVA-beladenen Milzzellen als APZ und Regulatoren aus LD- bzw. HD-Mäusen für 72 Stunden mit und ohne IL-2 kultiviert und anschließend die Entwicklung der CFSE-markierten Population im FACS detektiert (Abb. 7.1 D). In den Kulturen konnte durch die Stimulation der Effektoren mit OVA-beladenen APZ im Vergleich zu unbeladenen APZ eine Steigerung der Effektorzellproliferation in Abwesenheit von IL-2 beobachtet werden. Diese wurde durch die Anwesenheit von Regulatoren aus LD-Mäusen in einem Effektor/Regulator - Verhältnis von 1:1 leicht reduziert. Die Reduktion der Proliferation der CFSE-markierten T-Zellen war deutlich reduziert in Kulturen denen HD-Regulatoren zugesetzt worden waren. Die Tatsache, dass auch LD-Regulatoren einen Einfluss auf die OVA-spezifische Effektorproliferation haben, könnte auf die Anwesenheit von nTreg in den PanTZ-Präparationen zurückzuführen sein. Interleukin-2 ist nicht nur ein wichtiger Überlebensfaktor für T-Zellen, sondern auch ein die Proliferation förderndes Zytokin. Natürliche Tregs verfügen über eine hohe Expression des IL-2 Rezeptors und es wurde deshalb mehrfach diskutiert, dass sie eine Suppression von T-Zellantworten durch einen erhöhten Verbrauch und damit die Limitation des IL-2 induzieren. Diese Ergebnisse sind jedoch kontrovers diskutiert worden (224–227), dennoch gibt es Berichte, dass unter bestimmten Stimulationsbedingungen die exogene Zugabe von IL-2 die Treg-vermittelte Suppression unterdrücken konnte (228, 229). Es scheint aber weniger der Verbrauch des IL-2 durch nTreg eine Rolle zu spielen, als vielmehr Unterschiede in den suppressiven Mechanismen der Proliferation und IL-2-mRNA-Transkription. So kann zum Beispiel durch die exogene Gabe von IL-2 die Proliferation von Effektorzellen im Suppressionstest wiederhergestellt werden, die Inhibition der Transkription des IL-2 Gens durch voraktivierte Tregs wird durch exogenes IL-2 jedoch nicht beeinflusst. Dies führte Oberle et al (2007) zu dem Schluss, dass aktivierte Treg kein exogenes IL-2 für ihre suppressiven Eigenschaften benötigen (227).

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass durch die exogene Zugabe von IL-2 die Unterschiede in der Effektorzellproliferation in Ansätzen mit Regulatoren aus LD und HD-Mäusen noch deutlicher wurden. Die Effektoren, die in Anwesenheit

von LD-Regulatoren kultiviert wurden, wiesen keine Reduktion der OVA-spezifischen Proliferation auf, wohingegen die Proliferation der Effektoren in HD-Kulturen deutlich reduziert war (Abb. 7.2 B). Die exogene Zugabe von IL-2 konnte also im vorliegenden Experiment die suppressiven Eigenschaften der LD-Regulatoren aufheben. Ob dies auf die Eigenschaften von IL-2 als Wachstumsfaktor oder eine reduzierte Wirkung von nTregs im System zurückzuführen ist, kann anhand der Ergebnisse dieses Experiments nicht geschlussfolgert werden. Die Analyse der Frequenz der CFSE-markierten T-Zellen wurde in dieser Arbeit in absoluten Werten angegeben. Die erste Auswertung der Ergebnisse ergab, dass prozentual gesehen kein Unterschiede zwischen dem Prozentsatz von CFSE⁺-Zellen in LD und HD-Kulturen zu erkennen waren. Es fiel jedoch auf, dass in den HD-Kulturen deutlich weniger CFSE⁺-T-Zellen zu finden waren, obwohl initial in allen Kulturen die gleiche Anzahl CFSE-markierter CD90⁺ T-Zellen eingesetzt wurde (Abb. 7.3). In Anwesenheit von IL-2 wurde dieser Unterschied noch deutlicher (Abb. 7.3 B). Daraus lässt sich schließen, dass es in IL-2 behandelten HD-Kulturen zu einem Verlust von CFSE⁺-T-Zellen kommt. Ob dieser Effektorzellverlust durch eine aktive Apoptoseinduktion in den Effektoren durch die HD-Regulatoren herrührt, konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Es gibt allerdings wie schon zuvor erwähnt Berichte, dass DN Treg in der Lage sind z.B. CD8⁺ T-Zellen über Fas-abhängige bzw. Perforin und GranzymB-abhängige Mechanismen abtöten können (134, 138, 139, 221). Die Analyse der Oberflächenexpression gab zwar Hinweise darauf, dass HD dnTZ verstärkt FasL exprimieren, jedoch erreichte der Unterschied zu LD dnTZ in dieser Arbeit keine statistische Signifikanz. Weiterführende Untersuchungen mit blockierenden Antikörpern gegen Fas, Perforin oder GranzymB sollen klären, ob die in dieser Arbeit untersuchten TZ aus HD-Mäusen ihre regulatorische Kapazität über einen der bereits in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen von DN Treg ausüben.

