

Die Rolle
CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen
in der Niedrigzonentoleranz
gegenüber Kontaktallergenen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Ulrike Frankenberg
Mainz, 1. Juli 2009

Angefertigt an der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin Mainz

Abstracts und Vorträge

1. **Frankenberg U**, M Maurer, R Alt, M Metz, J Knop, and K Steinbrink. Critical Role of TNF- α for tolerance to allergens: TNF-receptor 2 induces apoptosis of CD8⁺ effector T cells of contact hypersensitivity. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 8.3-10.3.2007, Freiburg. *Exp. Dermatol.* 16: 197 (V18, P0125), 2007. (Vortrag)
2. **Frankenberg U**, M Maurer, R Alt, M Metz, J Knop, and K Steinbrink. TNF- α is required for tolerance. ESDR, 6.9-9.9.2007, Zürich. *J. Invest. Dermatol.* 127: S7 (040), 2007. (Vortrag)
3. **Frankenberg U**, N Lorenz, R Alt, and K Steinbrink. The role of cyclophosphamide-sensitive IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in low zone tolerance to contact allergens. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Erlangen, 28.2-1.3.2008, Freiburg. *Exp. Dermatol.* 17: 242 (V04, P001), 2008. (Vortrag)
4. Lorenz N, **U Frankenberg**, R Alt, and K Steinbrink. CD8⁺CD11c⁺ dendritic cells are required for tolerance to contact allergens. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 28.2-1.3.2008, Erlangen. *Exp. Dermatol.* 17: 249 (P046), 2008. (Poster)
5. Lorenz N, **U Frankenberg**, R Alt, and K Steinbrink. Critical role of CD8⁺CD11c⁺ dendritic cells in tolerance to contact allergens. IID Meeting, European Society of Dermatology, 14.5-17.5.2008, Kyoto, Japan. *J. Invest. Dermatol.* 128: S178 (1068), 2008. (Poster)
6. **Frankenberg U.**, N. Lorenz, R. Alt, and K. Steinbrink. The critical role of CD4⁺CD25⁺ naturally occurring regulatory T cells in low zone tolerance to contact allergens. Joint Annual Meeting of Immunology (ÖGAI, DGfI), 3.09-6.09.2008, Salzburg, Österreich. *The Middle European Journal of Medicine* 01/08 (P210), 2008. (Poster)
7. **Frankenberg U**, N Lorenz, S Grabbe, and K Steinbrink. Hapten specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are critical for low zone tolerance to contact allergens and induction of CD8⁺ suppressor T cells. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 5.3-7.3.2008, Heidelberg. *Exp. Dermatol.* 18: 275 (P004), 2009. (Poster)
8. **Frankenberg U**, N Lorenz, S Grabbe, and K Steinbrink. Hapten-spezifische CD4⁺CD25⁺ regulatorische T Zellen sind notwendig für die Induktion der Niedrigzonentoleranz gegenüber Kontaktallergenen. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie e.V, 19.03-20.03.2009, Mainz, 2009. (Vortrag)
9. **Frankenberg U**, N Lorenz, S Grabbe, and K Steinbrink. The role of IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tolerance to allergens. Society for Investigative Dermatology (SID), 06.05-09.05.2009, Montreal, Canada. *J. Invest. Dermatol.* 129: S111 (665), 2009. (Poster)

Publikationen

Adler HS, **U Frankenberg** and K Steinbrink. The role and function of regulatory T cells in hapten-specific tolerance and allergic contact dermatitis. *Allergologie*. 6: 221-231, 2008 (Review).

Frankenberg U, M Maurer, N Lorenz, B Seebach, M Metz, H Adler, and K Steinbrink. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects from allergy. (eingereicht)

Frankenberg U, N Lorenz, T Sparwasser, T Jakob, S Martin and K Steinbrink. Hapten-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are critical for low zone tolerance to contact allergens and induction of CD8⁺ suppressor T cells. (Manuskript in Vorbereitung)

Frankenberg U, N Lorenz, R Alt, S Jung, and K Steinbrink. CD8⁺CD11c⁺ dendritic cells are required for tolerance to contact allergens. (Manuskript in Vorbereitung)

1. EINLEITUNG	1
1.1 Allergische Reaktionen	1
1.2 Allergische Kontakthypersensibilisierung	3
1.3 Immunologische Toleranz	5
1.3.1 Zentrale Toleranz	6
1.3.2 Periphere Toleranz	6
1.3.3 Orale Toleranz	7
1.3.4 Toleranz durch Ultraviolett-Bestrahlung	9
1.3.5 Niedrigzonentoleranz.....	9
1.4 Regulatorische T-Zellen	11
1.4.1 Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen	13
1.4.2 Induzierbare regulatorische T-Zellen	14
1.5 Ziel der Arbeit.....	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte und Plastikware	16
2.1.1.1 Geräte	16
2.1.1.2 Plastikware	16
2.1.2 Chemikalien und Antikörper.....	17
2.1.2.1 Chemikalien/ Enzyme.....	17
2.1.2.2 Antikörper.....	18
2.1.2.3 Isolation Kits for Adoptive Transfers.....	20
2.1.3 Materialien für Zellkultur	20
2.1.3.1 Zellkulturmedium	20
2.1.3.2 Puffer und andere Reagenzien	20
2.1.4 Materialien für ELISA-Untersuchung	20
2.1.4.1 Kits	20
2.1.4.2 Puffer und andere Reagenzien	21
2.1.5 Versuchstiere.....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Versuchsdurchführung	21
2.2.1.1 Standard NZT/CHS Protokoll.....	21
2.2.1.2 Protokoll zur Depletion CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs mittels PC61	22
2.2.1.3 Protokoll zur Reduktion CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs mittels Cyclophosphamid	22
2.2.1.4 Adoptiver Transfer	23
2.2.2 Ohrschwellung.....	23
2.2.3 Methoden der Zellkultur	23
2.2.4 Gewinnung der Lymphknoten	23
2.2.5 Aufarbeitung der Lymphknoten	24
2.2.6 Hapten-spezifische Restimulation	24
2.2.7 T-Zell-Anreicherung	25
2.2.7.1 CD8 ⁺ T-Zell-Anreicherung	25
2.2.7.2 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs-Anreicherung	25
2.2.8 T-Zell-Proliferationsassay.....	26
2.2.8.1 Hintergrund.....	26
2.2.8.2 Ausführung	27
2.2.9 Zytokinanalyse mittels ELISA	27

2.2.9.1 Hintergrund.....	27
2.2.9.2 Ausführung	28
2.2.10 Durchflusszytometrische Untersuchungen	29
2.2.10.1 Hintergrund.....	29
2.2.10.2 Durchführung Standard-Durchflusszytometrische-Messung.....	30
2.2.10.3 Durchführung Intrazelluläres Durchflusszytometrische: Messung von FOXP3 ⁺ T-Zellen	30
2.3 Statistische Auswertung	30
3. ERGEBNISSE	32
3.1 Immunantworten in der NZT	32
3.1.1 Kutane Entzündungsreaktion.....	33
3.1.2 T-Zell-Proliferationstest.....	33
3.2 Keine Unterschiede in der Anzahl CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nTregs während der NZT im Vergleich zu der CHS.....	35
3.3 Depletion und funktionelle Inhibition der Tregs während der Induktions-Phase führt zur Aufhebung der NZT	38
3.3.1 Depletion CD25 ⁺ T-Zellen durch Gabe des anti-CD25-Antikörpers (PC61).....	38
3.3.2 Reduktion und funktionelle Inhibition von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen durch die Gabe von Cyclophosphamid	41
3.4 CD4⁺CD25⁺ T-Zellen induzieren die Entwicklung CD8⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT.....	45
3.5 Die Hapten-unspezifische Wirkung CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der NZT	48
3.6 Zusammenfassung der Resultate	51
4. DISKUSSION	53
4.1 Charakterisierung der regulatorische T-Zellen.....	53
4.1.1 Induzierte regulatorische T-Zellen.....	53
4.1.2 Natürliche vorkommende regulatorische T-Zellen	54
4.1.3 Die Rolle der nTregs in verschiedenen Krankheits-Modellen.....	55
4.1.4 Die Funktion von nTregs bei allergischen Immunreaktionen.....	56
4.1.5 nTregs in der Kontakthypersensibilisierung	56
4.2 Die Bedeutung der nTregs in der Niedrigzonentoleranz	58
4.2.1 Die Niedrigzonentoleranz wird durch CD8 ⁺ iTregs vermittelt	58
4.2.2 Die Rolle von IL-2 in der Niedrigzonentoleranz	59
4.2.2 Die Induktion der Niedrigzonentoleranz ist IL-10-abhängig.....	60
4.2.3 Die Rolle CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen für die NZT	61
4.2.4 Die suppressive Funktion von nTregs der NZT ist Hapten-unspezifisch	64
4.3 nTregs in anderen Toleranz-Modellen.....	65
4.3.1 nTregs in der oralen Toleranz	65
4.3.2 nTregs in der UVB-Toleranz	66
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	68

6. LITERATURVERZEICHNIS.....	69
7. ABKÜRZUNGEN	84
8. LEBENSLAUF	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vier Reaktionen der allergischen Immunantworten.....	3
Abbildung 2: Entstehung einer kutanen Kontakthypersensibilisierung.....	5
Abbildung 3: Kontakthypersensibilisierung versus Niedrigzonentoleranz.....	11
Abbildung 4: Subtypen regulatorischer T-Zellen	13
Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf: Standard NZT-Protokol	33
Abbildung 6: Kutane Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation: CHS versus NZT	34
Abbildung 7: Zytokinproduktion: CHS versus NZT.....	35
Abbildung 8: Schematischer Versuchsablauf: Bestimmung der Anzahl der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen während der NZT und CHS	36
Abbildung 9: Anzahl der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen während der NZT im Vergleich zur CHS	37
Abbildung 10: Schematischer Versuchsablauf: Depletion von CD25 ⁺ T-Zellen während der Induktions-Phase der NZT	38
Abbildung 11: Reduktion und Rückkehr der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen nach PC61- Behandlung.....	39
Abbildung 12: Messungen der Immunantworten nach Depletion von CD25 ⁺ T-Zellen mittels eines anti-CD25-Antikörpers (PC61)	41
Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf: Reduktion von nTregs während der Induktions-Phase der NZT	42
Abbildung 14: Reduktion und Rückkehr der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen nach CY- Behandlung.....	43
Abbildung 15: Messungen der Immunantwort nach Reduktion der nTregs durch CY.....	44
Abbildung 16: Schematischer Versuchsablauf: Transfer der CD8 ⁺ Suppressor-T-Zellen nach Depletion CD4 ⁺ CD25 ⁺ nTregs mit PC61	46
Abbildung 17: Analyse der Immunantworten nach Transfer CD8 ⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT	48
Abbildung 18: Schematischer Versuchablauf: Transfer regulatorischer CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	49
Abbildung 19: Untersuchung der immunologischen Prozesse nach Transfer CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs	51

1. Einleitung

Tagtäglich werden Lebewesen durch den Kontakt mit ihrer Umwelt mit Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten, aber auch chemischen Substanzen konfrontiert. Eine wesentliche Funktion des Immunsystems ist es, durch körpereigene Abwehrkräfte diese exogenen Faktoren und Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen. Das komplexe Immunsystem besteht aus der Zusammenarbeit zwischen Organen, Zellen und Molekülen und nur wenn diese interagieren, ist die Funktionalität dieses Systems gewährleistet¹.

1.1 Allergische Reaktionen

Unter gewissen Umständen reagiert das Immunsystem auf an sich harmlose Substanzen und es entsteht eine überschießende Abwehrreaktion in Form einer allergischen Reaktion. Der Begriff Allergie, entstammt dem Griechischen und bedeutet „die Fremdreaktion“. Es beschreibt die erworbene, adaptive Immunantwort auf Fremdstoffe, auch Allergene oder Antigene genannt, die in den Körper eindringen und dadurch eine unnötigen Reaktion hervorrufen. Die Hypersensitivität der Immunabwehr besteht aus mehreren verschiedenen Immunreaktionen und wurden erstmals 1963 von Coombs und Gell in vier Typen eingeteilt (Abb. 1)¹.

Die Sofort-Typ I Reaktion ist die am weitesten verbreitete und ist IgE- (Immunglobulin E) vermittelt. Hierzu zählen unter anderem die allergische Rhinitis und das allergische Asthma, aber auch bestimmte Formen der Nahrungsmittelallergie. Beim Erstkontakt wird der Organismus nur sensibilisiert, das heißt dass keine Symptome ausgelöst werden. Dabei produzieren B-Zellen IgE-Antikörper, die auf Mastzellen binden und durch Allergene vernetzt werden. Beim Zweitkontakt des Allergens mit dem gebildeten IgE-Mastzell-Komplex wird Histamin ausgeschüttet, so dass eine Aktivierung des Immunsystems entsteht. Durch die Entzündungsreaktion kann eine Gewebsschädigung entstehen, welche sich nach wenigen Minuten als allergische Symptome äußert.

Die zytotoxische-Typ II Reaktion ist IgG-vermittelt und umfasst unter anderem allergische Reaktionen, die durch Medikamente ausgelöst werden können (hämolytische Anämie: induzierter Mangel an roten Blutkörperchen). Die Typ II Allergie ist eine zytotoxische Reaktion, wobei körpereigene Zellen geschädigt werden. Hier bilden die körperfremden bzw. körpereigenen Antigene gebunden an Antikörper einen Immunkomplex, der zytotoxische Killerzellen und das Komplementsystem aktiviert. Die Zerstörung der körpereigenen Zellen führt dann zu einer allergischen Reaktion.

Der Immunkomplex vom Typ III ist auch IgG-vermittelt und löst Allergien wie die Serumkrankheit (allergische Reaktion gegenüber artfremden, nicht menschlichen Eiweißen) aus. Dieser Typ der Allergie entsteht durch die Bildung von im Blut zirkulierenden Immunkomplexen aus Allergen und IgG-Antikörpern. Ist die unspezifische Immunabwehr nicht in der Lage, diese Immunkomplexe vollständig zu zerstören, lösen die im Gewebe abgelagerten Komplexe eine Entzündungsreaktion aus. Die Symptome der hier entstandenen Allergie treten erst nach Stunden oder in manchen Fällen auch erst nach ein paar Tagen auf.

Die Spät-Typ IV-Reaktion ist eine zelluläre Immunreaktion, die nicht durch Immunoglobuline, sondern durch T-Zellen hervorgerufen wird. Im Allgemeinen wird die Allergie erst nach dem Zweitkontakt mit demselben Allergen ausgelöst. Als Beispiel dient die allergische Kontaktdermatitis, die durch die Entwicklung einer ekzematischen Hautreaktion in Form von Hautrötungen, Ödemen und Bläschen gekennzeichnet ist. Beim Erstkontakt dringt das Allergen in die Haut ein und wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APZs) aufgenommen und prozessiert. Das prozessierte Allergen wird den T-Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex: MHC) präsentiert und aktiviert diese. Die T-Zellen differenzieren zu Gedächtnis-T-Zellen, die bei einem erneuten Kontakt, der Zweitexposition mit dem Allergen, durch Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung eine heftige Entzündungsreaktion auslösen. Die Symptome treten erst später, 12 bis 72 Stunden nach dem zweiten Allergenkontakt auf².

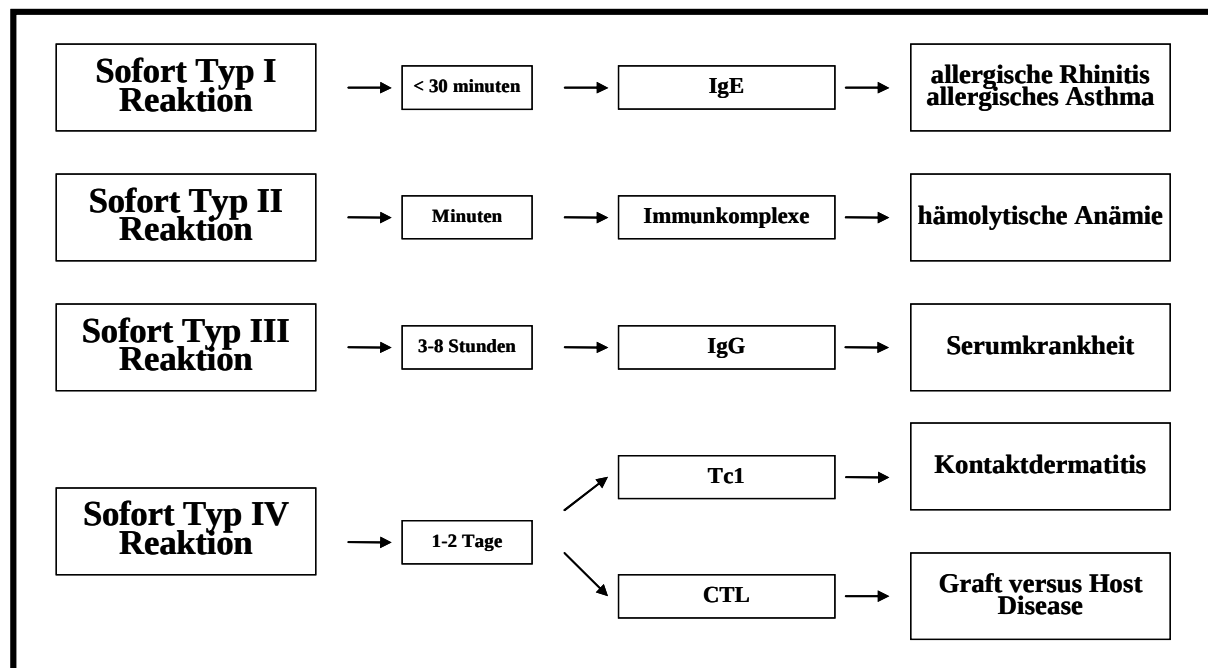


Abbildung 1: Vier Reaktionen der allergischen Immunreaktionen

Die allergischen Erkrankungen werden in vier Typen unterteilt: nach der Zeitspanne zwischen Allergenkontakt, dem Auftreten von Symptomen und nach den unterschiedlichen immunologischen Reaktionsmechanismen.

1.2 Allergische Kontakthypersensibilisierung

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine der häufigsten Berufserkrankungen in den westlichen Industrieländern³. Sie ist nicht nur ein großer Kostenfaktor unserer heutigen Gesellschaft, sondern darüber hinaus leiden die betroffenen Personen stark an den Symptomen der Allergie⁴. Die allergische Kontaktdermatitis ist eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion und gehört zu der Typ IV Reaktion. Sie tritt erst 24 bis 72 Stunden nach Zweitkontakt mit dem Allergen auf⁵.