V. Literaturverzeichnis

1. **Devereux**, G. 2006. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 869–874.
2. **Campbell**, J. D. 2011. Managed care opportunities for improving asthma care. *Am J Manag Care* 17 Suppl 3: S90–96.
3. **Flohr**, C. 2011. Recent perspectives on the global epidemiology of childhood eczema. *Allergol Immunopathol (Madr)* 39: 174–182.
4. **Frew**, A. J. 2010. Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol* 125: S306–313.
5. **Akdis**, C. A., and K. Blaser. 1999. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J* 13: 603–609.
6. **Lewis**, D. B. 2002. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr. Opin. Immunol.* 14: 644–651.
7. **Bellinghausen**, I., G. Metz, A. H. Enk, S. Christmann, J. Knop, and J. Saloga. 1997. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* 27: 1131–1139.
8. **Till**, S. J., J. N. Francis, K. Nouri-Aria, and S. R. Durham. 2004. Mechanisms of immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 1025–1034; quiz 1035.
9. **Akdis**, M. 2006. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr. Opin. Immunol* 18: 738–744.
10. **Piconi**, S., D. Trabattoni, M. Saresella, E. Iemoli, M. Schenal, A. Fusi, M. Borelli, L. Chen, A. Mascheri, and M. Clerici. 2007. Effects of specific immunotherapy on the B7 family of costimulatory molecules in allergic inflammation. *J. Immunol.* 178: 1931–1937.
11. **Jutel**, M., and C. A. Akdis. 2008. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 94: 158–177.
12. **Creticos**, P. S., N. F. Adkinson Jr, A. Kagey-Sobotka, D. Proud, H. L. Meier, R. M. Naclerio, L. M. Lichtenstein, and P. S. Norman. 1985. Nasal challenge with ragweed pollen in hayfever patients. Effect of immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 76: 2247–2253.
13. **Rak**, S., O. Löwhagen, and P. Venge. 1988. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 470–480.
14. **Coombs, and Gell**. 1968. *Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease*. Blackwell: 587–592.
15. **Banchereau**, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
16. **Banchereau**, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
17. **Wu**, L. C. 2011. Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. *J. Biol. Chem.* 286: 32891–32897.
18. **Maurer**, D., E. Fiebiger, B. Reininger, B. Wolff-Winiski, M. H. Jouvin, O. Kilgus, J. P.

- Kinet, and G. Stingl. 1994. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.* 179: 745–750.
19. **Geha**, R. S., H. H. Jabara, and S. R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 721–732.
20. **Blank**, U., and J. Rivera. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25: 266–273.
21. **Pejler**, G., M. Abrink, M. Ringvall, and S. Wernersson. 2007. Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* 95: 167–255.
22. **Zhou**, B., M. R. Comeau, T. De Smedt, H. D. Liggitt, M. E. Dahl, D. B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D. J. Campbell, and S. F. Ziegler. 2005. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol.* 6: 1047–1053.
23. **Siracusa**, M. C., S. A. Saenz, D. A. Hill, B. S. Kim, M. B. Headley, T. A. Doering, E. J. Wherry, H. K. Jessup, L. A. Siegel, T. Kambayashi, E. C. Dudek, M. Kubo, A. Cianferoni, J. M. Spergel, S. F. Ziegler, M. R. Comeau, and D. Artis. 2011. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 477: 229–233.
24. **Ying**, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, C. Fang, D. Cousins, G. Zhang, S. Gu, Z. Gao, B. Shamji, M. J. Edwards, T. H. Lee, and C. J. Corrigan. 2008. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.* 181: 2790–2798.
25. **Fort**, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman, and D. M. Rennick. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15: 985–995.
26. **Angkasekwinai**, P., H. Park, Y.-H. Wang, Y.-H. Wang, S. H. Chang, D. B. Corry, Y.-J. Liu, Z. Zhu, and C. Dong. 2007. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J. Exp. Med.* 204: 1509–1517.
27. **Zhao**, A., J. F. Urban Jr, R. Sun, J. Stiltz, M. Morimoto, L. Notari, K. B. Madden, Z. Yang, V. Grinchuk, T. R. Ramalingam, T. A. Wynn, and T. Shea-Donohue. 2010. Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *J. Immunol.* 185: 6921–6929.
28. **Terrier**, B., I. Bièche, T. Maisonobe, I. Laurendeau, M. Rosenzweig, J.-E. Kahn, M.-C. Diemert, L. Musset, M. Vidaud, D. Sène, N. Costedoat-Chalumeau, D. Le Thi-Huong, Z. Amoura, D. Klatzmann, P. Cacoub, and D. Saadoun. 2010. Interleukin-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome. *Blood* 116: 4523–4531.
29. **Hurst**, S. D., T. Muchamuel, D. M. Gorman, J. M. Gilbert, T. Clifford, S. Kwan, S. Menon, B. Seymour, C. Jackson, T. T. Kung, J. K. Brieland, S. M. Zurawski, R. W. Chapman, G. Zurawski, and R. L. Coffman. 2002. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J. Immunol.* 169: 443–453.
30. **Ballantyne**, S. J., J. L. Barlow, H. E. Jolin, P. Nath, A. S. Williams, K. F. Chung, G. Sturton, S. H. Wong, and A. N. J. McKenzie. 2007. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1324–1331.

31. **Jung**, J.-S., B. L. Park, H. S. Cheong, J. S. Bae, J.-H. Kim, H. S. Chang, T. Rhim, J.-S. Park, A.-S. Jang, Y.-M. Lee, K.-U. Kim, S.-T. Uh, J. O. Na, Y.-H. Kim, C.-S. Park, and H. D. Shin. 2009. Association of IL-17RB gene polymorphism with asthma. *Chest* 135: 1173–1180.
32. **Carriere**, V., L. Roussel, N. Ortega, D.-A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, and J.-P. Girard. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 282–287.
33. **Besnard**, A.-G., D. Togbe, N. Guillou, F. Erard, V. Quesniaux, and B. Ryffel. 2011. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41: 1675–1686.
34. **Willart**, M., and H. Hammad. 2011. Lung dendritic cell-epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. *Curr. Opin. Immunol.* 23: 772–777.
35. **Mosmann**, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138–146.
36. **Harrington**, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123–1132.
37. **Park**, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133–1141.
38. **Bettelli**, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
39. **Zhou**, P., L. L'italien, D. Hodges, and X. M. Schebye. 2007. Pivotal roles of CD4⁺ effector T cells in mediating agonistic anti-GITR mAb-induced-immune activation and tumor immunity in CT26 tumors. *J. Immunol.* 179: 7365–7375.
40. **Wakashin**, H., K. Hirose, Y. Maezawa, S. Kagami, A. Suto, N. Watanabe, Y. Saito, M. Hatano, T. Tokuhisa, Y. Iwakura, P. Puccetti, I. Iwamoto, and H. Nakajima. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178: 1023–1032.
41. **Besnard**, A.-G., D. Togbe, I. Couillin, Z. Tan, S. G. Zheng, F. Erard, M. Le Bert, V. Quesniaux, and B. Ryffel. 2012. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 4: 3–10.
42. **Murdoch**, J. R., and C. M. Lloyd. 2010. Resolution of Allergic Airway Inflammation and Airway Hyperreactivity is Mediated by IL-17 Producing $\gamma\delta$ T Cells. *Am J Respir Crit Care Med* .
43. **Robinson**, D. S. 2009. Regulatory T cells and asthma. *Clin. Exp. Allergy* 39: 1314–1323.
44. **Wisniewski**, J. A., and L. Borish. 2011. Novel cytokines and cytokine-producing T cells in allergic disorders. *Allergy Asthma Proc* 32: 83–94.
45. **Le Gros**, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172: 921–929.
46. **Swain**, S. L., A. D. Weinberg, M. English, and G. Huston. 1990. IL-4 directs the