Analysen im Maus-Modell der allergischen Kontaktdermatitis (contact hypersensitivity: CHS) führen zu folgenden Ergebnissen. Die CHS ist eine CD8⁺ (Cluster of Differentiation 8) Tc-1 (cytotoxische T-Zelle) Zell-vermittelte Immunantwort der Haut, die durch Haptene ausgelöst wird^{6,7}. Haptene sind kleine organische Moleküle, die alleine nicht in der Lage sind eine Immunreaktion hervorzurufen. Diese Haptene binden Proteine und bilden ein Protein-Transport-Konjugat, das nun im Körper eine Immunreaktion auslösen kann. Zu den Haptenen gehören unter anderem halogenierte Nitrobenzole (TNCB: 2,4,6-Trinitro-1-Chlorbenzol und DNFB: 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene), Oxazolone, FITC (Fluorescein) und anorganische Stoffe (Nickel-, Titan- oder Chrom-Ionen)⁸.

Die Entstehung einer CHS kann in zwei Phasen unterteilt werden: die Induktions-Phase (Sensibilisierung) und die Effektor-Phase (Auslösephase)⁹. Während der Induktions-Phase der

allergischen Kontaktdermatitis dringt das Kontaktallergen in die Haut ein, bildet Protein-Hapten-Komplexe und wird von epidermalen Langerhans Zellen und dermalen dendritischen Zellen aufgenommen¹⁰. Nach Aufnahme der Haptene wandern die APZs in die drainierenden Lymphknoten und differenzieren zu optimalen APZs^{7,10}. In den Lymphknoten präsentieren die dermalen dendritischen Zellen und Langerhans Zellen über den MHC I- bzw. MHC II-Moleküle das Protein-Hapten-Konjugat den T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Es folgt die Aktivierung und das Priming der Hapten-spezifischen T-Zellen^{12,13}. Der Zell/Zell-Kontakt entsteht nur durch gleichzeitiges Binden von kostimulatorischen Molekülen auf den APZs (z.B. B7-1, B7-2, ICOSL (inducible costimulator-ligand)) als auch auf der T-Zelle (z.B. CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), CD28, ICOS (inducible costimulator))¹⁴. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen stellen die Effektor-T-Zellen der CHS dar und weisen durch IL-2 Produktion sowie Ausschüttung von Tc-1 spezifischen Zytokinen (z.B. Interferon: IFN- γ) eine Tc-1 spezifische Immunantwort auf^{5,15,16}. CD8⁺ Th (T-helfer Zelle) 17-produzierende T-Zellen sezernieren IL-17, welches eine wichtige Rolle in der Effektor-Phase der CHS spielt¹⁵. Depletionsversuche bzw. Experimente mit knock-out Tieren haben gezeigt, dass sowohl IL-17 als auch IFN- γ an einer CHS beteiligt sind. Dies zeigt, dass die Sensibilisierung mit einem Allergen zur Generierung von CD8⁺ Tc-1 (IFN- γ) und CD8⁺ Th17 T-Zellen (IL-17) führt¹⁸⁻²¹. Ausgelöst wird die CHS erst nach einem erneutem Kontakt mit dem Hapten während der Effektor-Phase⁹. Bei dem Zweitkontakt wird das Hapten von lokalen APZs aufgenommen, prozessiert und präsentiert. Die während der Induktions-Phase geprimten CD8⁺ Effektor-T-Zellen werden aktiviert und es findet eine klonale Expansion dieser Zellen statt, die in die Haut einwandern. Es entsteht nach 12 bis 48 Stunden, unter anderem durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, eine lokale zelluläre Infiltration, die sich klinisch als Entzündungsreaktion durch Rötung, Ödem- und Blasenbildung äußert^{6,15,22}.

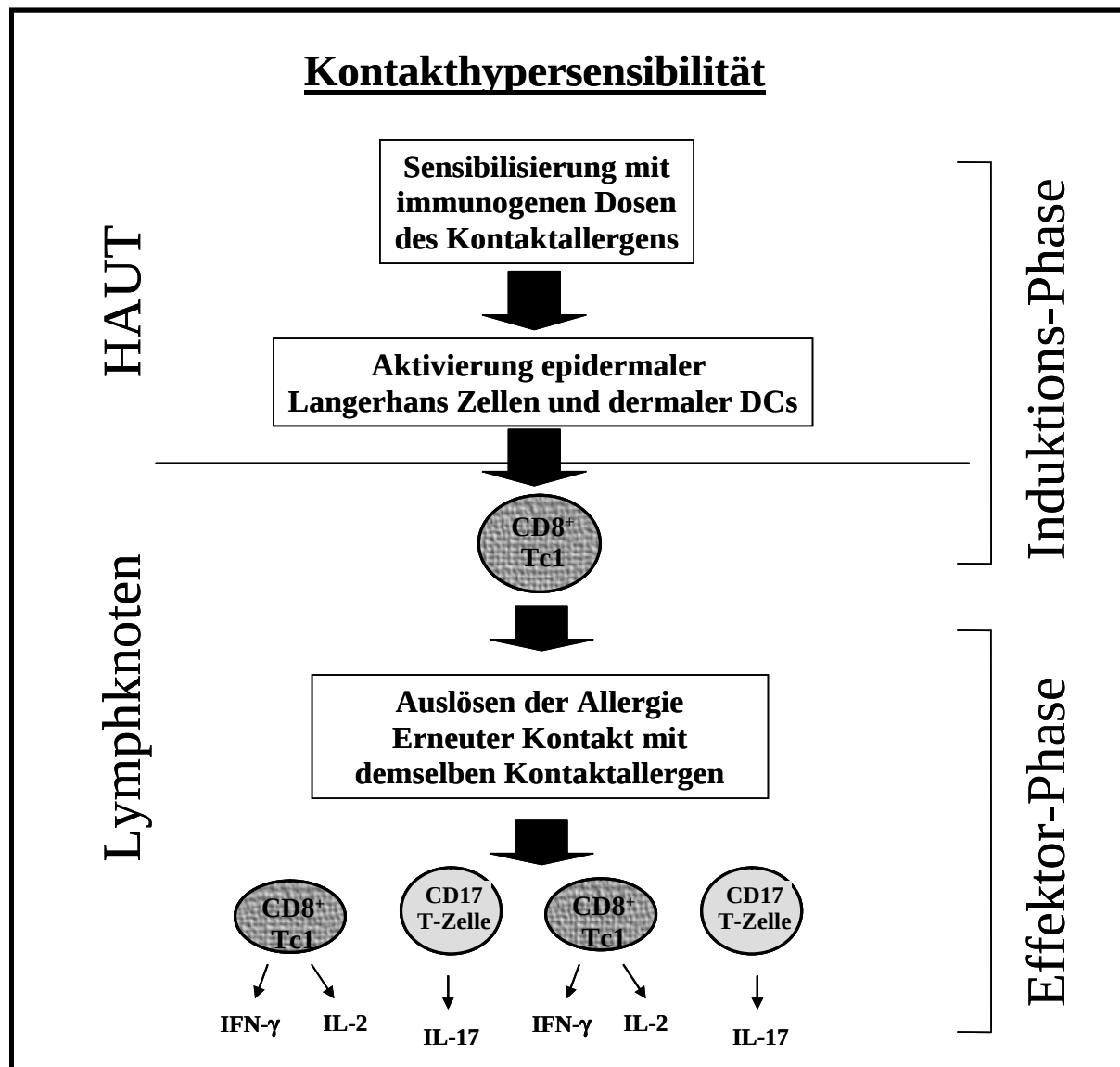


Abbildung 2: Entstehung einer kutanen Kontakthypersensibilisierung

Schematische Darstellung einer Induktion von CD8⁺ T-Zellen bei der Kontakthypersensibilisierung.

1.3 Immunologische Toleranz

Zum Überleben eines Individuums muss sichergestellt werden, dass pathogene Fremdorganismen abgewehrt, aber die eigenen Zellen dabei nicht angegriffen werden. Der Körper muss in der Lage sein zwischen „Selbst und Fremd“ zu unterscheiden, damit keine Autoimmunität hervorgerufen wird (überschießende Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe). Daher gehört die immunologische Toleranz zu einer der wichtigsten Aufgaben des Immunsystems. Die Immuntoleranz kann in zwei verschiedenen Mechanismen unterteilt werden: die zentrale und die periphere Toleranz.

1.3.1 Zentrale Toleranz

Die Mechanismen der zentralen Toleranz sind essentiell für die Vermeidung von Autoimmunität. Hierbei werden autoreaktive T-Zellen während ihrer Entstehung im Thymus mittels Negativ-Selektion deletiert. Bei der Negativ-Selektion unterliegen T-Zellen mit starker und sehr niedriger Affinität zum Autoantigen-MHC-Komplex einer klonalen Deletion (Apoptose)²³⁻²⁷. Bei der Positiv-Selektion erhalten T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor mäßig bis stark an MHC I- und MHC II-Moleküle der Thymus-Epithelzellen mit gleichzeitiger Expression körpereigener Peptide bindet, ein Überlebenssignal. Etwa 3-5 % aller T-Zellen unterliegen dieser Positiv-Selektion, reifen im Thymus und wandern in die Peripherie aus. Eine weitere Gruppe von T-Zellen, die im Thymus maturieren, sind natürlich vorkommende $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (nTregs), die der Deletion im Thymus entgehen. nTregs werden eine immunregulatorische Wirkung zugesprochen, die aber nicht direkt an der zentralen Toleranz beteiligt ist²⁸.

1.3.2 Periphere Toleranz

In der Peripherie sind weitere Autoantigene vorhanden, die nicht im Thymus vorkommen. Durch die periphere Toleranz werden sowohl autoreaktive Zellen gegenüber dem Antigen, als auch T-Zellen, die durch exogene Prozesse bedingt an Immunreaktionen beteiligt sind, durch verschiedene Mechanismen kontrolliert: die intrinsischen oder extrinsischen Toleranz-Prozesse. Die intrinsischen Vorgänge beschreiben die passive Aktivierung des Immunsystems (Ignoranz, Anergie, aktivierungsinduzierter Zelltod (AICID) oder Apoptose). In den extrinsischen Mechanismen dagegen wird das Immunsystem durch regulatorische T-Zellen (Treg) inhibiert (Suppression).

Bei der Ignoranz werden die Autoantigene vom Immunsystem nicht wahrgenommen, da sie entweder in zu geringen Mengen vorhanden sind oder in Regionen des Körpers exprimiert werden, an der das Immunsystem nicht beteiligt ist (z.B. Auge, Plazenta)²⁹. Die Anergie charakterisiert eine T-Zelle in Ruhe, die z.B. durch einen T-Zell-Rezeptor-Stimulus ohne kostimulierende Signale hervorgerufen werden kann. Wird das Autoantigen erkannt, kommt es zu einer Inaktivierung der Zelle. Das heißt, sie produzieren kein IL-2 und weisen eine niedrige Proliferationsrate auf³⁰. Diese funktionelle Inaktivierung einer T-Zelle (Anergie) kann durch die Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen oder bei Signalübermittlung durch, z.B. das CTLA-4 Molekül induziert werden³¹.

Der programmierte Zelltod der T-Zelle (Apoptose) kennzeichnet die AICD. Durch die Stimulation von verschiedenen Oberflächenrezeptoren wird eine Signaltransduktionskaskade induziert, die zur Apoptose führt³². Als Beispiel ist hier die Interaktion des Rezeptors Fas (CD95) und einen Liganden FasL (CD95L) zu nennen. Erfolgt eine Bindung von Rezeptor und Ligand, bildet sich ein Trimer mit Todesdomäne. Es werden Adaptoren wie FADD (Fas-associated via death domain) rekrutiert, die durch die Caspase 8 die Apoptose der Zelle induzieren³³.

In der aktiven Suppression werden Tregs gebildet, die durch ihre Aktivierung andere T-Zell-Subpopulationen und Immunzellen unterdrücken³⁴. Verschiedene Tregs-Populationen ($CD4^+$ iTregs (induzierte Tregs), $CD8^+$ Tregs und nTregs) lösen eine Suppression auf unterschiedliche Weise aus. Als Beispiel der iTregs dienen die T regulatorische Typ 1 (Tr1-) und Th 3-Zellen. Diese Zellen werden in der Peripherie induziert. Tr1-Zellen produzieren nach Aktivierung IL-10 und Th3-Zellen TGF- β (Transforming growth factor- β)³⁵. Die während der zentralen Toleranz im Thymus entstandenen $CD4^+CD25^+$ nTregs haben weiterhin wichtige suppressive Eigenschaften für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz³⁶. Eine weitere Population von Tregs mit suppressiven Eigenschaften sind $CD8^+$ Tregs, auch $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen genannt³⁷.

Eine Toleranz kann auch aus der Interaktion zwischen mehreren der oben beschriebenen Mechanismen entstehen. Hierzu gehören zum Beispiel die orale-, die durch Ultraviolette (UV) Strahlungs-induzierte- und die Niedrigzonentoleranz (NZT), die im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.3.3 Orale Toleranz

Das Immunsystem der gastrointestinalen Mukosa wird ständig mit einer großen Anzahl von Antigenen konfrontiert, die potentiell schädlich für den Gesamtorganismus sein können. Zum Schutz können beispielsweise Nahrungsmittelantigene von der Darmmukosa immunologisch toleriert werden³⁸. Die orale Toleranz stellt die spezifische Suppression von zellulären und humoralen Immunantworten auf ein Antigen dar, das zuvor dem Organismus oral zugeführt wurde. Diese antigenspezifische Toleranzreaktion wird durch verschiedene Mechanismen der Immuntoleranz bewirkt³⁹. Durch niedrig dosierte Antigene wird eine Suppression induziert, während hohe Dosen desselben Antigens eine Anergie oder Deletion hervorrufen^{40,41}.

Das Modell der oralen Toleranz ist nicht nur das älteste, sondern auch das am besten erforschte. Nach oraler Applikation eines Antigens können Autoimmunkrankheiten

supprimiert werden. Die Entwicklung einer rheumatoide Arthritis wird z.B. durch Gabe von Typ II Collagen⁴² und einer Diabetes Mellitus durch die Gabe von Insulin⁴³ inhibiert. Vor allem im Mausmodell wurde die orale Toleranz anhand der Gabe von Ovalbumin, einem Eiweißprotein, untersucht. Bei der Deletion und Anergie, ausgelöst nach Gabe von hohen Dosen eines Antigens, gelangt das Antigen in den Darm und ruft eine systemischen Toleranz hervor, die durch APZs vermittelt wird und zur Apoptose antigenspezifischer T-Zellen führt^{44,45}.

Anders bei der aktiven Suppression durch Tregs. Hier wird das Antigen durch Darm-spezifische APZs den Tregs präsentiert und löst eine Sezernierung von TGF- β , IL-10 und IL-4 aus. IL-4 und IL-10 verstärken diese Toleranzinduktion, indem sie sowohl die Generierung von Effektor-T-Zellen in dem Lymphknotengewebe verhindern als auch die Funktion der Effektor-T-Zellen in den Organen supprimieren^{46,47}. TGF- β wird vermehrt in CD4⁺ and CD8⁺ T-Zellen aus den Peyerschen-Plaques (Lymphfollikel) und mesenterialen Lymphknoten von oral tolerisierten Mäusen produziert^{42,48,49}. Durch die TGF- β Sezernierung sind diese Zellen als Th3-Zellen charakterisiert, deren Effekt durch Interaktion mit IL-10 sezernierenden Tr1-Zellen verstärkt wird. IL-10 erhöht die Produktion von TGF- β , welches wiederum die suppressiven Eigenschaften von nTregs erhöht^{48,49}.

Im Gegensatz zu der oralen Toleranz gegenüber Proteinen sind die Peyerschen-Plaques in der oralen Toleranz durch Gabe eines Haptens nicht notwendig⁵⁰. Die orale Gabe von Haptenen, z.B. Kontaktallergenen, kann ebenfalls zu einer oralen Toleranz führen⁵⁰. Anhand von hohen Mengen DNFB^{51,52} und TNCB⁵³ ist gezeigt worden, dass nach oraler Gabe der Allergene eine abgeschwächte CHS hervorgerufen wird. Nach oraler Gabe hoher DNFB-Mengen wird die Entwicklung von IL-10 produzierenden CD4⁺ T-Zellen induziert, die notwendig sind für die Induktions-Phase, aber nicht für die Effektor-Phase der Toleranz^{54,55}. Auch in diesem Modell ist gezeigt worden, dass der Einfluss von CD4⁺CD25⁺ Tregs auf die Induktion der oralen Toleranz IL-10 unabhängig ist⁵⁶.

Auch die orale Toleranz die durch geringe Mengen eines Haptens ausgelöst wird, ist bereits untersucht worden. Nach oraler Gabe einer subimmunogenen Dose TNCB sind in der Maus durch IL-10 produzierende CD4⁺ T-Zellen CD8⁺ Suppressor-T-Zellen gebildet worden, die eine Toleranz hervorrufen, die sogenannte Niedrigzonentoleranz (NZT)⁵⁷.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Unterschiede in den Mechanismen der oralen Toleranz existieren, die sich aus der Art des Antigen (Protein oder Hapten), dem

Entstehungsort der Toleranzinduktion (Darm oder Mundschleimhaut) und verabreichter Dosis (hoch oder niedrig) ergeben.

1.3.4 Toleranz durch Ultraviolett-Bestrahlung

Es ist bekannt, dass UVB-Bestrahlung sowohl UV-induzierte Mutationen und Hauttumore als auch Modulationen der Immunantworten hervorrufen kann^{58,59}. Im Modell der CHS wird nach Applikation von niedrigen⁶⁰ als auch hohen UVB-Bestrahlungsdosen⁶¹ keine CHS, sondern eine lokale oder systemische Hapten-spezifische Toleranz induziert. Dies ist womöglich auf die eingeschränkte Funktion der Langerhans Zellen nach der Bestrahlung zurückzuführen⁶². Weiterhin sind CD8⁺ Suppressor-T-Zellen identifiziert worden, die durch Sezernierung von Zytokinen (IL-10 und Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α)) eine Toleranz vermitteln^{63,64}.