- development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145: 3796–3806.
47. **Jankovic**, D., M. C. Kullberg, N. Noben-Trauth, P. Caspar, W. E. Paul, and A. Sher. 2000. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4⁺ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 164: 3047–3055.
 48. **Finkelman**, F. D., S. C. Morris, T. Orekhova, M. Mori, D. Donaldson, S. L. Reiner, N. L. Reilly, L. Schopf, and J. F. Urban Jr. 2000. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J. Immunol.* 164: 2303–2310.
 49. **Zheng**, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587–596.
 50. **Zhu**, J., B. Min, J. Hu-Li, C. J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J. F. Urban Jr, L. Guo, and W. E. Paul. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat. Immunol.* 5: 1157–1165.
 51. **Finkelman**, F. D., S. P. Hogan, G. K. K. Hershey, M. E. Rothenberg, and M. Wills-Karp. 2010. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol.* 184: 1663–1674.
 52. **Hamid**, Q., and M. Tulic. 2009. Immunobiology of asthma. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 489–507.
 53. **Leckie**, M. J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B. J. O'Connor, C. M. Walls, A. K. Mathur, H. C. Cowley, K. F. Chung, R. Djukanovic, T. T. Hansel, S. T. Holgate, P. J. Sterk, and P. J. Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356: 2144–2148.
 54. **Hendeles**, L., M. Asmus, and S. Chesrown. 2004. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S107–112.
 55. **Hoshino**, T., R. T. Winkler-Pickett, A. T. Mason, J. R. Ortaldo, and H. A. Young. 1999. IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J. Immunol.* 162: 51–59.
 56. **Kang**, C.-M., A.-S. Jang, M.-H. Ahn, J.-A. Shin, J.-H. Kim, Y.-S. Choi, T.-Y. Rhim, and C.-S. Park. 2005. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33: 290–296.
 57. **Gessner**, A., K. Mohrs, and M. Mohrs. 2005. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J. Immunol.* 174: 1063–1072.
 58. **Romagnani**, S. 1991. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 21: 152–158.
 59. **Street**, N. E., and T. R. Mosmann. 1991. Functional Diversity of T Lymphocytes Due to Secretion of Different Cytokine Patterns. *FASEB J* 5: 171–177.
 60. **Noble**, A., D. Z. Staynov, D. Diaz-Sanchez, T. H. Lee, and D. M. Kemeny. 1993. Elimination of IgE regulatory rat CD8⁺ T cells in vivo increases the co-ordinate expression of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-10. *Immunology* 80: 326–329.
 61. **Barrat**, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. de Waal-

- Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 195: 603–616.
62. **O'Garra**, A., and F. J. Barrat. 2003. In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol. Lett.* 85: 135–139.
63. **Schandené**, L., C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gérard, A. Delvaux, T. Velu, R. Devos, M. de Boer, and M. Goldman. 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J. Immunol.* 152: 4368–4374.
64. **Akdis**, C. A., A. Joss, M. Akdis, A. Faith, and K. Blaser. 2000. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB J.* 14: 1666–1668.
65. **Stock**, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat. Immunol.* 5: 1149–1156.
66. **Fallon**, P. G., S. J. Ballantyne, N. E. Mangan, J. L. Barlow, A. Dasvarma, D. R. Hewett, A. McIlgorm, H. E. Jolin, and A. N. J. McKenzie. 2006. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J. Exp. Med.* 203: 1105–1116.
67. **Neill**, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. A. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin, and A. N. J. McKenzie. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464: 1367–1370.
68. **Price**, A. E., H.-E. Liang, B. M. Sullivan, R. L. Reinhardt, C. J. Easley, D. J. Erle, and R. M. Locksley. 2010. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 11489–11494.
69. **Moro**, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J.-I. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463: 540–544.
70. **Saenz**, S. A., M. C. Siracusa, J. G. Perrigoue, S. P. Spencer, J. F. Urban Jr, J. E. Tocker, A. L. Budelsky, M. A. Kleinschek, R. A. Kastelein, T. Kambayashi, A. Bhandoola, and D. Artis. 2010. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature* 464: 1362–1366.
71. **Muniz**, V. S., P. F. Weller, and J. S. Neves. 2012. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *Journal of leukocyte biology* .
72. **McKerrow**, J. H., C. Caffrey, B. Kelly, P. Loke, and M. Sajid. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol* 1: 497–536.
73. **Sokol**, C. L., G. M. Barton, A. G. Farr, and R. Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.* 9: 310–318.
74. **Kouzaki**, H., S. M. O'Grady, C. B. Lawrence, and H. Kita. 2009. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-

- activated receptor-2. *J. Immunol.* 183: 1427–1434.
75. **Trompette**, A., S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, R. Madan, P. S. Thorne, M. Wills-Karp, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, and C. L. Karp. 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457: 585–588.
76. **Hammad**, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15: 410–416.
77. **Schmitz**, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479–490.
78. **Kool**, M., V. Pétrilli, T. De Smedt, A. Rolaz, H. Hammad, M. van Nimwegen, I. M. Bergen, R. Castillo, B. N. Lambrecht, and J. Tschopp. 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol* 181: 3755–3759.
79. **Cayrol**, C., and J.-P. Girard. 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 9021–9026.
80. **Talabot-Ayer**, D., C. Lamacchia, C. Gabay, and G. Palmer. 2009. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284: 19420–19426.
81. **Kay**, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 30–37.
82. **Strachan**, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259–1260.
83. **Okada**, H., C. Kuhn, H. Feillet, and J.-F. Bach. 2010. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol* 160: 1–9.
84. **Yazdanbakhsh**, M., A. van den Biggelaar, and R. M. Maizels. 2001. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol.* 22: 372–377.
85. **Fallon**, P. G., and N. E. Mangan. 2007. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 220–230.
86. **Meiler**, F., J. Zumkehr, S. Klunker, B. Rückert, C. A. Akdis, and M. Akdis. 2008. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* 205: 2887–2898.
87. **Ober**, C., and S. Hoffjan. 2006. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 7: 95–100.
88. **Mahdi**, B., P. A. Mahesh, R. S. Mysore, P. Kumar, B. S. Jayaraj, and N. B. Ramachandra. 2010. Inheritance patterns, consanguinity & risk for asthma. *Indian J. Med. Res.* 132: 48–55.
89. **Cantani**, A., and M. Micera. 2011. A study on 300 asthmatic children, 300 controls and their parents confirms the genetic transmission of allergy and asthma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15: 1051–1056.
90. **Chang**, T. W., and A. Y. Pan. 2008. Cumulative environmental changes, skewed antigen exposure, and the increase of allergy. *Adv. Immunol.* 98: 39–83.