Eine lokale Immunsuppression entsteht durch UVB-Bestrahlung mit niedrigen Dosen, bei der Langerhans Zellen funktionsunfähig werden⁶⁵. Durch diese APZs kann das Antigen nicht aufgenommen und prozessiert werden und es entsteht eine lokale Immuntoleranz^{66,67}. Es konnte gezeigt werden, dass während dieser Toleranzreaktion Tr1-ähnliche Tregs generiert werden, die durch ihre IL-10-Produktion die Funktion dendritischer Zellen reguliert⁶⁸.

Eine systemische Immunsuppression wird durch eine UVB-Bestrahlung mit hoher Energie ausgelöst. Auch hierbei werden Langerhans Zellen in ihrer Funktion als APZs inhibiert. Da aber diese Langerhans Zellen nur lokal beeinträchtigt werden, erklärt dieses Phänomen nicht die systemische Immuntoleranz^{70,71}. Weiter Analysen haben aber gezeigt, dass die hohe Dosis der UVB-Bestrahlung Keratinozyten stimuliert, welche durch die Produktion immunsuppressive Zytokine, wie IL-10, das Immunsystem inhibieren⁷¹⁻⁷³. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IL-10 produzierende CTLA-4⁺ Tregs dendritische Zellen in Apoptose versetzen und eine systemische Toleranz hervor rufen⁷⁴. In einem CHS-Mausmodell, bei dem durch adoptiven-Transfer DNFB-aktivierte und anschließend *in-vitro* UV-bestrahlte Milz- und Lymphknotenzellen in naive Mäuse injiziert werden, konnte zeigen, dass keine CHS hervorgerufen, sondern eine systemische Toleranz induziert wird. Diese Toleranz kann durch die Depletion von CD11c⁺ dendritischen Zellen in den Empfänger-Mäusen, sowie durch die Depletion der CD4⁺ oder CD25⁺ T-Zellen in den Spender-Mäusen aufgehoben werden⁷⁵.

1.3.5 Niedrigzonentoleranz

In der Umwelt ist der tagtägliche Kontakt mit kleinen Mengen potenzieller Allergene unvermeidlich. Doch nur ein Bruchteil der Menschen entwickelt eine Allergie gegenüber

diesen Allergenen. Steinbrink et al. konnten zeigen, dass nach epikutaner Applikation von sehr geringen Mengen des Haptens TNCB und Oxazolon eine Toleranz gegenüber einem Kontaktallergen hervorgerufen werden kann: die sogenannte Niedrigzonentoleranz (NZT) ⁷⁶. Bei dem Mausmodell der NZT gegenüber Kontaktallergenen wird durch die epikutane Exposition mit subimmunogenen Dosen des Kontaktallergens die Entstehung einer CHS unterdrückt ⁷⁷. Dieses immunologische Phänomen könnte der Grund für die Toleranz vieler Menschen gegenüber Allergenen in unserer Umwelt sein.

Bis dato ist noch nicht viel über den Mechanismus der NZT bekannt, aber es wird angenommen, dass in einer NZT die subimmunogenen Dosen eines Kontaktallergens über die Haut aufgenommen und in die lymphatischen Organe abgeschwemmt werden. Die APZs, die für die Induktions-Phase der NZT essentiell sind, sind noch nicht charakterisiert worden. Es wurde jedoch gezeigt, dass weder epidermale Langerhans Zellen, dermale dendritischen Zellen noch B-Zellen beteiligt sind ^{22,78}. Nach Transport des Allergens in die Lymphknoten wird durch IL-10, das von CD4⁺ T-Zellen produziert wurde, die Generierung CD8⁺ Effektor-T-Zellen induziert. Diese sind in der Lage Tc-2 spezifische (IL-4) und immunregulierende (IL-10, TGF- β) Zytokine freizusetzen. Diese Hapten-spezifischen CD8⁺ Suppressor-T-Zellen unterdrücken die Entwicklung einer allergischen Kontaktdermatitis ⁷⁸. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch diese CD8⁺ Suppressor-T-Zellen mittels adoptiven Transport die NZT in naive Mäuse übertragen werden kann ^{22,57,77,79}.

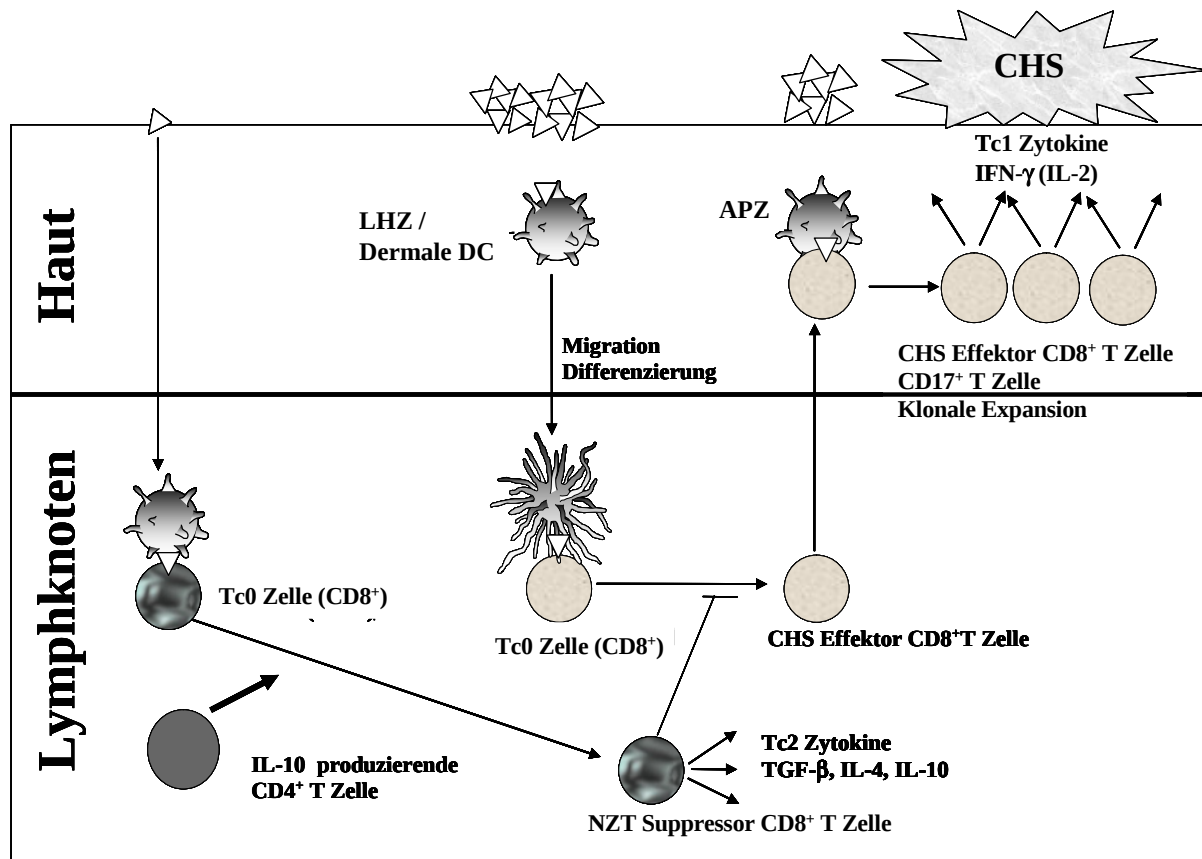


Abbildung 3: Kontakthypersensibilisierung versus Niedrigzonentoleranz

Schematische Darstellung, wie die CD8⁺ Suppressor-Zellen der NZT die Entstehung von Tc-1Effektorzellen der CHS unterdrücken können.

Nicht nur durch epikutane Applikation der Haptene kann eine NZT hervorgerufen werden, sondern auch durch die orale oder intravenöse (i.v.) Gabe von subimmunogenen Dosen eines Haptens⁵⁷. Die induzierte NZT unterdrückt die anschließende Sensibilisierung. Die NZT stellt somit einen generellen Immunmechanismus nach Exposition mit niedrigen, subimmunogenen Mengen von Haptenen dar⁵⁷.

1.4 Regulatorische T-Zellen

In der zentralen und peripheren Toleranz muss der Körper zur Bekämpfung von Pathogenen und Aufrechterhaltung des Organismus in der Lage sein, zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Autoreaktive T-Zellen, die den zentralen Toleranzmechanismen entkommen sind, und T-Zellen, die in der Peripherie nach einer Immunreaktion aktiviert worden sind, müssen weiterhin durch periphere Toleranzmechanismen kontrolliert werden. Diese Kontrollmechanismen zur Supprimierung der Immunaktivierung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz unterliegen unter anderem den Tregs⁸⁰.

Phänotypisch und funktionell können Tregs in verschiedene Populationen unterteilt werden. Zu den am besten untersuchten Gruppen gehören: nTregs ($CD4^+CD25^+$ Tregs), iTregs (induzierte Tregs: z.B. Tc-1, Th3-Zellen) und $CD8^+$ Tregs. Die $CD4^+$ Tregs (nTregs und iTregs) können anhand ihres Entstehungsortes und suppressiven Eigenschaften in zwei spezielle Populationen unterteilt werden. Zum einem die natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+$ Tregs (nTregs), die im Thymus differenzieren und zum anderen die iTregs, die in der Peripherie aus konventionellen $CD4^+$ T-Zellen entstehen.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass nTregs die Entwicklung und Aktivierung von auto-reaktiven Zellen unterdrücken^{73,81,82}. Weiterhin wird nTregs eine Schlüsselrolle in Entzündungsreaktionen, Infektionen, Allergien, Tumorummunität und Transplantationsreaktionen zugesprochen⁸³⁻⁸⁶.

Es existieren unterschiedliche $CD8^+$ Tregs-Populationen. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Funktion $CD8^+$ Tregs Zell/Zell-Kontakt-abhängig, aber Zytokin-unabhängig ist, und dass diese aktivierte T-Zellen supprimieren³⁷. Da jedoch nur $CD4^+$ Tregs, insbesondere nTregs, Fokus dieser Arbeit waren, sollen im Folgenden diese Zellen eingehender beschrieben werden.

Viele Arbeitsgruppen haben begonnen, die Bedeutung von Tregs in Typ I Allergien zu untersuchen. Nachdem in Allergikern und Nicht-Allergikern sowohl Tregs als auch Th-1 und Th-2 Zellen vorhanden sind, wurde postuliert, dass ein Ungleichgewicht zwischen Tregs und Th-2 Effektor-Zellen eine Allergie auslöst⁸⁷⁻⁹¹. Auch wurde gezeigt, dass in FOXP3 (Forkhead/winged-helix Protein)-defizienten Mäusen vermehrt Autoimmunkrankheiten und Allergien auftreten⁹². Dasselbe ist auch bei Menschen, die eine Mutation in dem *Foxp3* Gen besitzen (IPEX Syndrom), zu vermerken⁹³. In einem IgE-Mausmodell ist beschrieben, dass Tregs wichtig in der Kontrolle der Th-2/IgE Antwort gegen eine Allergie sind, aber eine schon vorhandene Allergie nicht mehr beeinflussen können^{85,94}.

Auch wurde die Bedeutung von nTregs in der Typ IV Allergie bereits untersucht. Im Mausmodell der CHS konnte gezeigt werden, dass nTregs *in-vivo* durch Vermittlung einer Hapten-spezifischen Toleranz, u.a. durch die Produktion von IL-10, zur Kontrolle der Effektor-T-Zellen der CHS und damit der allergischen Hautreaktion beitragen⁹⁵. Gestützt wird dies ebenfalls durch Daten im Humansystem, die die Rolle von nTregs bei gesunden Probanden und Patienten zur Verhinderung bzw. Kontrolle der allergischen Kontaktdermatitis beschreiben. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+$ T-Zellen für die Induktion oraler Toleranz gegenüber Haptenen notwendig sind⁹⁶. Auch in Menschen, die nicht

an einer Nickel-Allergie leiden, sind im Blut vermehrt IL-10 produzierende Nickel-spezifische T-Zellen vorhanden, die die Immuntoleranz gegenüber Metallen als auslösende Haptene reguliert⁹⁷.

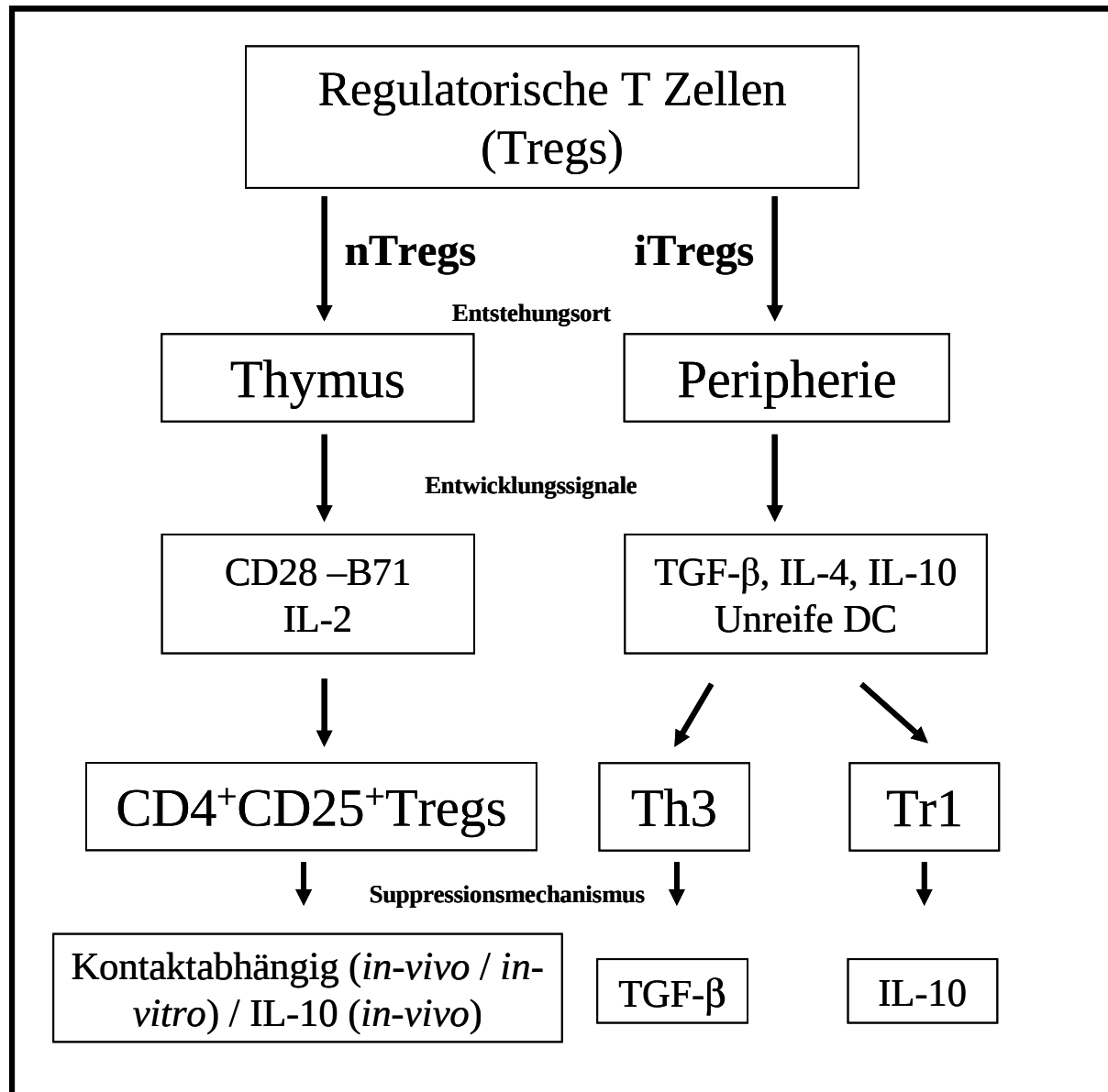


Abbildung 4: Subpopulationen regulatorischer T-Zellen

Schematische Darstellung der Entstehung und Suppressionseigenschaften von Tregs-Subpopulationen: nTregs und iTregs.

1.4.1 Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen

Die im Thymus entstehenden nTregs wurden erstmals 1969 mit supprimierenden Eigenschaften nach einer Thymektomie (Entfernung des Thymus) beschrieben⁹⁸ und später ihre Existenz durch weitere Versuche bestätigt⁹⁹⁻¹⁰¹. Kurz darauf wurde eine Subpopulation

von T-Zellen identifiziert, die die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und APZs hemmt^{102,103}. Im Jahr 1995 wurde weiterhin gezeigt, dass diese Subpopulation aus CD4⁺ T-Zellen besteht, welche die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche exprimieren: CD4⁺CD25⁺ T-Zellen¹⁰⁴.

In der Peripherie sind nur etwa 5-10 % CD4⁺CD25⁺ Tregs vorhanden, die nach Stimulation die Zytokinproduktion und Proliferation von konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in einer kontaktabhängigen Weise unterdrücken^{105,106}. Adoptive Transferversuche dieser nTregs in nTregs-defiziente Mäuse (Scurfy-Mäuse) können die Entwicklung einer Autoimmunkrankheit und Tod der Maus verhindern¹⁰⁷. *In-vitro* ist gezeigt worden, dass nTregs nach einem T-Zell-Rezeptor Stimulus weder IL-2 produzieren noch selber proliferieren, aber dafür antigenunspezifisch und Zell/Zell Kontakt-abhängig konventionelle CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen supprimieren¹⁰⁸. nTregs selbst sind durch eine deutlich eingeschränkte Proliferation und Zytokinproduktion charakterisiert⁹⁹. IL-2-defiziente Mäusen (Knock-out Mäuse oder IL-2 Neutralisierung durch Antikörper) entwickeln eine schwere Autoimmunkrankheiten, die nach Gabe von nTregs aufgehoben werden kann¹⁰⁹⁻¹¹¹. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor aktivierter konventioneller CD4⁺ T-Zellen und durch die Hemmung dieser IL-2-Produktion, supprimieren nTregs unter anderem aktivierte T-Zellen. Die IL-2-Produktion konventioneller CD4⁺ T-Zellen kann durch die Induktion von, z.B. CD86 und CD134, auf dendritischen Zellen, die Suppression der nTregs wieder aufheben¹¹²⁻¹¹⁷. Anhand dieser Ergebnisse kann IL-2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der nTregs zugesprochen werden.