91. **Kim, J.**, S. Natarajan, L. J. Vaickus, J. C. Bouchard, D. Beal, W. W. Cruikshank, and D. G. Remick. 2011. Diesel exhaust particulates exacerbate asthma-like inflammation by increasing CXC chemokines. *Am. J. Pathol.* 179: 2730–2739.
92. **Pasqualini, S.**, E. Tedeschini, G. Frenguelli, N. Wopfner, F. Ferreira, G. D'Amato, and L. Ederli. 2011. Ozone affects pollen viability and NAD(P)H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen. *Environ. Pollut.* 159: 2823–2830.
93. **Leen, M. G.**, T. O'Connor, C. Kelleher, E. B. Mitchell, and B. G. Loftus. 1994. Home environment and childhood asthma. *Ir Med J* 87: 142–144.
94. **Cecchi, L.**, C. Lorenzo, M. Morabito, M. Marco, M. Paola Domeneghetti, D. M. Paola, A. Crisci, C. Alfonso, M. Onorari, O. Marzia, S. Orlandini, and O. Simone. 2006. Long distance transport of ragweed pollen as a potential cause of allergy in central Italy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 96: 86–91.
95. **Hosken, N. A.**, K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 182: 1579–1584.
96. **Constant, S.**, C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini, and K. Bottomly. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 182: 1591–1596.
97. **Sudowe, S.**, A. Rademaekers, and E. Kölsch. 1997. Antigen dose-dependent predominance of either direct or sequential switch in IgE antibody responses. *Immunology* 91: 464–472.
98. **Arps, V.**, S. Sudowe, and E. Kölsch. 1998. Antigen dose-dependent differences in IgE antibody production are not due to polarization towards Th1 and Th2 cell subsets. *Eur. J. Immunol* 28: 681–686.
99. **Barwig, C.**, V. Raker, E. Montermann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz, and S. Sudowe. 2010. Antigen dose-dependent suppression of murine IgE responses is mediated by CD4(-)CD8(-) double-negative T cells. *Clin. Exp. Allergy* 40: 891–901.
100. **Mueller, D. L.** 2009. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology* 11: 21–27.
101. **Kay, A. B.** 1991. Asthma and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 893–910.
102. **Braga, M.**, C. Quecchia, E. Cavallucci, L. Di Giampaolo, C. Schiavone, C. Petrarca, and M. Di Gioacchino. 2011. T regulatory cells in allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24: 55S–64S.
103. **Ozdemir, C.**, U. C. Kucuksezer, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2011. Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 107: 381–392.
104. **Jutel, M.**, and C. A. Akdis. 2008. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 94: 158–177.
105. **Sakaguchi, S.**, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151–1164.
106. **Hori, S.**, M. Haury, A. Coutinho, and J. Demengeot. 2002. Specificity requirements for

- selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8213–8218.
107. **Hsieh**, C.-S., Y. Liang, A. J. Tyznik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21: 267–277.
108. **Sakaguchi**, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 531–562.
109. **Toda**, A., and C. A. Piccirillo. 2006. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 80: 458–470.
110. **Leung**, D. T. M., S. Morefield, and D. M. Willerford. 2000. Regulation of Lymphoid Homeostasis by IL-2 Receptor Signals In Vivo. *The Journal of Immunology* 164: 3527 – 3534.
111. **Malek**, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17: 167–178.
112. **Setoguchi**, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201: 723–735.
113. **Thornton**, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519–6523.
114. **Yates**, J., F. Rovis, P. Mitchell, B. Afzali, J. Y.-S. Tsang, M. Garin, R. I. Lechler, G. Lombardi, and O. A. Garden. 2007. The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int. Immunol.* 19: 785–799.
115. **Fontenot**, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330–336.
116. **Gambineri**, E., T. R. Torgerson, and H. D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15: 430–435.
117. **Shimizu**, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3: 135–142.
118. **Saito**, T., and S. Yamasaki. 2003. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol. Rev.* 192: 143–160.
119. **Wang**, C. J., E. M. Schmidt, K. Attridge, R. Kenefeck, L. Wardzinski, J. L. Chamberlain, A. Soulier, L. E. Clough, C. N. Manzotti, P. Narendran, and L. S. K. Walker. 2011. Immune regulation by CTLA-4--relevance to autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27: 946–950.
120. **Read**, S., V. Malmström, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control

- intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192: 295–302.
121. **Battaglia**, M., C. Gianfrani, S. Gregori, and M.-G. Roncarolo. 2004. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029: 142–153.
 122. **Gregori**, S., M. G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2011. Methods for in vitro generation of human type 1 regulatory T cells. *Methods Mol. Biol.* 677: 31–46.
 123. **Steinbrink**, K., M. Wöfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159: 4772–4780.
 124. **Seder**, R. A., T. Marth, M. C. Sieve, W. Strober, J. J. Letterio, A. B. Roberts, and B. Kelsall. 1998. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol.* 160: 5719–5728.
 125. **Inobe**, J., A. J. Slavin, Y. Komagata, Y. Chen, L. Liu, and H. L. Weiner. 1998. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 28: 2780–2790.
 126. **Weiner**, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 3: 947–954.
 127. **Strober**, S., L. Cheng, D. Zeng, R. Palathumapat, S. Dejbakhsh-Jones, P. Huie, and R. Sibley. 1996. Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol. Rev.* 149: 217–230.
 128. **Londei**, M., A. Verhoef, P. De Berardinis, M. Kissonerghis, B. Grubeck-Loebenstein, and M. Feldmann. 1989. Definition of a population of CD4-8- T cells that express the alpha beta T-cell receptor and respond to interleukins 2, 3, and 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8502–8506.
 129. **Zhang**, D., W. Yang, N. Degauque, Y. Tian, A. Mikita, and X. X. Zheng. 2007. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood* 109: 4071–4079.
 130. **Kim**, E. Y., S. C. Juvet, and L. Zhang. 2011. Regulatory CD4(-)CD8(-) double negative T cells. *Methods Mol. Biol.* 677: 85–98.
 131. **Ford McIntyre**, M. S., K. J. Young, J. Gao, B. Joe, and L. Zhang. 2008. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J. Immunol* 181: 2271–2275.
 132. **Zhang**, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med* 6: 782–789.
 133. **Priatel**, J. J., O. Utting, and H. S. Teh. 2001. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol* 167: 6188–6194.
 134. **Ford**, M. S., K. J. Young, Z. Zhang, P. S. Ohashi, and L. Zhang. 2002. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med* 196: 261–267.
 135. **Zhang**, Z.-X., W. L. Stanford, and L. Zhang. 2002. Ly-6A is critical for the function of

- double negative regulatory T cells. *Eur. J. Immunol* 32: 1584–1592.
136. **Young**, K. J., L. Yang, M. J. Phillips, and L. Zhang. 2002. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 100: 3408–3414.
137. **Young**, K. J., and L. Zhang. 2002. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum. Immunol* 63: 926–934.
138. **Zhang**, Z.-X., Y. Ma, H. Wang, J. Arp, J. Jiang, X. Huang, K. M. He, B. Garcia, J. Madrenas, and R. Zhong. 2006. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J. Immunol* 177: 6920–6929.
139. **Juvet**, S. C., and L. Zhang. 2012. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol* 4: 48–58.
140. **Ford**, M. S., W. Chen, S. Wong, C. Li, R. Vanama, A. R. Elford, S. L. Asa, P. S. Ohashi, and L. Zhang. 2007. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur. J. Immunol* 37: 2234–2241.
141. **Ford**, M. S., Z.-X. Zhang, W. Chen, and L. Zhang. 2006. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8⁺ T cell precursors. *J. Immunol* 177: 2803–2809.
142. **Quaratino**, S., G. Murison, R. E. Knyba, A. Verhoef, and M. Londei. 1991. Human CD4-CD8- alpha beta⁺ T cells express a functional T cell receptor and can be activated by superantigens. *J. Immunol.* 147: 3319–3323.
143. **Strober**, S., S. Dejbachsh-Jones, P. Van Vlasselaer, G. Duwe, S. Salimi, and J. P. Allison. 1989. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J. Immunol.* 143: 1118–1122.
144. **Fischer**, K., S. Voelkl, J. Heymann, G. K. Przybylski, K. Mondal, M. Laumer, L. Kunz-Schughart, C. A. Schmidt, R. Andreesen, and A. Mackensen. 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 105: 2828–2835.
145. **Unkeless**, J. C. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150: 580–596.
146. **Baniyash**, M., and Z. Eshhar. 1984. Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. *Eur. J. Immunol.* 14: 799–807.
147. **Spitalny**, G. L., and E. A. Havell. 1984. Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.* 159: 1560–1565.
148. **Cherwinski**, H. M., J. H. Schumacher, K. D. Brown, and T. R. Mosmann. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 166: 1229–1244.
149. **Akeson**, E. C., L. R. Donahue, W. G. Beamer, K. L. Shultz, C. Ackert-Bicknell, C. J. Rosen, J. Corrigan, and M. T. Davisson. 2006. Chromosomal inversion discovered in C3H/HeJ mice. *Genomics* 87: 311–313.

150. **Hoshino**, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162: 3749–3752.
151. **Murphy**, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science* 250: 1720–1723.
152. **Sudowe**, S., C. Specht, L. Kolbe, and E. Kölsch. 1995. In situ dormancy of B lymphocytes programmed for an IgE antibody response and their sudden release from unresponsiveness under in vitro conditions. *Int. Immunol* 7: 1799–1807.
153. **Glenny**, A. T., and H. J. Südmersen. 1921. Notes on the Production of Immunity to Diphtheria Toxin. *J Hyg (Lond)* 20: 176–220.
154. **Lambrecht**, B. N., M. Kool, M. A. M. Willart, and H. Hammad. 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr. Opin. Immunol* 21: 23–29.
155. **Mohr**, E., A. F. Cunningham, K.-M. Toellner, S. Bobat, R. E. Coughlan, R. A. Bird, I. C. M. MacLennan, and K. Serre. 2010. IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* .
156. **Eisenbarth**, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453: 1122–1126.
157. **Conrad**, M. L., A. O. Yildirim, S. S. Sonar, A. Kiliç, S. Sudowe, M. Lunow, R. Teich, H. Renz, and H. Garn. 2009. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin. Exp. Allergy* 39: 1246–1254.
158. **Fernando**, S. A., and G. S. Wilson. 1992. Studies of the “hook” effect in the one-step sandwich immunoassay. *J. Immunol. Methods* 151: 47–66.
159. **Kuipers**, H., D. Hijdra, V. C. De Vries, H. Hammad, J.-B. Prins, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2003. Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3645–3654.
160. **Chung**, S.-H., S. H. Choi, K. J. Cho, and C.-K. Joo. 2011. Toll-like receptor 4 signalling attenuates experimental allergic conjunctivitis. *Clin. Exp. Immunol.* 164: 275–281.
161. **Akdis**, M., and C. A. Akdis. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol* 119: 780–791.
162. **Morokata**, T., J. Ishikawa, and T. Yamada. 2000. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol. Lett.* 72: 119–126.
163. **Sakai**, K., A. Yokoyama, N. Kohno, and K. Hiwada. 1999. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 118: 9–15.
164. **Sarpong**, S. B., L.-Y. Zhang, and S. R. Kleeberger. 2003. A novel mouse model of experimental asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132: 346–354.
165. **Hamelmann**, E., K. Takeda, J. Schwarze, A. T. Vella, C. G. Irvin, and E. W. Gelfand. 1999. Development of Eosinophilic Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness

- Requires Interleukin-5 but Not Immunoglobulin E or B Lymphocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 480–489.
166. **Janssen**, E. M., M. H. M. Wauben, E. H. Jonker, G. Hofman, W. Van Eden, F. P. Nijkamp, and A. J. M. Van Oosterhout. 1999. Opposite Effects of Immunotherapy with Ovalbumin and the Immunodominant T-Cell Epitope on Airway Eosinophilia and Hyperresponsiveness in a Murine Model of Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 21–29.
167. **Van Oosterhout**, A. J. M., B. Van Esch, G. Hofman, C. L. Hofstra, I. Van Ark, F. P. Nijkamp, M. L. Kapsenberg, H. F. J. Savelkoul, and F. R. Weller. 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: 622–628.
168. **Bousquet**, J., P. Demoly, and F. B. Michel. 2001. Specific immunotherapy in rhinitis and asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 87: 38–42.
169. **Vissers**, J. L. M., B. C. A. M. van Esch, G. A. Hofman, M. L. Kapsenberg, F. R. Weller, and A. J. M. van Oosterhout. 2004. Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 1204–1210.
170. **Fyhrquist**, N., S. Lehtimäki, K. Lahl, T. Savinko, A.-M. Lappeteläinen, T. Sparwasser, H. Wolff, A. Lauerma, and H. Alenius. 2012. Foxp3+ Cells Control Th2 Responses in a Murine Model of Atopic Dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*.
171. **Chen**, W., M. S. Ford, K. J. Young, and L. Zhang. 2004. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell. Mol. Immunol* 1: 328–335.
172. **Landolfi**, M. M., N. Van Houten, J. Q. Russell, R. Scollay, J. R. Parnes, and R. C. Budd. 1993. CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J. Immunol.* 151: 1086–1096.
173. **Meyer**, E. H., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2008. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu. Rev. Med* 59: 281–292.
174. Sullivan, B. A., and M. Kronenberg. 2007. TCR-mediated recognition of glycolipid CD1 complexes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314: 165–193.
175. **Lee**, B. P.-L., E. Mansfield, S.-C. Hsieh, W. Chen, C. W. Thomson, M. S. Ford, S. E. Bosinger, S. Der, Z.-X. Zhang, M. Zhang, D. J. Kelvin, M. M. Sarwal, and L. Zhang. 2005. Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival. *J. Immunol* 174: 4535–4544.
176. **Haugaard**, L., R. Dahl, and L. Jacobsen. 1993. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 709–722.
177. **Ewbank**, P. A., J. Murray, K. Sanders, D. Curran-Everett, S. Dreskin, and H. S. Nelson. 2003. A double-blind, placebo-controlled immunotherapy dose-response study with standardized cat extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 155–161.
178. **Akdis**, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, N. Quaked, A. Schaffartzik, W.

- Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, and C. A. Akdis. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 701–721.e1–70.
179. **Platts-Mills**, T., J. Vaughan, S. Squillace, J. Woodfolk, and R. Sporik. 2001. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357: 752–756.
180. **Akdis**, C. A., K. Blaser, and M. Akdis. 2006. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 91: 195–203.
181. **Kolbe**, L., C. Heusser, and E. Kölsch. 1991. Antigen dose-dependent regulation of B epsilon-memory cell expression. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 95: 202–206.
182. **Sudowe**, S., E. Montermann, J. Steitz, T. Tüting, J. Knop, and A. B. Reske-Kunz. 2002. Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy. *Gene Ther* 9: 147–156.
183. **Brzezińska-Błaszczyk**, E., J. Wyczółkowska, and C. Maśliński. 1980. Keyhole limpet hemocyanin (KLH)--a potent antigen in reaginic sensitization of mice and rats; a comparison with egg albumin (EA)-induced reaction. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 28: 533–539.
184. **Kantele**, A., M. P. Häkkinen, J. Zivny, C. O. Elson, J. Mestecky, and J. M. Kantele. 2011. Humoral immune response to keyhole limpet haemocyanin, the protein carrier in cancer vaccines. *Clin. Dev. Immunol.* 2011: 614383.
185. **Bortolatto**, J., E. Borducchi, D. Rodriguez, A. C. Keller, E. Faquim-Mauro, K. R. Bortoluci, D. Mucida, E. Gomes, A. Christ, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, B. Ryffel, and M. Russo. 2008. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. *Clin. Exp. Allergy* 38: 1668–1679.
186. **Ahrens**, B., T. Freund, R.-D. Rha, A.-M. Dittrich, D. Quarcoo, A. Hutloff, and E. Hamelmann. 2009. Lipopolysaccharide stimulation of dendritic cells induces interleukin-10 producing allergen-specific T cells in vitro but fails to prevent allergic airway disease. *Exp. Lung Res.* 35: 307–323.
187. **Talay**, O., D. Yan, H. D. Brightbill, E. E. M. Straney, M. Zhou, E. Ladi, W. P. Lee, J. G. Egen, C. D. Austin, M. Xu, and L. C. Wu. 2012. IgE⁺ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.* 13: 396–404.
188. **Good-Jacobson**, K. L., and D. M. Tarlinton. 2012. Multiple routes to B-cell memory. *International immunology*.
189. **Brown**, S. G. A., M. D. Wiese, P. van Eeden, S. F. Stone, C. L. Chuter, J. Gunner, T. Wanandy, M. Phillips, and R. J. Heddle. 2012. Ultrarush versus semirush initiation of insect venom immunotherapy: A randomized controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
190. **Luger**, E. O., V. Fokuhl, M. Wegmann, M. Abram, K. Tillack, G. Achatz, R. A. Manz, M. Worm, A. Radbruch, and H. Renz. 2009. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 819–826.e4.
191. **Tao**, X., C. Grant, S. Constant, and K. Bottomly. 1997. Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J. Immunol.* 158: 4237–4244.

192. **Cunningham**, P. T., C. E. Elliot, J. C. Lenzo, A. G. Jarnicki, A. N. Larcombe, G. R. Zosky, P. G. Holt, and W. R. Thomas. 2012. Sensitizing and Th2 Adjuvant Activity of Cysteine Protease Allergens. *International archives of allergy and immunology* 158: 347–358.
193. **Galli**, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454: 445–454.
194. **Acharya**, M., G. Borland, A. L. Edkins, L. M. Maclellan, J. Matheson, B. W. Ozanne, and W. Cushley. 2010. CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 12–23.
195. **Holgate**, S., T. Casale, S. Wenzel, J. Bousquet, Y. Deniz, and C. Reisner. 2005. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 459–465.
196. **Kang**, J. Y., J. W. Kim, J. S. Kim, S. J. Kim, S. H. Lee, S. S. Kwon, Y. K. Kim, H. S. Moon, J. S. Song, S. H. Park, and S. Y. Lee. 2010. Inhibitory effects of anti-immunoglobulin E antibodies on airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Asthma* 47: 374– 380.
197. **Tournoy**, K. G., J. C. Kips, C. Schou, and R. A. Pauwels. 2000. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy* 30: 79–85.
198. **Wardlaw**, A. J., C. E. Brightling, R. Green, G. Woltmann, P. Bradding, and I. D. Pavord. 2002. New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. *Clin. Sci.* 103: 201–211.
199. **Palomares**, O., G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.* 40: 1232–1240.
200. **Chatila**, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A. M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106: R75–81.
201. **Chatila**, T. A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 949–959; quiz 960.
202. **Shi**, Y., G. Shi, H. Wan, L. Jiang, X. Ai, H. Zhu, W. Tang, J. Ma, X. Jin, and B. Zhang. 2011. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin. Med. J.* 124: 1951–1956.
203. **Jutel**, M., M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszczyk, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2003. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol* 33: 1205–1214.
204. **Gri**, G., S. Piconese, B. Frossi, V. Manfredi, S. Merluzzi, C. Tripodo, A. Viola, S. Odom, J. Rivera, M. P. Colombo, and C. E. Pucillo. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29: 771–781.
205. **Bruley-Rosset**, M., I. Miconnet, C. Canon, and O. Halle-Pannenko. 1990. Mlsa generated suppressor cells. I. Suppression is mediated by double-negative (CD3+CD5+CD4-CD8-) alpha/beta T cell receptor-bearing cells. *J. Immunol.* 145: 4046–4052.
206. **Ma**, Y., K. M. He, B. Garcia, W. Min, A. Jevnikar, and Z.-X. Zhang. 2008. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection

- pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* 15: 56–63.
207. **Hill**, M., P. Thebault, M. Segovia, C. Louvet, G. Bériou, G. Tilly, E. Merieau, I. Anegon, E. Chiffolleau, and M.-C. Cuturi. 2011. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am. J. Transplant.* 11: 2036–2045.
208. **Voelkl**, S., R. Gary, and A. Mackensen. 2011. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) double-negative T cells. *Eur. J. Immunol* 41: 739–748.
209. **Chen**, W., M. S. Ford, K. J. Young, M. I. Cybulsky, and L. Zhang. 2003. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J. Immunol* 170: 1846–1853.
210. **Hillhouse**, E. E., C. Beauchamp, G. Chabot-Roy, V. Dugas, and S. Lesage. 2010. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol. Cell Biol.* 88: 771–780.
211. **He**, K. M., Y. Ma, S. Wang, W.-P. Min, R. Zhong, A. Jevnikar, and Z.-X. Zhang. 2007. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur. J. Immunol* 37: 3455–3466.
212. **Gao**, J. F., M. S. F. McIntyre, S. C. Juvet, J. Diao, X. Li, R. B. Vanama, T. W. Mak, M. S. Catral, and L. Zhang. 2011. Regulation of Antigen-expressing Dendritic Cells by Double Negative Regulatory T Cells. *Eur J Immunol* .
213. **Mixter**, P. F., J. Q. Russell, G. J. Morrissette, C. Charland, D. Aleman-Hoey, and R. C. Budd. 1999. A model for the origin of TCR-alpha-beta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals. *J. Immunol.* 162: 5747–5756.
214. **Schönrich**, G., U. Kalinke, F. Momburg, M. Malissen, A. M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G. J. Hämmerling, and B. Arnold. 1991. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65: 293–304.
215. **Treiner**, E., and O. Lantz. 2006. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 519–526.
216. **Bendelac**, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 297–336.
217. **McIver**, Z., B. Serio, A. Dunbar, C. L. O’Keefe, J. Powers, M. Wlodarski, T. Jin, R. Sobecks, B. Bolwell, and J. P. Maciejewski. 2008. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 141: 170–178.
218. **Watanabe-Fukunaga**, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314–317.
219. **Takahashi**, T., M. Tanaka, C. I. Brannan, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, T. Suda, and S. Nagata. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969–976.
220. **Nakano**, K., K. Saito, S. Mine, S. Matsushita, and Y. Tanaka. 2007. Engagement of CD44

- up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* 12: 45–54.
221. **Hamad**, A. R. A., A. S. Mohamood, C. J. Trujillo, C.-T. Huang, E. Yuan, and J. P. Schneck. 2003. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* 171: 2421–2426.
222. **Sawitzki**, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber, and K. J. Wood. 2005. IFN- γ production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J. Exp. Med.* 201: 1925–1935.
223. **Thomson**, C. W., B. P.-L. Lee, and L. Zhang. 2006. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol. Res* 35: 163–178.
224. **Barthlott**, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. J. Atkins, J. Christensen, A. O’Garra, and B. Stockinger. 2005. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int. Immunol.* 17: 279–288.
225. **Pandiyani**, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1353–1362.
226. **Vercoulen**, Y., E. J. Wehrens, N. H. van Teijlingen, W. de Jager, J. M. Beekman, and B. J. Prakken. 2009. Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells. *PLoS ONE* 4: e7183.
227. **Oberle**, N., N. Eberhardt, C. S. Falk, P. H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF- β , and various inhibitors of TCR signaling. *J. Immunol.* 179: 3578–3587.
228. **Baecher-Allan**, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. 2001. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167: 1245–1253.
229. **Tran**, D. Q., D. D. Glass, G. Uzel, D. A. Darnell, C. Spalding, S. M. Holland, and E. M. Shevach. 2009. Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J. Immunol.* 182: 2929–2938.