Zu weiteren Charakterisierung der nTregs konnte im Maussystem der Transkriptionsfaktor FOXP3 identifiziert werden¹¹⁸. Im Menschen ist dagegen FOXP3 kein ausschließlicher Marker der nTregs, sondern kann auch in aktivierten T-Zellen exprimiert werden¹¹⁹. Im murinen Immunsystem spielt FOXP3 bei der Entstehung und Funktion von Tregs eine wichtige Rolle. Scurfy Mäuse (Mutation im *Foxp3* Gen), entwickeln aufgrund sehr stark proliferierender CD4⁺ T-Zellen, einer starken Infiltration von CD4⁺CD8⁻ T-Zellen in mehreren Organen und einer erhöhten Zytokin-Produktion, schwere Autoimmunkrankheiten¹²⁰.

1.4.2 Induzierbare regulatorische T-Zellen

iTregs entwickeln sich aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Ihre suppressiven Eigenschaften entstehen erst in der Peripherie durch antigenspezifische Stimulation⁵⁴, wie z.B. durch tolerogene dendritische Zellen^{121,122}. Hierzu gehören unter anderem die Tr1- Zellen und die

Th3- Zellen, welche durch lösliche Faktoren hemmend wirken. Die Wirkung der Tr1-Zellen ist IL-10-abhängig und sie entstehen in Gegenwart von IL-10 nach Aktivierung ruhender CD4⁺ T-Zellen¹²³. Tr1-Zellen hemmen Immunreaktionen unter anderem gegenüber Tumorzellen, Alloantigenen oder Pathogenen¹²⁴. Th3-Zellen¹²⁴, entstehen aus konventionellen T-Zellen in Gegenwart von TGF-β, IL-4, IL-10 und in Abwesenheit von IL-12. Die Suppressor-Eigenschaften werden über TGF-β vermittelt¹²⁵. Während bei der regulatorischen Funktion von Tr1 und Th3 iTregs IL-10 und TGF-β eine wichtige Rolle spielen, sind andere anerge iTregs IL-10- und TGF-β-unabhängig. Anerge iTregs können von IL-10-modulierte tolerogene dendritische Zellen induziert werden^{76,126-129}. Auch wurde gezeigt, dass nach intranasaler, intradermaler und oraler Gabe eines Antigens iTregs induziert werden^{99,130}.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle und Funktion von CD4⁺ Tregs im Mausmodell der NZT zu charakterisieren. Es wurden CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nTregs während verschiedener Phasen der NZT identifiziert und charakterisiert. Außerdem wurde die Wirkung der Tregs während der Induktions-Phase der NZT durch verschiedene Depletionsmodelle untersucht und ihre Aufgabe im Rahmen der Generierung der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT analysiert. Im Weiteren wurden die regulatorische Wirkung der Tregs im Hinblick auf ihre Haptenspezifität sowie Übertragbarkeit getestet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Plastikware

2.1.1.1 Geräte

β-Szintillationscounter:	LKB, Bromma, Schweden
Analysenfeinwagen:	MC 1 Laboratory LC2200 P, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland MC1 Analytic A C210S, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav:	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank:	Typ HERAcell, Kendro, Hanau, Deutschland
Coldlab:	LKB Bromma, 2023 Minicoldlab
Durchflusszytometer:	FACScalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland LSR-2, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software	CellQuest3.3, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Diva6.0, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ELISA Microplate Reader:	Model 450, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Entwicklungsmaschine:	Curix 60, Agfa, Köln, Deutschland
Lichtmikroskope:	IMT2, Olympus, Hamburg, Deutschland DIAPLAN, Leitz, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer:	MR2002, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Deutschland
Sterilbank:	HERAsafe, Heraeus, Kendro, Hanau, Deutschland
Wasserbad:	TW12, Julabo, Seelbach, Deutschland
Zählkammer:	Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugen:	Multifuge 3S-R, Heraeus, Hanau, Deutschland Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland Minifuge RF, Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrometerschraube	Öditest, Kroeplin GmbH&Co.KG, Schlüchtern, Deutschland

2.1.1.2 Plastikware

Die folgenden Plastikwaren werden steril bezogen:

96-Well-Mikrotitterplatte, NUNC, Wiesbaden, Deutschland
 96-Well-Zellkulturplatte, BD Falcon, Schwerte, Deutschland
 Einmal-Feindosierungsspritze, 1ml BRAUN, Melsungen, Deutschland
 Kanülen steril, BD MicrolanceTM3, Heidelberg, Deutschland
 Kanülen steril, Sterican[®], 21 G x 1 ½“, Gr.2, Braun, Melsungen, Deutschland
 MACS-Säulen, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
 Pipettenspitzen 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
 Printed Filtermat A 102 x 258 mm, Wallac, Turau, Finnland
 Probeneinschweißfolie/Sample Bag 102 x 258 mm, Wallac, Turau, Finnland
 Reaktionsgefäße 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 Zellsieb 70 µm, BD Falcon, Schwerte, Deutschland
 Zentrifugen-Röhrchen 15 ml/50 ml, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Antikörper

2.1.2.1 Chemikalien/ Enzyme

³ H-Thymidin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Aqua dest.	Apotheke des Klinikums der Universitätsmedizin Mainz
BSA	Bovine Serum Albumin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cyclophosphamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DNBS	Sodium 2,4-dinitrobenzenesulfonate, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DNFB	1Fluoro-2,4-dinitrobenzene, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%	Brüggemann Alcohol, Heilbronn, Deutschland
FCS	Foetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich (zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt)
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
HBSS	Cambrex, Verviers, Belgien
Maus IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland

Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaN ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Olivenöl	Apotheke Des Klinikums der Universität-Mainz
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TNBS	Picrylsulfonsäure, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TNCB	2,4,6-Trinitro-1-Chlorbenzol, VeZerf Laborsynthesen GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2.2 Antikörper

IgG-Rat	Jackson Immuno Research Laboratories, INC, Newmarket Suffolk, UK
Klon PC61	anti-Ratte-CD25, AG Schild, Institut für Immunologie, Mainz, Deutschland
Fc-Block	Ratte-anti-Maus-CD16/CD32 BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
IgG2a-APZ	Ratte-anti-Maus-IgG2a NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland
IgG2a-FITC	Ratte-anti-Maus-IgG2a κ BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
IgG2a-PE	Ratte-anti-Maus-IgG2a κ BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
IgG1-PE	Ratte-anti-Maus-IgG1 κ BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD4-FITC	Ratte-anti-Maus-CD4 (L3T4) BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD8a-FITC	Ratte-anti-Maus-CD8a (Ly-2)

	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD90.2-FITC	Ratte-anti-Maus-CD90.2 (Thy-1.2)
	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD8a-PE	Ratte-anti-Maus-CD8a (Ly-2)
	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD25-PE	Ratte-anti-Maus-CD25 (IL-2 Receptor α chain, p55)
	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD38-PE	Ratte-anti-Maus- CD38
	eBioscience, San Diego, USA
CD103-PE	Armenien Hamster-anti-Maus CD103 (Integrin α_{IEL} chain)
	eBioscience, San Diego, USA
CD62L-PE	Ratte-anti-Maus CD62L (L-selectin, LECAM-1, Ly-22)
	eBioscience, San Diego, USA
ICOS-PE	Ratte-anti-Maus ICOS (CD278)
	eBioscience, San Diego, USA
GITR-PE	Ratte-anti-Maus GITR (TNFRSF18)
	eBioscience, San Diego, USA
CD154-E	Armenien Hamster-anti-Maus CD154 (CD40 Ligand, gp39)
	eBioscience, San Diego, USA
CD127-PE	Ratte-anti-Maus CD127 (IL-7 Receptor α , IL-7R α)
	eBioscience, San Diego, USA
CTLA-4-PE	Armenian Hamster-anti-Maus CD152 (CTLA-4)
	eBioscience, San Diego, USA
TNFR2-PE	Armenian Hamster-anti-Maus TNF Receptor, Type II/p75
	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD25-PE-Cy5.5	Ratte-anti-Maus-CD25 (IL-2 Receptor α chain, p55)
	BIOREACTIVES AG, Schweiz
FOXP3-PC (KIT)	APZ anti-mause/rat Foxp3 Staining Set
	(Ratte-anti-Maus-Foxp3
	Fixation/Permeabilization Concentrate

Permeabilization Buffer)
eBioscience, San Diego, USA

2.1.2.3 Isolation Kits for Adoptive Transfers

CD8a (Ly-2) MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cells	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.3 Materialien für Zellkultur

2.1.3.1 Zellkulturmedium

Komplettes RPMI-Medium wird immer frisch angesetzt und bei 4°C gelagert:

RPMI 1640, Cambrex, Verviers, Belgien	500 ml
Hepes, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	1 % (v/v)
nicht-essentielle Aminosäuren, Cambrex, Verviers, Belgien	1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin, Cambrex, Verviers, Belgien	1 % (v/v)
L-Glutamin, Cambrex, Verviers, Belgien	1 % (v/v)
β-Mercaptoethanol, Sigma, Taufkirchen, Deutschland	50 mM

2.1.3.2 Puffer und andere Reagenzien

10x PBS:	402 g NaCl und 69 g NaH ₂ PO ₄ *1 H ₂ O mittels H ₂ O _{dest} auf 5 L aufgefüllt pH = 6,6
1x PBS:	hergestellt aus 10 x PBS pH = 7,2
Erylyse-Puffer:	Ack Lysing Buffer, Cambrex, Belgien
LK-DC-Medium:	1x PBS + 5 mM EDTA + 2 % FCS
FACS-Puffer:	1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% BSA
MACS-Puffer:	1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% FCS
TNBS-Lösung:	10 mM TNBS in HBSS, pH = 7,2
Trypanblau-Lösung:	0,04 % Trypanblau in 1x PBS

2.1.4 Materialien für ELISA-Untersuchung

2.1.4.1 Kits

Mouse IL-2	OptEIATMSet, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mouse IL-4	OptEIATMSet, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mouse IL-10	OptEIATMSet, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Mouse IFN- γ Set R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.1.4.2 Puffer und andere Reagenzien

Abstopplösung:	2 N H ₂ SO ₄
Assay-Diluent (IL-2/4/10 ELISA):	10 % FCS in 1x PBS, pH-Wert 7,0
Assay-Diluent (IFN- γ -ELISA):	0,1 % BSA 0,05 % Tween-20 in TBS, pH-Wert 7,2 - 7,4
Block-Puffer (IFN- γ):	1 % BSA 5 % Saccharose in 1x PBS, pH-Wert 9,5
Carbonatpuffer (IL-2/4):	0,1 M Carbonatpuffer (8,4 g NaHCO ₃ und 3,56 g Na ₂ CO ₃) in 1L H ₂ O bidest, pH 9,5
Coating Medium (IFN- γ):	1x PBS
Farbsubstratlösung:	TMB Substrate Reagent Set, BD Pharmingen TM , Deutschland, das Substrat A (Tetramethybenzidin) mit dem Substrat B (H ₂ O ₂) im Verhältnis 1:1 mischen.
Phosphatpuffer (IL-10):	0,2 M Natriumphosphatpuffer (11,8 g Na ₂ HPO ₄ 16,1 g NaH ₂ PO ₄) 1L H ₂ O bidest, pH 6,5
Wasch-Puffer:	0,05 % Tween-20 in 1x PBS

2.1.5 Versuchstiere

Es werden weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 (Jackson Laboratory, Sulzfeld, Deutschland) im Alter zwischen 6 Wochen und 12 Wochen verwendet, die im Tierstall der Uniklinik Mainz gezüchtet und gehalten werden. Die Mäuse erhalten Futter und Wasser ad libidum. Eine Genehmigung der Aufsichtsbehörde lag für alle Tierversuche vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsdurchführung

2.2.1.1 Standard NZT/CHS Protokoll

Dieses ist in 3 Phasen gegliedert:

1. Tolerisierung:

Während dieser Phase werden die Mäuse auf dem Bauch und Rücken für eine epikutane Applikation rasiert. Einer Gruppe wird reines Lösungsmittel Olivenöl/Aceton (AOO 1:3) auf

die Haut appliziert. Der anderen Gruppe wird entweder 4,5 µg TNCB in 15 µl AOO oder 0.01 % DNFB in 20 µl AOO gelöst auf die Haut gegeben. Jede Gruppe besteht aus mindestens sechs Mäusen, wobei jeder Maus zehnmal an jedem zweiten Tag die jeweilige Lösung auf immer wechselnde Hautareale appliziert wird.

2. Sensibilisierung:

24 Stunden nach der letzten Tolerisierung wird allen Tieren 450 µg TNCB in 15 µl AOO oder 1 % DNFB in 20 µl AOO auf ein noch unbehandeltes Hautareal (Abdomen) gegeben.

3. Auslösung der Entzündungsreaktion:

Fünf Tage nach der Sensibilisierung wird bei allen Mäusen die Ohrdicke des rechten Ohres gemessen. Direkt anschließend wird eine Dosis von 45 µg TNCB in 15 µl AOO oder 0.1 % DNFB in 20 µl AOO auf dasselbe Ohr appliziert. 24 Stunden danach werden nochmals die Ohrdicken gemessen und danach für *in-vitro* Versuche die axillären, inguinalen und zervikalen Lymphknoten (drainierenden Lymphknoten) entnommen (siehe 2.2.4).

2.2.1.2 Protokoll zur Depletion $CD4^+CD25^+$ Tregs mittels PC61

Bei diesem Depletionsversuch werden die $CD25^+$ T-Zellen mittels des Antikörper-Klons PC61, der das Oberflächenantigen CD25 erkennt, depletiert. Dieser Versuch wird mit 4 Gruppen, bestehend aus jeweils neun Mäusen geplant. Mäusen, der Gruppen 1 und 2 werden jeweils am Tag -1 und 0, 75 µg des PC61-Antikörpers intraperitoneal (i.p.) injiziert. Gruppe 3 und 4 sind die Kontroll-Gruppen, die mit dem Kontroll-Antikörper anti-Rat-IgG i.p. behandelt werden. Am Tag 3 werden mittels Durchflusszytometrie von Lymphknoten- und Milzzellen von zwei Mäusen analysiert (siehe auch 2.2.10), um zu sehen, ob die Depletion erfolgreich ist. Danach werden die Mäuse wie im Standard NZT/CHS-Protokoll behandelt (siehe 2.2.1.1), wobei eine Sensibilisierung und das darauffolgende wiederholte Auftragen des Haptens erst nach Rückkehr der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (ermittelt durch Durchflusszytometrie zwischen Tag 18 und 25) erfolgt.

2.2.1.3 Protokoll zur Reduktion $CD4^+CD25^+$ Tregs mittels Cyclophosphamid

Mittels Gabe des Chemotherapeutikums Cyclophosphamid (CY) wird die Anzahl der nTregs reduziert und in deren Funktion aufgehoben. Dieser Versuch wird mit 4 Gruppen, bestehend aus jeweils 9 Mäusen durchgeführt. Mäusen der Gruppen 1 und 2 werden am Tag 0, 200 mg/kg CY i.p. gespritzt. Die Gruppe 3 und 4 sind die Kontroll-Gruppen, denen PBS i.p. injiziert wird. Am Tag 1 werden mittels Durchflusszytometrie Lymphknoten- und Milzzellen von zwei Mäusen untersucht (siehe auch 2.2.10), ob die Reduktion erfolgreich ist. Danach

werden die Mäuse wie im Standard NZT/CHS-Protokoll behandelt (siehe 2.2.1.1). Nachdem eine Reduzierung der nTregs nur von kurzer Dauer ist, wird die Tolerisierungsphase auf 5 Tage mit nur 5 Tolerisierungen verkürzt. Die Sensibilisierung erfolgt auch hier erst nach Rückkehr der nTregs am Tag 8 (Kontrolle durch Durchflusszytometrie).

2.2.1.4 Adoptiver Transfer

Bei den Adoptiven Transfer-Versuchen existieren jeweils zusätzlich zwei *in-vivo* Kontroll-Gruppen, die nach Standard-NZT bzw. CHS-Protokoll behandelt werden. Zusätzlich werden 50 Spender-Mäusen nach Standard-NZT-Protokoll tolerisiert. Einen Tag nach der letzten Tolerisierung werden den Mäusen die drainierenden Lymphknoten entnommen und entweder CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺CD25⁺ T-Zellen angereichert (siehe 2.2.7). Diese T-Zell-Populationen werden dann in naive Mäusen i.v. transferiert. Jede Maus erhält eine definierte Anzahl an T-Zellen (mindestens 2×10^7 CD8⁺ T-Zellen und mindestens 1×10^6 CD4⁺CD25⁺ T-Zellen).

2.2.2 Ohrschwellung

Die mittels einer Mikrometerschraube (Öditest, Kroeplin GmbH&Co.KG, Schlüchtern, Deutschland) vor und nach dem Auslösen der Entzündungsreaktion gemessenen Ohrdicken werden nach folgender Formel ausgewertet:

$\Delta \text{mm} \cdot 10^{-2} = \text{Ohrdicke 24 Stunden nach Auftragen der Entzündungsreaktion} - \text{Ohrdicke vor Auftragen der Entzündungsreaktion.}$

2.2.3 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle für die Zellkultur verwendeten Glasgeräte sowie Plastikwaren in Probeneinschweißfolie werden vor Gebrauch für 4 Stunden bei 180 °C sterilisiert. Die verwendeten Lösungen werden, soweit nicht steril bezogen, für 1 Stunde bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert bzw., wenn eine Sterilisation mit Hitze nicht möglich ist, steril filtriert.

Die Kultivierung der Zellen im komplettem RPMI-Medium mit 2 % normalem Mausserum (NMS) erfolgt in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

2.2.4 Gewinnung der Lymphknoten

Die Mäuse werden mit CO₂-Begasung getötet. Danach werden die axillären, inguinalen und zervikalen (drainierende) Lymphknoten unter der Sterilbank entnommen und in 50 ml

Greiner-Zentrifugenröhrchen, die mit ca. 20 ml komplettem RPMI-Medium gefüllt sind, auf Eis in das Labor transportiert. Pro Gruppe wird ein Greiner-Zentrifugenröhrchen verwendet.

2.2.5 Aufarbeitung der Lymphknoten

Die pro Gruppe gepoolten Lymphknoten werden in ein Zellsieb überführt und durch vorsichtiges Zerreiben mit dem Stempel einer Einmalspritze vom Gewebe getrennt. Dabei passieren die Zellen durch das Sieb in ein frisches 50 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen. Mit komplettem RPMI-Medium wird das Zellsieb gespült und die Zellen gewaschen. Die Röhrchen werden danach bei 550 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Die Erythrozyten werden durch 1 ml Erylyse-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur zerstört. Durch Auffüllen der Röhrchen mit komplettem RPMI-Medium wird die Erylyse abgestoppt und die Zellen einmal gewaschen. Danach werden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 20 ml komplettem RPMI-Medium aufgenommen.

Die Viabilität und Zellzahl wird mittels einer Trypanblau-Färbung ermittelt. Hierbei werden 10 µl Zellsuspension auf einer Mikrotiter-Platte mit 90 µl Trypanblau-Lösung vermischt und 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gefüllt. Die lebenden Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während die toten Zellen durch Aufnahme des Farbstoffes durch die poröse Membran blau gefärbt werden. Die Zellen in 16 Einzelquadranten werden anschließend unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die Zellzahl wird ermittelt, indem die Anzahl der gezählten Zellen (Z) mit dem aufgenommenen Volumen (20 ml), dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert wird:

$$Z \cdot 20 \cdot 10 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl}$$

2.2.6 Hapten-spezifische Restimulation

Ein Teil der gewonnenen Zellen wird Hapten-spezifisch restimuliert. Hierfür werden die Zellen in 10 mM TNBS-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur resuspendiert (pro 10^7 Zellen / 1 ml TNBS-Lösung). Zur Entfernung des überschüssigen Haptens werden die Zellen anschließend zweimal mit komplettem RPMI-Medium gewaschen und in 10 ml komplettem RPMI-Medium aufgenommen. Die Lebendzellen werden mittels Trypanblau-Färbung (siehe 2.2.5) mit der Formel: $Z \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl}$ ermittelt (siehe 2.2.1.1).

2.2.7 T-Zell-Anreicherung

Als Spender-Tiere werden tolerisierte Mäusen verwendet. Aus diesen werden entweder $CD8^+$ T-Zellen oder $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gewonnen. Eine definierte Anzahl der T-Zellen ($CD8^+$ TZ: $2,5 \times 10^7$ Zellen/Maus; $CD4^+CD25^+$ TZ: $1,8 \times 10^6$ Zellen/Maus) wird dann in naive Mäuse durch i.v. Injektion in die Schwanzvene transferiert. Die Empfänger-Tiere werden dann für Sensibilisierung und zum Auslösen der Entzündungsreaktion weiter nach Standard NZT/CHS-Protokoll behandelt.

2.2.7.1 $CD8^+$ T-Zell-Anreicherung

Die Lymphknoten werden wie oben beschrieben gewonnen (siehe 2.2.4) und aufgearbeitet (siehe 2.2.5). Hier werden die Zellen bereits zum Zählen in MACS-Puffer aufgenommen. 1×10^6 Zellen werden für spätere durchflusszytometrischen Analysen entnommen (1). Die restlichen Zellen werden nochmals zentrifugiert und mit 5 μ l $CD8^+$ Magnetbeads (Miltenyi) und 45 μ l MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen 15 min bei 4 °C im Coldlab auf dem Taumler inkubiert. Danach werden die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 300 g, 10 min zentrifugiert und in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die markierten Zellen werden danach auf sterile MACS-Säulen gegeben, die vorher mit 5 ml MACS-Puffer kalibriert wurden. Nach einmaligem Durchlauf werden die Säulen dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Negativ-Fraktion wird in 50 ml Röhrchen aufgefangen, gezählt und nach Abnahme von 1×10^6 Zellen für eine durchflusszytometrische Untersuchung verworfen (2). Um die Positiv-Fraktion aus den Säulen zu eluieren, werden zweimal je 5 ml MACS Puffer auf die Säule gegeben und mit dem dazugehörigen Stempel durchgedrückt. Der Durchfluss wird in einem frischen 50 ml Röhrchen aufgefangen. Diese $CD8^+$ T-Zellen werden gezählt, 1×10^6 Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung (3) entnommen und der Rest in naiven Mäuse i.v. gespritzt. Alle entnommenen Zellen für die durchflusszytometrische Kontrolle (1, 2, 3) werden zur Überprüfung der Reinheit der Zellen mit einem anti- $CD8$ -Antikörper markiert und analysiert (siehe 2.2.10).

2.2.7.2 $CD4^+CD25^+$ Tregs-Anreicherung

Die $CD4^+CD25^+$ Tregs-Anreicherung erfolgt mit Hilfe des $CD4^+CD25^+$ Regulatory Isolation Kit (Miltenyi).

Die Lymphknoten werden wie oben beschrieben gewonnen (siehe 2.2.4) und aufgearbeitet (siehe 2.2.5). Hier werden die Zellen bereits zum Zählen direkt in MACS-Puffer

aufgenommen. 6×10^6 Zellen werden für eine spätere durchflusszytometrische Analyse entnommen (1). Die restlichen Zellen werden in 10 μ l $CD4^+CD25^+$ Biotin-Antikörper-Cocktail und 40 μ l MACS-Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen und für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Hierbei werden die Nicht- $CD4^+$ T-Zellen mit CD8a, CD11b, CD45R, CD49b und Ter-119 zur Negativdepletion mit entsprechendem Antikörper beladen. Zur Markierung und Positivanreicherung der Zellen werden diese dann sowohl mit CD25-PE-Antikörpern als auch mit 20 μ l Anti-Biotin MicroBeads, 10 μ l CD25-PE und 30 μ l MACS-Puffer je 10^7 Zellen für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 300 g 10 min gewaschen, in 1 ml MACS-Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen und auf die LD-Säulen gegeben, die mit 2 ml MACS-Puffer kalibriert werden. Nach einmaligem Durchlauf werden die Säulen zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Die positive Fraktion in den LD-Säulen wird mittels Stempel ausgedrückt, gezählt und nach Entnahme von 6×10^6 Zellen für das Kontroll-Durchflusszytometrie (2) verworfen. Die in dem Durchfluss gesammelten $CD4^+$ T-Zellen werden zentrifugiert, dann je 10^7 Anfangs-Zellen in 10 μ l Anti-PE MicroBeads und 90 μ l MACS Puffer resuspendiert und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 300 g 10 min gewaschen, in 0,5 ml MACS-Puffer für 10^8 Zellen aufgenommen und auf die MS-Säulen gegeben, die zuvor mit 0,5 ml MACS-Puffer kalibriert wurden. Nach einmaligem Durchlauf werden die Säulen dreimal mit 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Negativfraktion wird gezählt und nach Entnahme von 6×10^6 Zellen für die Kontroll-Durchflusszytometrie (3) verworfen. Um die Positivfraktion, die $CD4^+CD25^+$ Tregs Zellen aus den Säulen zu eluieren, werden zweimal je 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mit dem dazugehörigen Stempel durchgedrückt. Der Durchfluss wird in einem frischen 50 ml Röhrchen aufgefangen und gezählt, 6×10^6 Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung (4) entnommen und der Rest in naiven Mäuse i.v. gespritzt. Alle entnommenen Zellen für die durchflusszytometrische Kontrolle (1, 2, 3, 4) werden zur Überprüfung der Reinheit der Zellen mit anti- $CD4$ - und anti- $CD25$ -Antikörpern markiert (siehe 2.2.10).

2.2.8 T-Zell-Proliferationsassay

2.2.8.1 Hintergrund

Radioaktiv markiertes 3H -Thymidin (Methyl 3H -Thymidin) kann zur Quantifizierung der Zellproliferation verwendet werden. Hierbei wird das radioaktiv markierte Thymidin in neu

synthetisierte DNA eingebaut. Dieses kann dann nach einer definierten Inkubationszeit mittels eines β -Szintillationscounters gemessen werden.

2.2.8.2 Ausführung

Für den T-Zell-Proliferationsassay nach Hapten-spezifischer Restimulation *in-vitro* werden 6×10^6 Zellen nicht-haptenisierte (siehe 2.2.5) und 6×10^6 Zellen Hapten-restimulierte Zellen (siehe 2.2.6) benötigt, die in 600 μ l RPMI + 2 % NMS aufgenommen werden.

In einer 96-Well-Platte wird jede Probe als Dreifachansatz pipettiert und eine 1:2 Verdünnungsreihe durchgeführt. Hierzu werden je Well ab Reihe B 100 μ l RPMI + 2 % NMS vorgelegt. In Reihe A werden je Well 2×10^6 Zellen á 200 μ l pipettiert (drei Wells je Gruppe). Aus Reihe A werden dann mit einer Mehrkanalpipette je Well 100 μ l Zellsuspension in Reihe B transferiert. Die Verdünnungsreihe wird bis Reihe G durchgeführt. Reihe H dient als Lösungsmittelkontrolle mit reinem RPMI + 2 % NMS. Danach wird jedes Well auf 200 μ l mit RPMI + 2 % NMS aufgefüllt. Nach 24 Stunden Kultivierung im Brutschrank werden die Lymphknotenzellen mit 1 μ Ci 3 H-Thymidin / Well gepulst (entspricht 1 Tropfen der Lösung: 3 H-Thymidin und RPMI). Nach 16-18 Stunden Inkubation im Brutschrank werden die Zellen geerntet. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellerntegerätes aus Glasfaserfilter auf ein Filter gespült, gewaschen und getrocknet. Anschließend werden 20 μ l Szintillationsflüssigkeit pro Well auf die Filter gegeben. Die eingebaute Radioaktivität wird mittels eines β -Szintillationscounter gemessen.

2.2.9 Zytokinanalyse mittels ELISA

2.2.9.1 Hintergrund

In einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können biologisch aktive Substanzen durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden. Um die Zytokinausschüttung der Zellkultur nachzuweisen, wird die Technik des Sandwich-ELISAs durchgeführt. Hier bindet der erste Antikörper (capture-Antikörper (CpA)) an eine spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte. Zur Verhinderung von unspezifischer Bindung werden die freien Proteinbindungsplätze durch Blockierungs-Puffer versiegelt. Der an die Platte gebundene Antikörper bindet das in der Probe vorhandene Antigen. Als nächstes bindet der Detektions-Antikörper (DA), der an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, vom englischen horseradish) gebunden ist, ebenfalls an eine andere Stelle des Antigens. Hier entsteht nun ein Antigen-Antikörper-Komplex bei dem das Antigen zwischen den beiden Antikörper in ein

„Sandwich“ gepackt ist. Durch Zugabe von einem Substrat wird mit Hilfe des HRP-Enzyms eine katalysierte Reaktion ausgelöst, die sich durch einen Farbumschlag nachweisen lässt. Zum quantitativen Nachweis der Proben muss eine Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt werden. Damit kann dann eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) errechnet werden. Diese erfolgt photometrisch mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers.

2.2.9.2 Ausführung

Für den ELISA werden maximal $2,4 \times 10^7$ Zellen nicht-haptenisierte (siehe 2.2.5) und $2,4 \times 10^7$ Zellen haptenrestimulierte Zellen (siehe 2.2.6) benötigt, die in 4,8 ml RPMI + 2 % NMS aufgenommen sind. Für die verschiedenen Zeitintervalle von 24, 48 und 72 Stunden werden je Zeitintervall 200 μ l (1×10^6 Zellen/Well) in ein Well einer 96-Well-Platten pipettiert (maximal 8 Wells je Zeitintervall) und im Inkubator kultiviert. Die Überstände werden nach dem jeweiligen Zeitintervall in 0,5 ml Reaktionsgefäße geerntet und bei -80 °C gelagert.

Mit vorgefertigten IL-2-, IL-4-, IL-10- und IFN- γ -ELISA-Kits werden die Zytokine nach modifizierten Protokollen des Herstellers gemessen. Die Proben und Standards werden als Zweifach-Werte gemessen. Die Sensitivität beim IL-2, IL-4 und IL-10-ELISA liegt bei 10 ng/ml und für den IFN- γ -ELISA bei 50 ng/ml.

In den modifizierten ELISA-Protokollen werden als erstes die 96-Well-Platten mit 100 μ l/Well mit dem CpA beschichtet. Je Platte werden entweder 50 μ l IFN- γ CpA in 10 ml PBS, 40 μ l IL-2 oder IL-4 CpA in 10 ml Carbonat-Puffer, oder 40 μ l IL-10 CpA in 10 ml Phosphat Puffer verdünnt und 100 μ l von der verdünnten Lösung pro Well pipettiert. Diese Platten werden mit einem Deckel versiegelt und in feuchter Umgebung über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließendem Abklopfen zum Trocknen wird der überschüssige Cp-A entfernt.

Die Platten werden bei IFN- γ mit 300 μ l Block Puffer und bei IL-2, IL-4, IL-10 mit 150 μ l Assay-Medium im Dunklen versiegelt und in feuchter Umgebung bei Raumtemperatur für 2 Stunden blockiert. Nach der Blockierung werden die Platten wieder dreimal gewaschen. Anschließend werden 50 μ l Probenüberstand in 50 μ l Assay-Medium oder für IFN- γ Reagenz Medium verdünnt und 100 μ l pro Well aufgetragen. Die Standards werden in einer Verdünnungsreihe 1:2 in je 100 μ l aufgetragen. Die nichtgebundenen Proben werden nach der Inkubation versiegelt und in feuchter Umgebung über Nacht bei 4 °C durch dreimaliges Waschen entfernt

Zur Detektion der Zytokinausschüttung werden nun für IL-4 und IL-10 100 µl der Verdünnungslösung von je 48 µl DA, 48 µl Enzym-Reagenz (ER) in 10 ml Assay Medium pro Well pipettiert. Bei IL-2 ist das Mischungsverhältnis 12 µl DA, 48 µl E-R in 10 ml Assay-Medium. Diese werden im Dunklen versiegelt und in feuchter Umgebung bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Bei IFN-γ werden 60 µl DA in 10 ml Reagenz Medium verwendet, für 1 ½ Stunden inkubiert und nach dreimaligem Waschen wird 60 µl ER in 10 ml Reagenz Medium dazugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach 2 Stunden werden alle Platten wieder dreimal gewaschen.

Bei allen ELISA-Systemen gibt man anschließend 100 µl/Well Farbsubstratlösung (Farbreagenzkomponenten A und B im Verhältnis 1:1) hinzu. Die Platten werden dann offen 15 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei direkte Lichtexposition vermieden werden sollte. Um die Reaktion abzustoppen, werden 50 µl Abstopplösung in jedes Well pipettiert und die Extinktion innerhalb der nächsten 30 min bei 450 nm gemessen.

2.2.10 Durchflusszytometrische Untersuchungen

2.2.10.1 Hintergrund

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die physikalischen Eigenschaften von Zellen durch ihre Emission, welche von optischen Signalen, nach dem Passieren eines Laserstrahls ausgeschüttet wird, gemessen werden. Die Zellen werden nach der relativen Zellgröße, Granularität (interne Komplexität) und relativen Fluoreszenzintensität getrennt. Wobei die Fluoreszenzintensität auf Eigenfluoreszenz der Zellen oder auf die Färbung mit fluorochrom markierten Antikörpern beruht, hier Fluorescein-Isothiocyanat (FTIC), R-Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cy5.5 (PE-Cy5.5) und/oder Allophycocyanin (APC).

Die in einer Lösung befindlichen Zellen fließen durch eine Kapillare und passieren im Messpunkt einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle streut einen Teil des Lichts, je nach Größe und Granularität, was mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Gemessen wird zum einen das Vorwärtstreulicht (FSC = Forward Scatter), also die Größe/Volumen der Zelle und zum anderen das Seitwärtstreulicht (SSC = Sidewards Scatter), also die Granularität der Zelle (Zellmembran, Zellkern, granuläres Material in der Zelle). Diese optischen Signale werden durch ein elektronisches System in digitale Signale umgewandelt, die durch eine Software, hier entweder CELL Quest 3.3 oder DIVA6.0, ausgewertet werden können.

2.2.10.2 Durchführung Standard-Durchflusszytometrische-Messung

Für durchflusszytometrische Analysen werden maximal 1×10^6 Zellen, die aus Lymphknoten gewonnen werden, benötigt (siehe 2.2.5). Die Zellen werden in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und mit Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (550 g, 4 °C, 5 min) auf die Bodenplatte gebracht wurden und der Überstand dekantiert wurde, werden 10 µl des FITC-, PE- und/oder PE-Cy5.5-markierten Antikörpers bzw. des entsprechenden Isotyp- Kontrollantikörper für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit je 100 µl FACS -Puffer gewaschen und zur Messung mit 150 µl in ein dafür vorgesehenes durchflusszytometrisches Röhrchen überführt. Gemessen und ausgewertet werden die Proben entweder im FACScalibur oder LSR2.

2.2.10.3 Durchführung Intrazelluläres Durchflusszytometrische: Messung von FOXP3⁺ T-Zellen

Es werden maximal 1×10^6 Zellen, die aus Lymphknoten gewonnen wurden, benötigt (siehe 2.2.5), wie oben beschrieben gewaschen und auf den Boden der Platte gebracht. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden die Zellen vor der Markierung mit einem Fc-Block (15 min bei 4 °C im Dunkeln) blockiert. Ohne vorheriges Waschen werden danach 10 µl des FITC- und PE-markierte Antikörper bzw. des entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit je 100 µl FACS-Puffer gewaschen und über Nacht (maximal 18 Stunden) im Dunkeln mit 100 µl Fixation/Permeabilisation Solution (1 Teil Fixation/Permeabilisation Konzentration zu 3 Teilen Fixation/Permeabilisation Diluent) inkubiert. Nachdem die Zellmembran nun den intrazellulären Farbstoff aufnehmen kann, wird nach zweimaligem waschen mit 100 µl 1x Permeabilisation Buffer 10 µl des FOXP3- oder dessen Isotyps IgG2a-Antikörpers auf die Zellen pipettiert und für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und gemessen.

2.3 Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Auswertungen erfolgen mit Hilfe des Programms StatView für Windows Version 5.0. Zur Analyse der statistischen Signifikanz wird der Student's-t-Test für paarige Stichproben verwendet. Alle Ergebnisse sind für den jeweiligen Stichprobenumfang

als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Als signifikant werden Werte mit $p = 0,05$ angesehen (* $p = 0,05$; **: $p = 0,01$; ***: $p = 0,01$).

.

3. Ergebnisse

3.1 Immunantworten in der NZT

Es ist bereits bekannt, dass die durch eine Re-Exposition nach Sensibilisierung mit demselben Allergen ausgelöste CHS (Tc1-Immunantwort) eine lokale Entzündungsreaktion mit Hautirritation und Schwellung durch T-Zell-Infiltration und Zytokinausschüttung auslöst. Wie schon in beschriebenen Modellen der CHS wird die epikutan ausgelöste Entzündungsreaktion durch $CD8^+$ Tc1-Zellen vermittelt, die im Lymphknoten durch Langerhans Zellen und dermale dendritische Zellen geprimt wurden. Die CHS ist durch eine erhöhte $IFN-\gamma$ und IL-2 Zytokinproduktion als auch eine erhöhte T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation *in-vitro* charakterisiert^{6,7,15}.