VI. Zusammenfassung

Die Verabreichung von hohen Antigendosen im Rahmen der allergenspezifischen Immuntherapie (SIT) resultiert in der Induktion einer allergenspezifischen Toleranz in sensibilisierten Patienten. Vorangegangene Studien der Klinischen Forschergruppe Allergie identifizierten CD4-CD8- doppelt-negative T-Zellen (dnTZ), welche nach wiederholter intraperitonealer Injektion von hohen Dosen (HD) des an das Adjuvans Aluminiumhydroxid adsorbierten Antigens Keyhole Limpet Hemocyanin in Mäusen induziert wurden, als potente Suppressorzellen für die IgE-Produktion. Mäuse, die hingegen mit niedrigen Dosen (LD) desselben Antigens behandelt wurden, entwickelten eine starke, persistierende IgE-Immunantwort.

Im Fokus meiner Doktorarbeit stand die phänotypische Charakterisierung der dnTZ aus HD-Mäusen sowie die Aufklärung möglicher inhibitorischer Wirkmechanismen. In Erweiterung der bisherigen Arbeiten und in Anlehnung an die klinische Praxis bei der Durchführung der SIT habe ich bei meinen Untersuchungen die subkutane Injektion ohne Adjuvans als alternative Applikationsroute verwendet. In meinen Studien konnte ich durch die zusätzliche Verwendung des klinisch relevanten Allergens Ovalbumin die Allgemeingültigkeit des Konzepts der antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion durch dnTZ verifizieren. Die Vakzinierung mit hohen Antigendosen verhinderte die Ausbildung einer IgE-Produktion in antigenspezifischer Weise. HD-Mäuse wiesen *in vitro* eine geringere Aktivierung von TH2-Zellen als LD-Mäuse auf. Im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung wiesen HD-Mäuse eine reduzierte Atemwegsreaktivität sowie eine geringere pulmonale TH2-Zytokinproduktion auf.

Ich konnte zudem tendenziell eine leicht erhöhte Anzahl von dnTZ in HD-Mäusen messen. Die in HD-Mäusen induzierten dnTZ habe ich durchflusszytometrisch charakterisiert, konnte jedoch keinen eindeutigen Marker für suppressive dnTZ identifizieren. In einem adoptiven Transferexperiment war eine T-Zellpopulation von HD-Mäusen aus der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor-tragende T-Zellen depletiert worden waren, ähnlich wie die Ausgangs-T-Zellpopulation in der Lage die IgE-Produktion in den Rezipienten zu inhibieren, was darauf schließen lässt, dass die untersuchten regulatorischen dnTZ einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimieren.

Die exogene Zugabe von IL-2 in einem Kokultursystem führte zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität der Suppressorzellen aus HD-Mäusen im Vergleich zu denen aus LD-Mäusen gegenüber Ovalbumin-reaktiven T-Effektorzellen.

E Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreaktivität
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
APZ ^{OVA}	OVA-Peptid beladene APZ
AR	Atemreaktivität
BAL	Bronchoaleolare Lavage
BALF	Bronchoaleolare Lavage Flüssigkeit
β-Hex	beta-Hexosaminidase
BSA	Bovines Serumalbumin
BZ	B-Zelle
Bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
cKit	Thyrosinkinase KIT
Cpm	counts per minute = Zähler pro Minute
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CD152)
Cy5, Cy7	Cytochrom-5, -7
dnTZ	doppelt negative T-Zelle(n)
DTAF	Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein
DZ	Dendritische Zelle
EFF	Effektoren
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FcεRII	niedrigaffiner IgE-Rezeptor (CD23)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward scatter = Größe von Zellen im FACS
GATA-3	GATA binding protein 3
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related (GITR) Protein
HD	hohe Dosis OVA (100-1000 µg)
HDM	house dust mite = Hausstaubmilbe
HLA	humanes Leukozytenantigen
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukine
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
KLH	Keyhole limpet hemocyanine
LD	niedrige Dosis OVA (0,1-1 µg)
LNC	cervikale Lymphknotenzellen

LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetische Zellseparation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute(n)
NBNT	Nicht-B-Nicht-T-Zellen
NK	Natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PanTZ	mithilfe des MACS PanT cell Isolation Kits negative selektionierte TZ
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMA	Phorbolmyristataacetat
Rag2	recombination activating gene
REG	Regulatoren
RBL	Rat basophilic leucemia
mRNA	(Boten-) Ribonukleinsäure
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SC	Erythrozyten-lysierte Milzzellen
SCIT	subkutane Immuntherapie
SD	Standardabweichung
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SSC	Side Scatter = Maß der Granularität von Zellen im FACS
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Strep	Streptomycin
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TH	T-Helferzelle
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
Tr1	T regulatorische Zelle 1
Treg	regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic stromal lymphopoetin
TZ	T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
VIT	Venom Immunotherapy = SIT mit Bienengiftallergenen
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

F Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verena Katharina Raker
Nationalität: deutsch
Adresse: Michael-Müller-Ring 2, 55128 Mainz
Familienstand: ledig

Bildungsgang

2009-2012 Doktorarbeit in der klinischen Forschergruppe Allergie, Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz, unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Angelika B. Reske-Kunz

2008 Diplomarbeit in der klinischen Forschergruppe Allergie, Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz, unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Angelika B. Reske-Kunz

2003-2008 Diplomstudiengang Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2002-2003 Diplomstudiengang Biomedizinische Chemie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

2002 Abitur am Albertus-Magnus-Gymnasium Friesoythe

1995-1993 Orientierungsstufe Bösel

1990-1993 Grundschule St. Martin Bösel

Beruflicher Werdegang

Seit April 2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (PostDoc) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Kerstin Steinbrink an der Hautklinik Mainz

2009-2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Angelika B. Reske-Kunz an der Hautklinik Mainz

2004- 2007 Studentische Hilfskraft bei Ganzimmun AG in Mainz

August/September 2002 Aushilfe im Bereich Konfektionierung und Qualitätssicherung der Essex Animal Health Pharma GmbH in Friesoythe