Bei der NZT dagegen wird keine sichtbare Entzündungsreaktion ausgelöst. Die NZT wird durch die Applikation von subimmunogenen Dosen vor der Sensibilisierung mit demselben Allergen ausgelöst. In unserer Arbeitsgruppe ist die Induktion einer NZT durch verschiedene Haptene (TNCB, DNFB und Oxazolone) bereits etabliert und auf T-Zell-Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation untersucht worden. In diversen Studien der Arbeitsgruppe Steinbrink ist in der NZT eine vermehrte IL-4 und IL-10, aber auch eine verminderte $IFN-\gamma$ und IL-2 Sekretion der $CD8^+$ T-Zellen gemessen worden. Weiterhin ist eine niedrigere T-Zell-Proliferation der Zellen aus toleranten Mäusen im Gegensatz zu den Zellen aus Mäusen, die eine CHS entwickeln, beobachtet worden^{22,57,77-79}.

Anhand dieser Daten werden die Immunantworten der hier verwendeten Standard-NZT- und CHS-Protokolle (Abb. 5) durch die Ohrschwellung als *in-vivo* Entzündungsparameter und die T-Zell-Aktivierung anhand der Proliferation und Zytokinproduktion ($IFN-\gamma$ und IL-2) nach Hapten-spezifischer Restimulation bestimmt. Die folgenden Beispiel-Daten beziehen sich auf das Allergen TNCB, doch auch nach Verwendung von DNFB zeigen sich dieselben Ergebnisse.

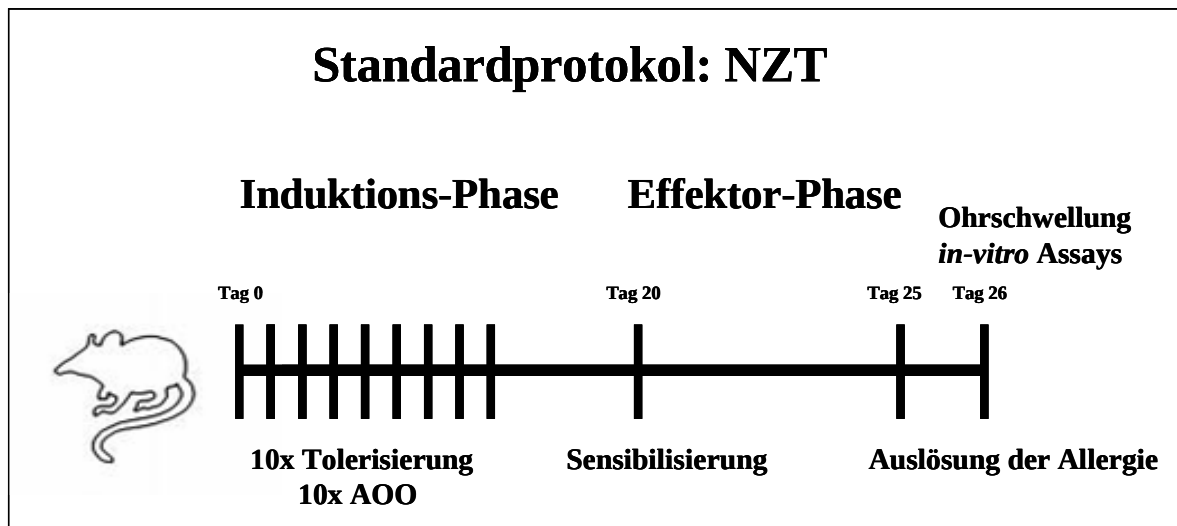


Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf: Standard-NZT-Protokoll

In dem Standard-NZT-Protokoll werden die Mäuse während der Induktions-Phase entweder zur Auslösung einer NZT zehnmal mit 4,5µg TNCB (0.01 % DNFB) oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel AOO behandelt. 24 Stunden später werden die Mäuse mit 450 µg TNCB (1 % DNFB) sensibilisiert und fünf Tage später mit 45 µg TNCB (0.1 % DNFB) eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die Ohrschwellung wird vor und 24 Stunden nach der Auslösung gemessen und anschließend werden die drainierenden Lymphknoten für weitere *in-vitro* Versuche entnommen.

3.1.1 Kutane Entzündungsreaktion

Die CHS oder allergische Konatktdermatitis äußert sich klinisch als kutane Immunreaktion. Im Mausmodell kann sie als lokale Entzündungsreaktion durch das Messen der Ohrdicke vor und 24 Stunden nach der Auslösung *in-vivo* bestimmt werden. Abb. 6 A zeigt deutlich, dass Mäuse, die vor einer Sensibilisierung nur mit dem Lösungsmittel (15 µl AOO) behandelt worden sind (■ CHS), eine hohe Ohrschwellung aufweisen. Mäuse, bei denen durch Applikation von subimmunogenen Dosen des Allergens (4,5 µg TNCB) vor Sensibilisierung eine Toleranz induziert wurde (□ NZT), zeigen dagegen eine verminderte Entzündungsreaktion in Form der Ohrschwellung (ca. 80 % Reduktion).

3.1.2 T-Zell-Proliferationstest

Ein weiterer Parameter zur Analyse der stattgefundenen Immunantwort stellt die T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Stimulation *in-vitro* dar. Aus der Literatur und unseren Daten ist bekannt, dass aktivierte CD8⁺ T-Zellen der CHS eine starke Proliferation aufweisen. Für die Untersuchung nach der Toleranzinduktion werden 24 Stunden nach dem Auslösen der CHS die gewonnenen Lymphknotenzellen Hapten-spezifisch restimuliert (TNBS oder DNBS), 24 Stunden kultiviert und anschließend mit ³H-Thymidin für weitere 18 Stunden inkubiert. Abb. 6 B zeigt, dass T-Zellen aus tolerisierten Mäusen (□ NZT) eine signifikant

verringerte Proliferation aufweisen (73 % Reduktion) als die T-Zellen aus sensibilisierten Tieren (■ CHS).

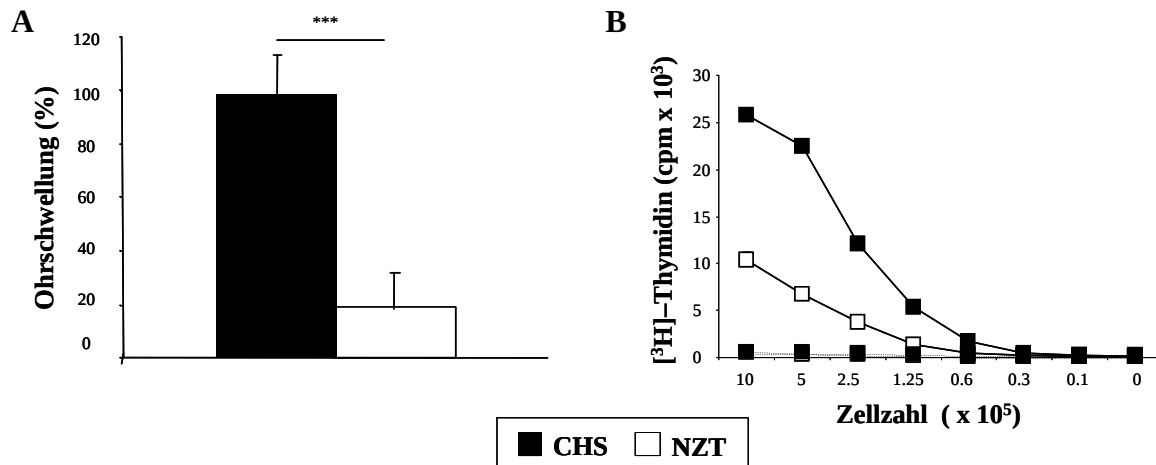


Abbildung 6: Kutane Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation: CHS versus NZT

In den Mäusen wird nach dem Standardprotokoll entweder durch wiederholte epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen TNCB (4,5 µg) eine NZT (□ NZT) oder in den Kontroll-Tieren nach Behandlung mit AOO (15 µl) eine CHS (■ CHS) induziert und ausgelöst. (A) Mittelwert der % Ohrschwellung (n=6) mit entsprechender Standardabweichung, wobei die CHS-Gruppe als 100 % gesetzt wird. (B) Messung der T-Zell-Proliferation ohne (---) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (—) und ³H-Thymidin-Einbau in Lymphknotenzellen der Haut-drainierenden Lymphknoten (***: p = 0.001).

3.1.3 Zytokinbestimmung

Ein weiterer *in-vitro* Parameter zur Untersuchung der Kontaktallergen-spezifischen Immunreaktionen ist die Zytokinproduktion der T-Zellen nach Hapten-spezifischer Restimulation aus den gewonnenen Überständen. Es ist bekannt, dass der CHS eine Tc1-Immunantwort zu Grunde liegt, welche durch eine IFN-γ-Ausschüttung und eine IL-2-Produktion, bedingt durch T-Zellaktivierung, gekennzeichnet ist. Eine NZT dagegen wird durch eine Tc2-Antwort (IL-4 und IL-10-Produktion) in der Effektor-Phase vermittelt. Auch in dem Fall der hier ausgelösten CHS und NZT zeigt der Maximalwert der Zytokinbestimmung, ermittelt aus den Überständen der Lymphknotenzellen, nach 48 Stunden (Abb. 7), dass bei einer CHS (■ CHS) fast ausschließlich IL-2 und IFN-γ produziert werden, während die IL-4 und IL-10-Sezernierung aus T-Zellen nach Induktion der NZT (□ NZT) dominiert.

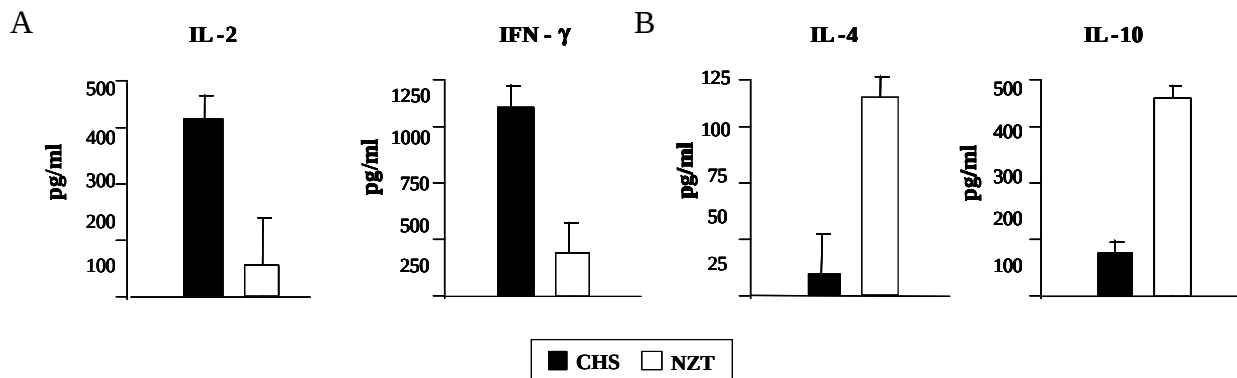


Abbildung 7: Zytokinproduktion: CHS versus NZT

In den Mäusen wird nach Standardprotokoll entweder durch wiederholte epikutane Applikation subimmunogener Dosen von TNCB eine NZT ($\square$ NZT) oder durch die Behandlung der Kontrolltiere mit AOO eine CHS ($\blacksquare$ CHS) ausgelöst. Anschließend werden die drainierenden Lymphknoten zellen pro Gruppe gepoolt (n=6). Nach Hapten-spezifischer Restimulation werden die Zellen für 48 Stunden kultiviert. Die Überstände werden gemessen und als Maximalwert angegeben (A) IL-2 und IFN- γ . (B) IL-4 und IL-10.

Die Kontaktallergene TNCB und DNFB können in der Maus eine CHS oder, verabreicht in subimmunogenen Dosen vor der Sensibilisierung, eine NZT auslösen. Die Entzündungsreaktion der CHS kann mittels erhöhter Ohrschwellung und T-Zell-Proliferation, als auch IL-2- und IFN- γ -Zytokinausschüttung gemessen werden. Die NZT dagegen zeigt eine signifikant reduzierte Immunreaktion mit verminderter lokaler Entzündungsreaktion, herabgesetzter T-Zellproliferation, IL-2- und IFN- γ -Sekretion

3.2 Keine Unterschiede in der Anzahl $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs während der NZT im Vergleich zu der CHS

$CD8^+$ Suppressor-T-Zellen werden während der Induktions-Phase der NZT gebildet und verhindern während der Effektor-Phase die Entstehung einer CHS^{57,77}. Für die Generierung dieser $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen der NZT sind IL-10 produzierende $CD4^+$ T-Zellen während der Induktions-Phase der NZT notwendig⁷⁹. Da aus der Literatur bekannt ist, dass $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs ihre Suppressor-Eigenschaften zum Teil über IL-10 vermitteln, stellte sich nun die Frage, ob es sich hierbei um nTregs handelt.

Um diese Frage zu beantworten, haben wir zunächst die Rolle und Funktion von natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorischen T-Zellen analysiert. Hierzu werden zu verschiedenen Zeitpunkten der NZT und der CHS (1 Tag nach Tolerisierung, 5 Tage nach Sensibilisierung, 24 Stunden nach Auslösen der Entzündungsreaktion) die drainierenden Lymphknoten entnommen und die Anzahl der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorischen T-Zellen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 8).

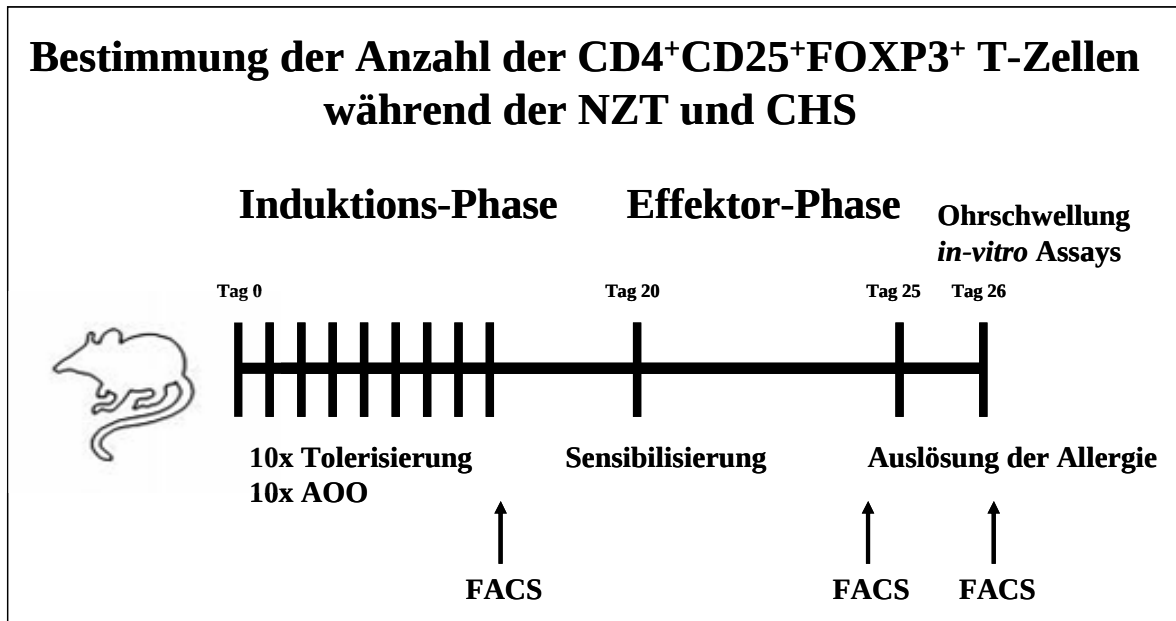


Abbildung 8: Schematischer Versuchsablauf: Bestimmung der Anzahl der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen während der NZT und CHS

In den Mäusen wird entweder eine NZT oder CHS mit TNCB induziert (siehe Abb. 5). Die drainierenden Lymphknoten werden während den verschiedenen Phasen entnommen (1 Tag nach Tolerisierung, 5 Tage nach Sensibilisierung, 24 Stunden nach Entzündungsreaktion), gepoolt und anschließend mittels Antikörpermarkierung im Durchflusszytometer untersucht.

Anhand der Doppelfärbung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wird kein Unterschied während der verschiedenen Phasen der NZT und CHS gemessen (Abb. 9 A). Um nun die nTregs mittels einer Dreifachfärbung zu untersuchen, wurden CD25⁺FOXP3⁺ Zellen gated auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen weiter in der Durchflusszytometrie (Abb. 9 B) charakterisiert. Auch hier ist weder auf die Zellzahl, bezogen auf alle Zellen, noch bezogen auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Zellzahl nicht abgebildet) nach der Induktions-Phase oder Effektor-Phase ein Unterschied in der Zellzahl der Gruppen zu erkennen.

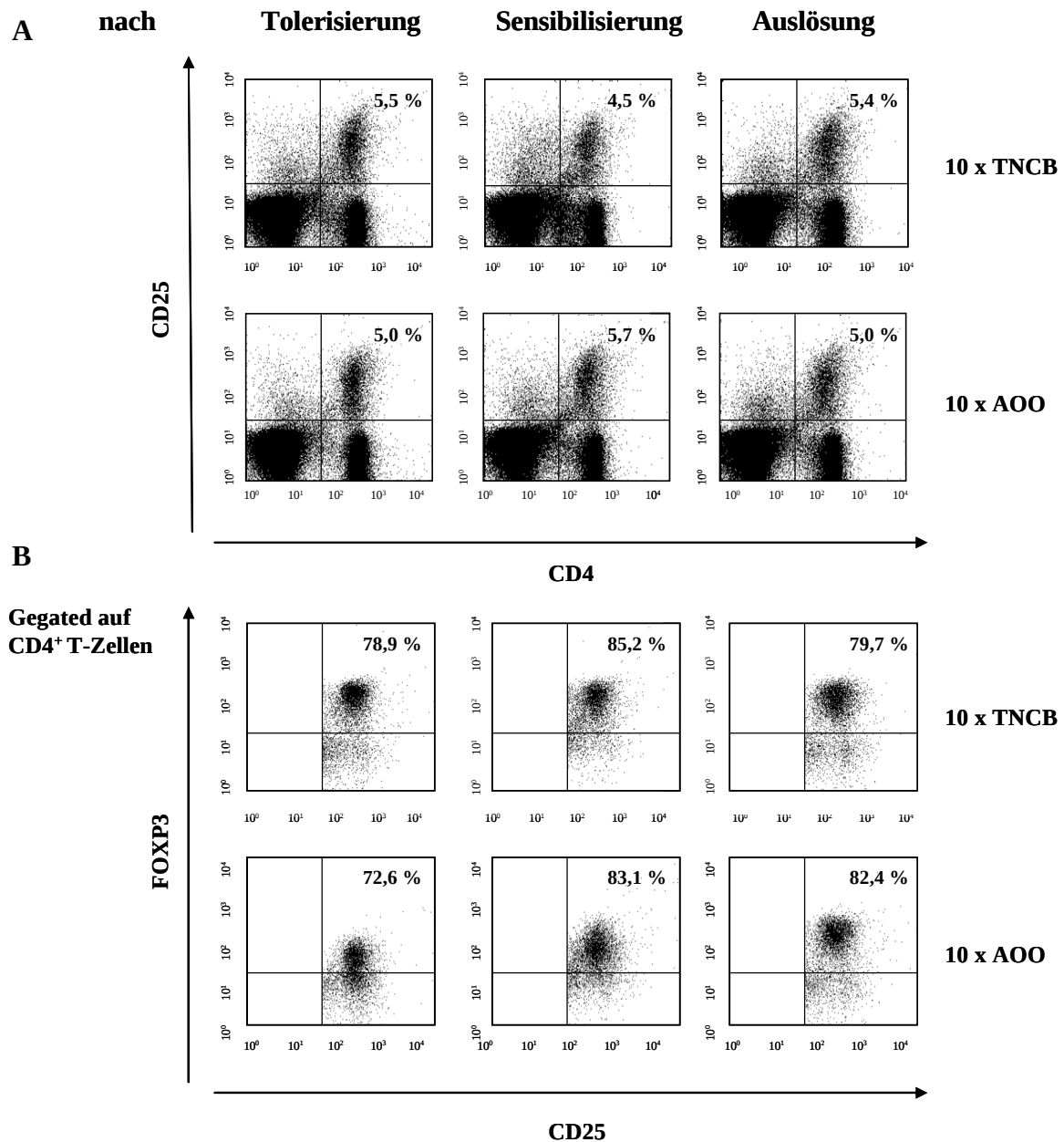


Abbildung 9: Gleiche Anzahl der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen während der NZT im Vergleich zur CHS
 Die drainierenden Lymphknoten werden nach der Tolerisierung oder AOO-Behandlung (Tag 20), Sensibilisierung (Tag 25), sowie 24 Stunden nach der ausgelösten Entzündungsreaktion gewonnen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Färbung mit anti-CD4-FITC-, anti-CD25-PE- und FOXP3-APZ-Antikörpern wurde durchgeführt. (A) Anzahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Gesamtlymphknotenzellen. (B) Anzahl der nTregs. Dargestellt sind die CD25⁺FOXP3⁺ Zellen gated auf CD4⁺ T-Zellen. Abgebildet ist einer von vier unabhängigen.

Im Allgemeinen ist kein Unterschied in der Anzahl der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen in NZT- im Vergleich zu CHS-Mäusen zu erkennen.

3.3 Depletion und funktionelle Inhibition der Tregs während der Induktions-Phase führt zur Aufhebung der NZT

Um die Notwendigkeit der nTregs während der Induktions-Phase einer NZT zu untersuchen, werden im ersten Ansatz $CD25^+$ nTregs mittels eines anti-CD25-Antikörpers depletiert (PC61). In der zweiten Versuchsreihe werden nTregs durch Gabe des Chemotherapeutikum Cyclophosphamid (CY) reduziert und in ihrer Funktion gehemmt. Die Wirksamkeit und Effektivität beider Verfahren ist bereits in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt^{131,132}.

3.3.1 Depletion $CD25^+$ T-Zellen durch Gabe des anti-CD25-Antikörpers (PC61)

Es ist bereits bekannt, dass der Antikörper PC61 nur $CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen depletiert ohne die Anzahl der $CD25^-FOXP3^+$ T-Zellen zu erhöhen¹³¹. In diesem Versuch (Abb. 10) werden die $CD25^+$ nTregs durch zweimalige Gabe des blockierenden Antikörpers PC61 vor der ersten Tolerisierung depletiert und erst nach Rückkehr dieser Zellen (Abb. 11) wird die Effektor-Phase nach Standard-Protokoll durch Sensibilisierung und Auslösen der Entzündungsreaktion ausgeführt. Als Kontrollgruppen für die NZT und CHS werden Mäuse mit einem Kontroll-IgG-Antikörper behandelt.

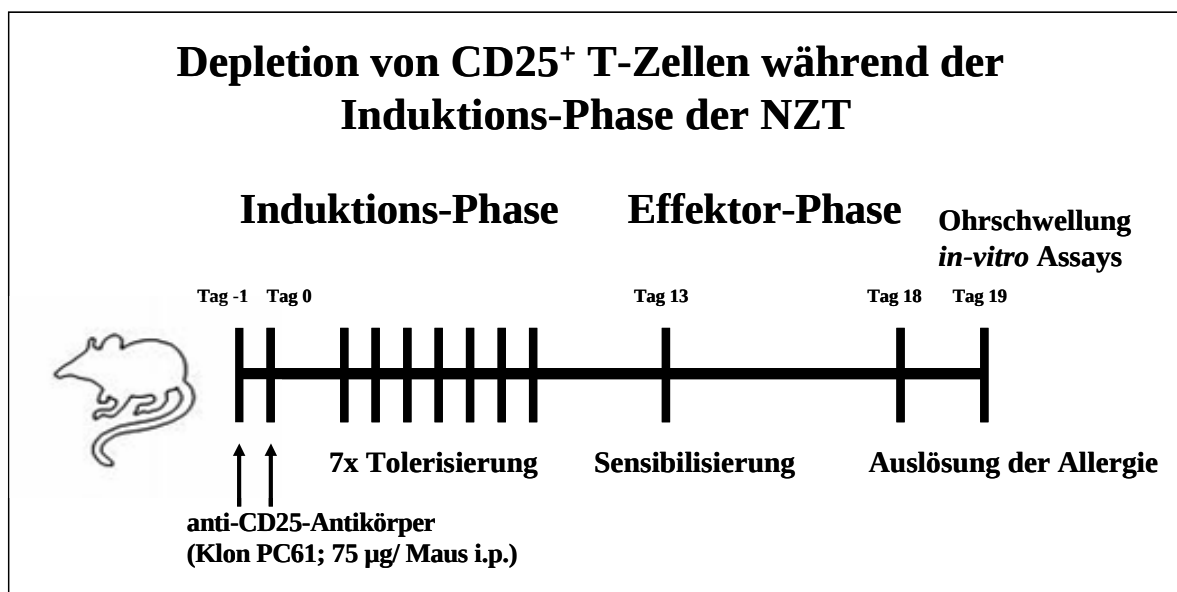


Abbildung 10: Schematischer Versuchsablauf: Depletion von $CD25^+$ T-Zellen während der Induktions-Phase der NZT

Zur Depletion $CD25^+$ T-Zellen werden die Mäuse mit einem anti-CD25-Antikörper (Klon PC61, 75 µg) zweimalig i.p. behandelt. Kontrollen wird eine entsprechende IgG-Kontrolle injiziert. Am Tag 3 wird die Reduktion mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Anschließend wird sowohl in den behandelten als auch Kontrollgruppen (n=6) eine NZT und CHS induziert. Am Tag 28 wird durch eine weitere durchflusszytometrische Untersuchung die Rückkehr der Zellen bestätigt, die Mäuse danach sensibilisiert und fünf Tage später mit dem Kontaktallergen eine Entzündung ausgelöst. Die Ohrschwellung wird vor und 24 Stunden nach dem Auslösen der Entzündungsreaktion gemessen und anschließend die drainierenden Lymphknoten für weitere *in-vitro*-Versuche entnommen.

Am dritten Tag nach der PC61-Injektion ist die Anzahl der $CD25^+$ T-Zellen von 7 % auf 1 % gesunken und am Tag 28 wieder auf 7 % gestiegen (Abb 11 A). Die Anzahl der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ist am Tag 3 von 4 % auf 0 % gefallen und steigt am Tag 28 wieder auf 4 % (Abb. 11 B). Die Anzahl der $CD25^+FOXP3^+$ nTregs, bezogen auf die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen, fällt am Tag 3 von 12 % auf 0 % und nimmt am Tag 28 auf 8 % wieder zu (Abb. 12 C). Die Induktions-Phase wird hier auf 28 Tage ausgedehnt, da in dieser Zeit keine $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs vorhanden sind und erst nach Rückkehr der Zellen (Tag 28), werden die Mäuse sensibilisiert und weitere fünf Tage später wird die Entzündungsreaktion ausgelöst.

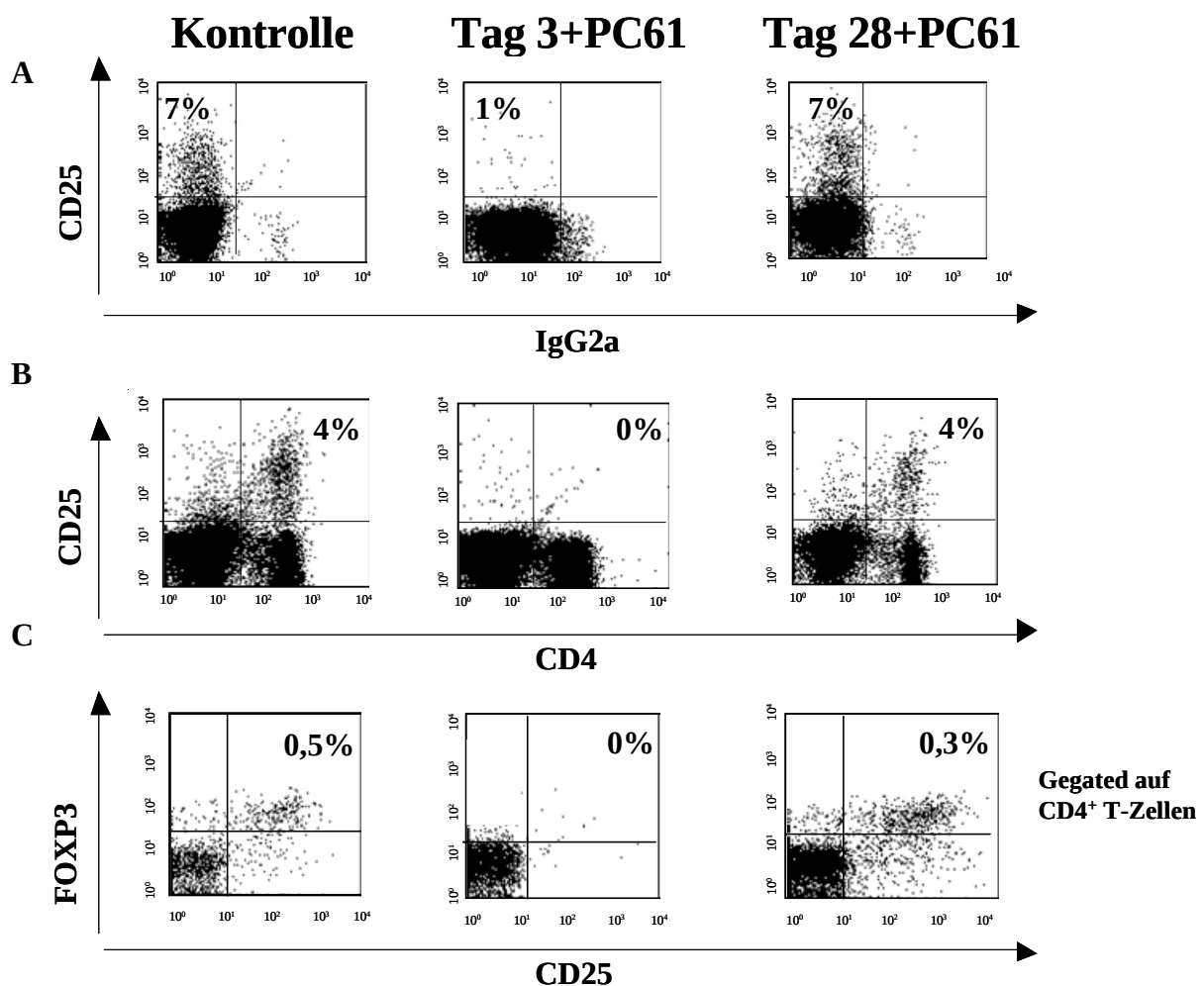


Abbildung 11: Reduktion und Rückkehr der $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ T-Zellen nach PC61-Behandlung

Die drainierenden Lymphknoten aus PC61-behandelten und IgG-injizierten Kontroll-Mäusen werden am Tag 3 und 28 entnommen und mittels Durchflusszytometrie auf die Reduktion und Rückkehr der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen untersucht. (A) Anzahl aller $CD25^+$ T-Zellen ($CD25$ -PE). (B) Anzahl der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ($CD4$ -FITC und $CD25$ -PE). (A) und (B) beziehen sich auf alle gemessenen Zellen. (C) Anzahl der nTregs ($CD4$ -FITC, $CD25$ -PE und $FOXP3$ -APC). Dargestellt sind die $CD25^+FOXP3^+$ Zellen gated auf $CD4^+$ T-Zellen. Abgebildet ist einer von vier unabhängigen Versuchen.

Die Entzündungsreaktion nach $CD25^+$ T-Zell-Depletion wird durch *in-vivo*- und *in-vitro*-Parameter gemessen (Abb. 12). Das Messen der Ohrdicke als kutane Entzündungsreaktion (Abb. 12 A) vor und nach dem Auslösen der Sensibilisierung zeigt in den Kontrollgruppen wie zu erwarten eine NZT nach Vorbehandlung mit subimmunogenen Dosen von TNCB ($\square$ NZT) und eine CHS ($\blacksquare$ CHS) mit signifikant verstärkter Entzündungsreaktion nach Sensibilisierung. Im Gegensatz dazu ist nach Depletion der $CD25^+$ T-Zellen eine deutliche Ohrschwellreaktion sowohl in den mit subimmunogenen Dosen des Kontaktallergens als auch in den sensibilisierten Tieren zu beobachten. Erstaunlicherweise zeigt sich, dass die Entzündungsreaktion der tolerisierten und mit PC61-injizierten TNCB-Gruppe mehr als doppelt so hoch ist wie die der sensibilisierten Tiere.

Diese Ergebnisse werden auch durch die *in-vitro*-Analysen bestätigt. Wie schon bekannt, zeigen die T-Zellen nach Hapten-spezifischer Stimulation aus tolerisierten Tieren eine verminderte Proliferation im Vergleich zu T-Zellen, die aus CHS-Kontroll-Tieren gewonnen werden (Abb 12 B). Hingegen zeigt sich nach Depletion der Tregs, dass keine Toleranz induziert wird, da auch die T-Zellen aus mit subimmunogenen Dosen vorbehandelten Tieren eine deutliche Proliferationsrate aufweisen. Die T-Zellen dieser Gruppe proliferieren sogar deutlich mehr als die entsprechende Kontrollgruppe der CHS.

Des Weiteren ist auch die Zytokinproduktion aus den Überständen der Lymphknotenzellen nach Restimulation *in-vitro* bestimmt worden (Abb. 12 C). In der mit dem Kontroll-Antikörper behandelten Gruppe zeigen die CHS-Mäuse eine typische Tc-1-Immunreaktion durch eine starke IFN- γ Sezernierung, aber auch eine erhöhte IL-2 Produktion, während nach der Toleranzinduktion nur geringe Mengen dieser Zytokine nachweisbar sind, also ein charakteristisches Zytokinprofil der NZT vorliegt. Als Bestätigung der bereits erwähnten Daten wird auch im Rahmen der Zytokinbestimmung deutlich, dass sich keine NZT nach Depletion der $CD25^+$ T-Zellen während der eigentlichen Induktions-Phase entwickeln kann, da auch in diesen Überständen erhöhte Mengen an IFN- γ und IL-2 gemessen werden, die mit den CHS-Kontrolltieren vergleichbar sind (Abb. 12 C).

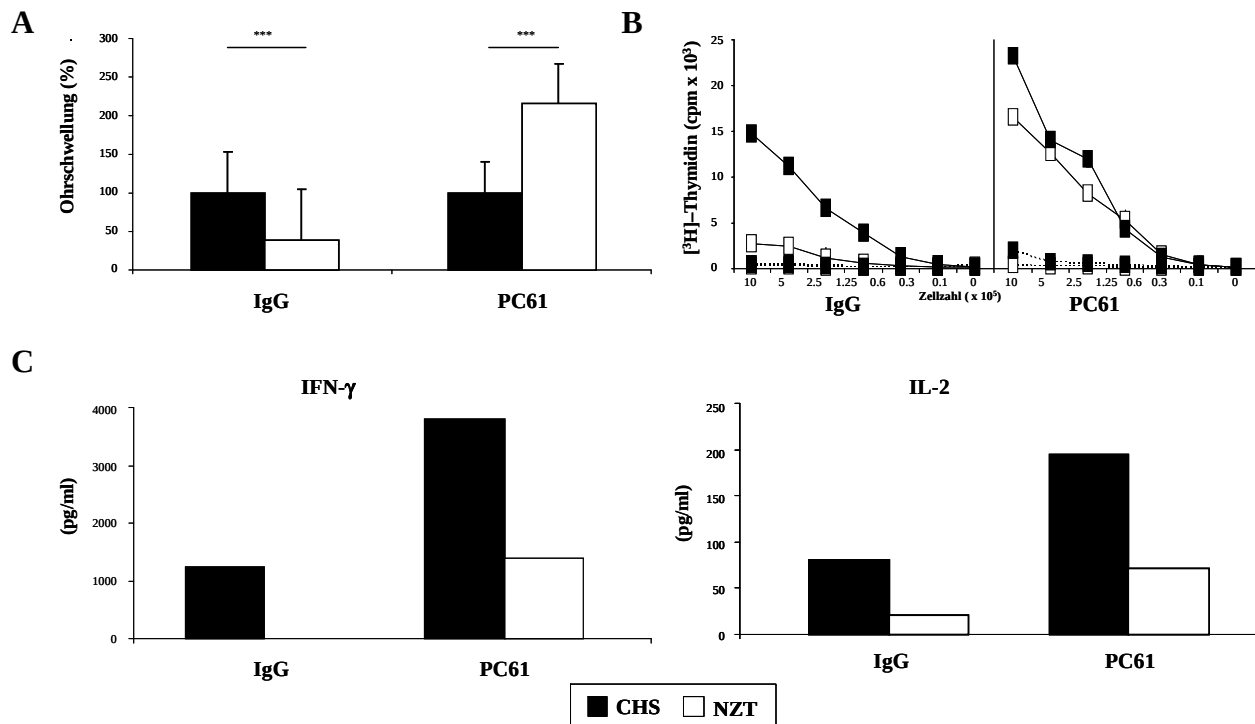


Abbildung 12: Messungen der Immunantworten nach Depletion von CD25⁺ T-Zellen mittels eines anti-CD25-Antikörpers (PC61)

In den Kontrollgruppen, die mit einem Kontroll-IgG-Antikörper behandelt worden ist, sowie in den Gruppen, die durch die Gabe des PC61-Antikörpers eine reduzierte Anzahl von CD25⁺ T-Zellen besitzen, werden entweder durch wiederholte epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen mit TNCB eine NZT (□ NZT) oder in der Gruppe der sensibilisierten Tiere nach Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel eine CHS (■ CHS) induziert. (A) Mittelwert der % Ohrschwellung mit entsprechen Standardabweichungen, wobei die CHS-Gruppe als 100 % gesetzt wird (n=6). (B) Proliferation der gepoolten drainierenden Lymphknotenzellen ohne (---) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (—) nach Inkubation mit ³H-Thymidin. (C) Maximalwert der Zytokine: IFN-γ und IL-2 nach 48 Stunden (***: p = 0.001). Abgebildet ist einer von vier unabhängigen Versuchen.

3.3.2 Reduktion und funktionelle Inhibition von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch die Gabe von Cyclophosphamid

nTregs können mittels des Chemotherapeutikums CY in ihrer Anzahl reduziert sowie in ihrer Funktion beeinträchtigt werden¹³². Es ist bereits bekannt, dass durch geringe Dosen von CY die Apoptose von nTregs gefördert und ihre Proliferation beeinträchtigt wird¹³². Aufgrund des kurzen Zeitintervalls der CD25⁺ T-Zell-Reduktion werden die Mäuse nur fünfmal mit subimmunogenen Dosen von TNCB bzw. dem Lösungsmittel behandelt. Erst nach Rückkehr der nTregs werden die Mäuse nach dem NZT- bzw. CHS-Protokoll weiter behandelt, um einen Einfluss auf die Sensibilisierung und damit die Effektor-Phase der NZT und CHS auszuschließen. (Abb. 13). Als Kontrollen dienen Tiere, denen PBS injiziert wird, um anschließend eine NZT oder CHS auszulösen.

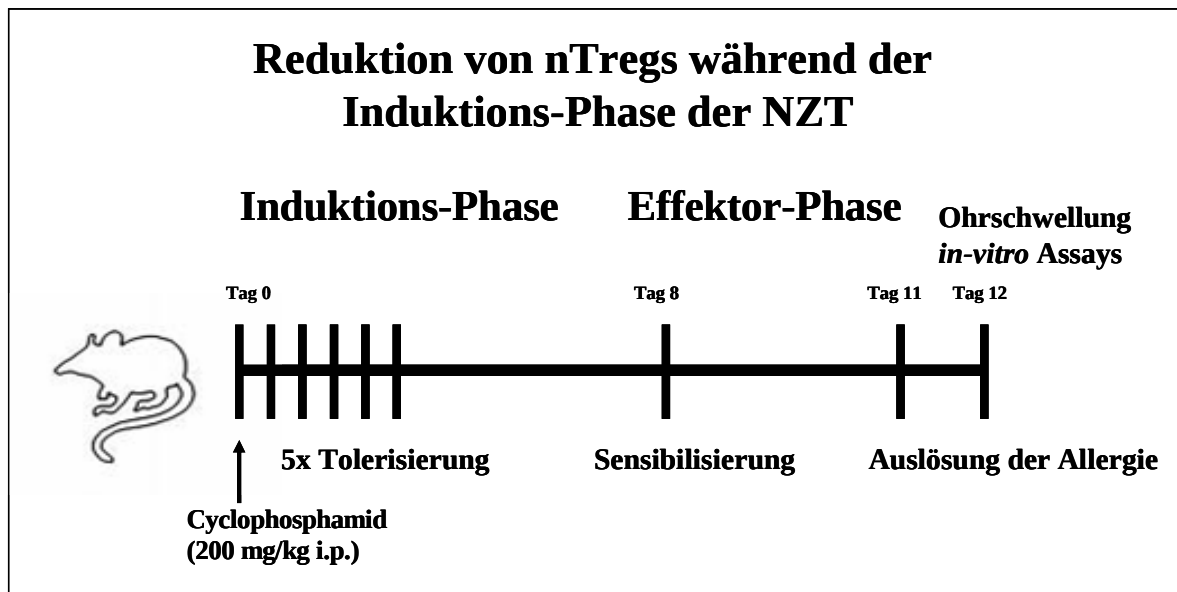


Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf: Reduktion von nTregs während der Induktions-Phase der NZT

In den Kontrollgruppen wird eine NZT bzw. CHS ausgelöst, nachdem sie einmalig mit PBS i.p. injiziert wurden (siehe Abb. 5.). Zwei weiteren Gruppen wird vor Induktion der NZT bzw. Lösungsmittel-Behandlung der CHS-Gruppe einmalig das Chemotherapeutikum CY (200 mg/kg Maus) i.p. injiziert. Am nächsten Tag wird die Reduktion der nTregs mittels Durchflusszytometrie bestätigt und die Mäuse fünfmal tolerisiert. Am Tag 8 wird durch eine weitere durchflusszytometrische Analyse die Rückkehr der Zellen bestätigt, die Mäuse sensibilisiert und fünf Tage später durch das Kontaktallergen eine Entzündung ausgelöst. Die Ohrschwellung wird vor und 24 Stunden nach der Entzündungsreaktion gemessen, anschließend die drainierenden Lymphknoten entnommen und für weitere *in-vitro*-Experimente gepoolt.

Die Reduktion der nTregs in den drainierenden Lymphknoten der CY- und PBS-behandelten Mäusen wird durch Durchflusszytometrie kontrolliert (Abb. 14). Am Tag 3 ist in der Population $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eine leichte Verminderung der Anzahl zu beobachten, doch wird in der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs Population eine Reduktion von 36% auf 23% deutlich. Damit nur während der Induktions-Phase eine Inhibition der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs induziert wird und die Effektor-Phase der CHS und NZT unbeeinflusst bleibt, werden die Mäuse nur an 5 Tagen hintereinander tolerisiert und am Tag 8, d.h. nach Rückkehr der Zellen auf ihre ursprüngliche Anzahl (35 %) (Abb. 14), sensibilisiert und weitere 5 Tage später die Entzündungsreaktion ausgelöst.

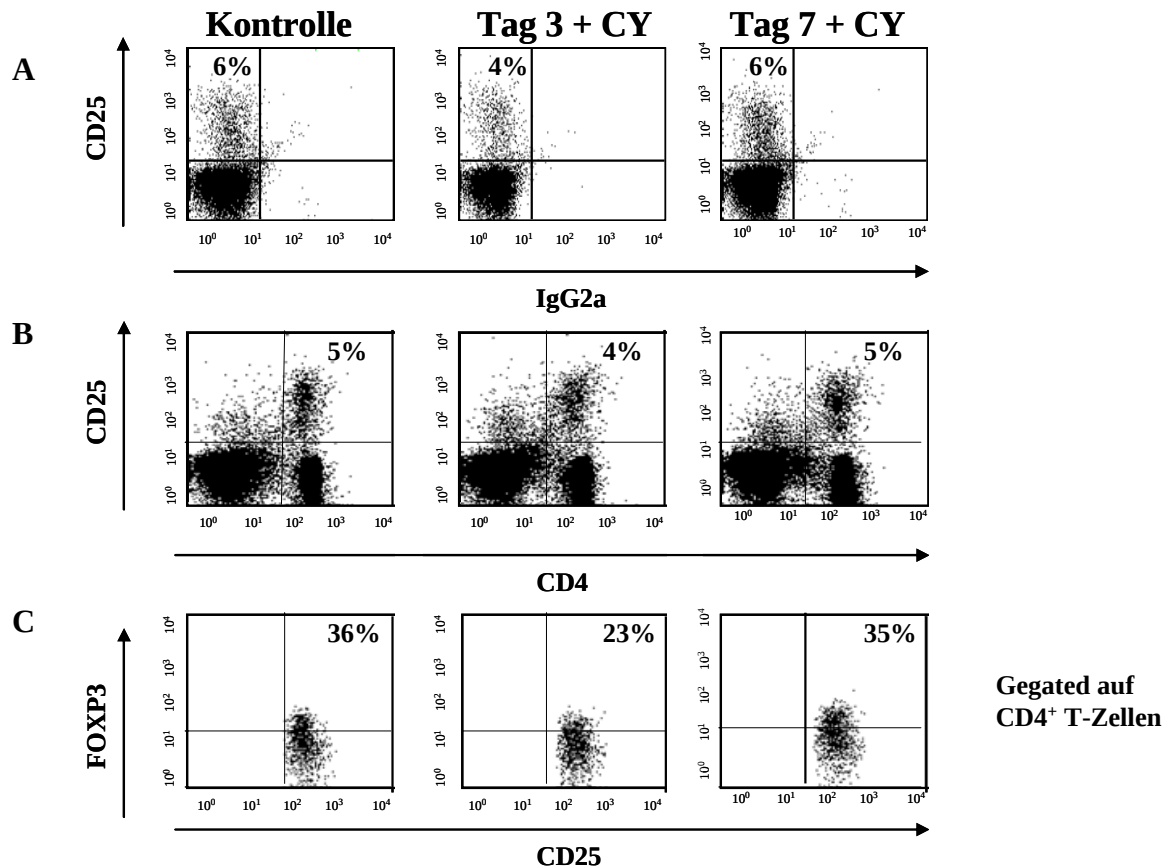


Abbildung 14: Reduktion und Rückkehr der CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-Zellen nach CY-Behandlung

Die drainierenden Lymphknoten aus den mit CY- bzw. PBS-behandelten Tieren werden am Tag 3 und 7 entnommen und mittels einer durchflusszytometrischen Messung auf die Reduktion und Rückkehr der CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T-Zellen untersucht. A) Anzahl aller CD25⁺ T-Zellen (CD25-PE). (B) Anzahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (CD4-FITC und CD25-PE). (A) und (B) beziehen sich auf alle gemessenen Zellen. (C) Anzahl der nTregs (CD4-FITC, CD25-PE und FOXP3-APC). Dargestellt sind die CD25⁺FOXP3⁺ Zellen gated auf CD4⁺ T-Zellen. Abgebildet ist einer von vier unabhängigen Versuchen.

In den Kontrollgruppen haben wir, wie bekannt, eine Entwicklung sowohl der NZT als auch der CHS anhand der Ohrschwellreaktion als *in-vivo* Parameter beobachtet. Die tolerisierten Mäuse (□ NZT) haben im Gegensatz zu den CHS-Tieren (■ CHS) eine fast 80 % geringere Ohrschwellung (Abb. 15 A). Im Gegensatz hierzu zeigt sich bei der mit CY-injizierten Gruppe nach Applikation subimmunogener Dosen von TNCB nicht nur eine Aufhebung der Toleranzreaktion, sondern eine im Vergleich zur CHS-Gruppe deutlich verstärkte kutane Entzündungsreaktion, wie wir es auch schon bei der Depletion CD25⁺ T-Zellen mittels Antikörper beobachtet haben.

In der *in-vitro* Bestimmung der Immunreaktion, gemessen durch T-Zell-Proliferation nach Restimulation (Abb. 15 B), weisen die Kontrollen wiederum die typischen Charakteristika einer NZT- und CHS-Immunreaktion auf. Die T-Zell-Proliferation nach CY-Gabe ist

insgesamt etwas verringert, aber auch hier ist erkennbar, dass trotz Toleranzinduktion die TNCB-vorbehandelten Mäuse im Gegensatz zu der CHS- und der toleranten Kontrollgruppe eine erhöhte T-Zell-Proliferationsrate aufweisen.

Um die T-Zell-spezifische Immunantwort genauer zu untersuchen, haben wir auch in diesen Versuchen die Zytokinsekernierung analysiert (Abb. 15 C). In den Kontrollgruppen ist erneut eine typische CHS-Antwort durch vermehrte IL-2- und IFN- γ -Ausschüttung im Vergleich zu der NZT-Gruppe erkennbar. Bei den CY-behandelten Gruppen ist jedoch keinen Unterschied der CHS- und NZT-Gruppe in Bezug auf die IL-2- und IFN- γ -Sekernierung zu erkennen. Beide Gruppen zeigen sowohl eine vermehrte IL-2- als auch IFN- γ -Produktion, die mit der deutlichen lokalen Entzündungsreaktion und der erhöhten T-Zell-Proliferation korreliert. Die Gabe von CY und die dadurch bedingte Reduktion von nTregs verhindert somit eine NZT und stattdessen wird eine verstärkte Sensibilisierungsreaktion in Form der CHS induziert.

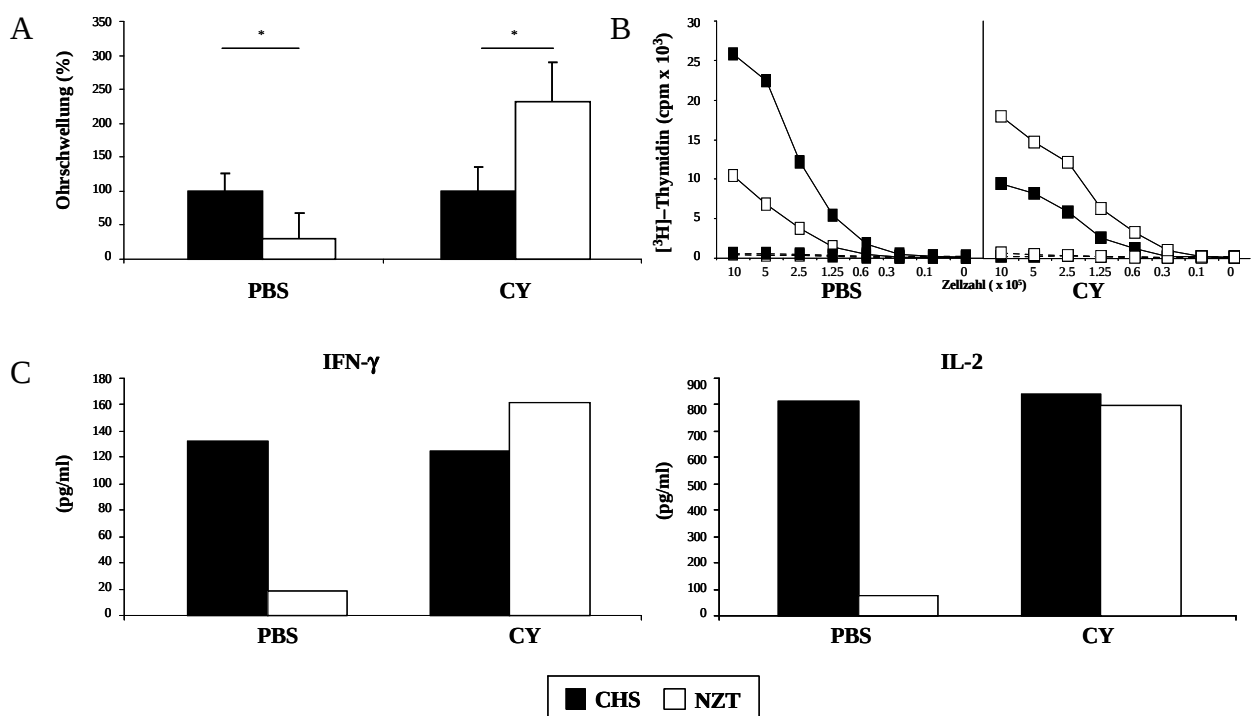


Abbildung 15: Messungen der Immunantwort nach Reduktion der Anzahl der nTregs durch CY

Kontrollgruppen wurden mit PBS behandelt, während die eigentlichen Versuchsgruppen einmalig CY erhielten. Anschließend wurde entweder durch wiederholte epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen von TNCB eine NZT (□ NZT) oder durch Vorbehandlung mit AOO anschließend eine CHS (■ CHS) induziert. (A) Mittelwert der % Ohrschwellung mit entsprechender Standardabweichung, wobei der Wert der CHS-Gruppe als 100 % gesetzt wurde (n=6). (B) T-Zell-Proliferation der gepoolten Lymphknotenzellen ohne (---) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (—) nach Inkubation mit ³H-Thymidin. (C) Maximalwert der Zytokine: IL-2 und IFN- γ nach 48 Stunden in den Überständen der T-Zellen. (*:p = 0.01, ***: p = 0.001). Abgebildet ist einer von vier unabhängigen Versuchen.

Wie durch unseren Messungen deutlich wird, depletiert der Antikörper PC61 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen fast vollständig, während CY die $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen in der Anzahl nur reduziert. Darüber hinaus ist aber auch bekannt, dass durch die Gabe von CY die Funktion der Tregs eingeschränkt werden kann. Dies deutet darauf, dass nicht nur eine verminderte Anzahl der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen ausschlaggebend für die Induktion einer Toleranz sein kann, sondern auch eine eingeschränkte Funktion der Zellen.

3.4 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen induzieren die Entwicklung $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen der NZT

Es ist bekannt, dass $CD8^+$ Suppressor T-Zellen, die unter dem Einfluss von IL-10, das durch $CD4^+$ T-Zellen produziert wird, gebildet werden und diese Zellen eine NZT in unbehandelte Tiere übertragen können⁷⁷⁻⁷⁹. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob für die Generierung dieser Zellen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen notwendig sind.

Die Tiere werden nach dem PC61-Depletions-Protokoll behandelt (Abb. 10). Den Spendergruppen wird der Kontroll-IgG-Antikörper oder der Klon PC61 i.p. injiziert und nach Verifizierung der Depletion der $CD25^+$ T-Zellen werden diese Mäuse siebenmal mit TNCB tolerisiert. Nach Wiederkehr der $CD25^+$ T-Zellen werden den Mäusen die drainierenden Lymphknoten entnommen und mittels MACS-Aufreinigung $CD8^+$ T-Zellen gewonnen. 2×10^7 dieser Zellen werden anschließend in naive Mäuse i.v. injiziert, die einen Tag später sensibilisiert und weiter nach dem Standard-Protokoll behandelt werden (Abb. 16).

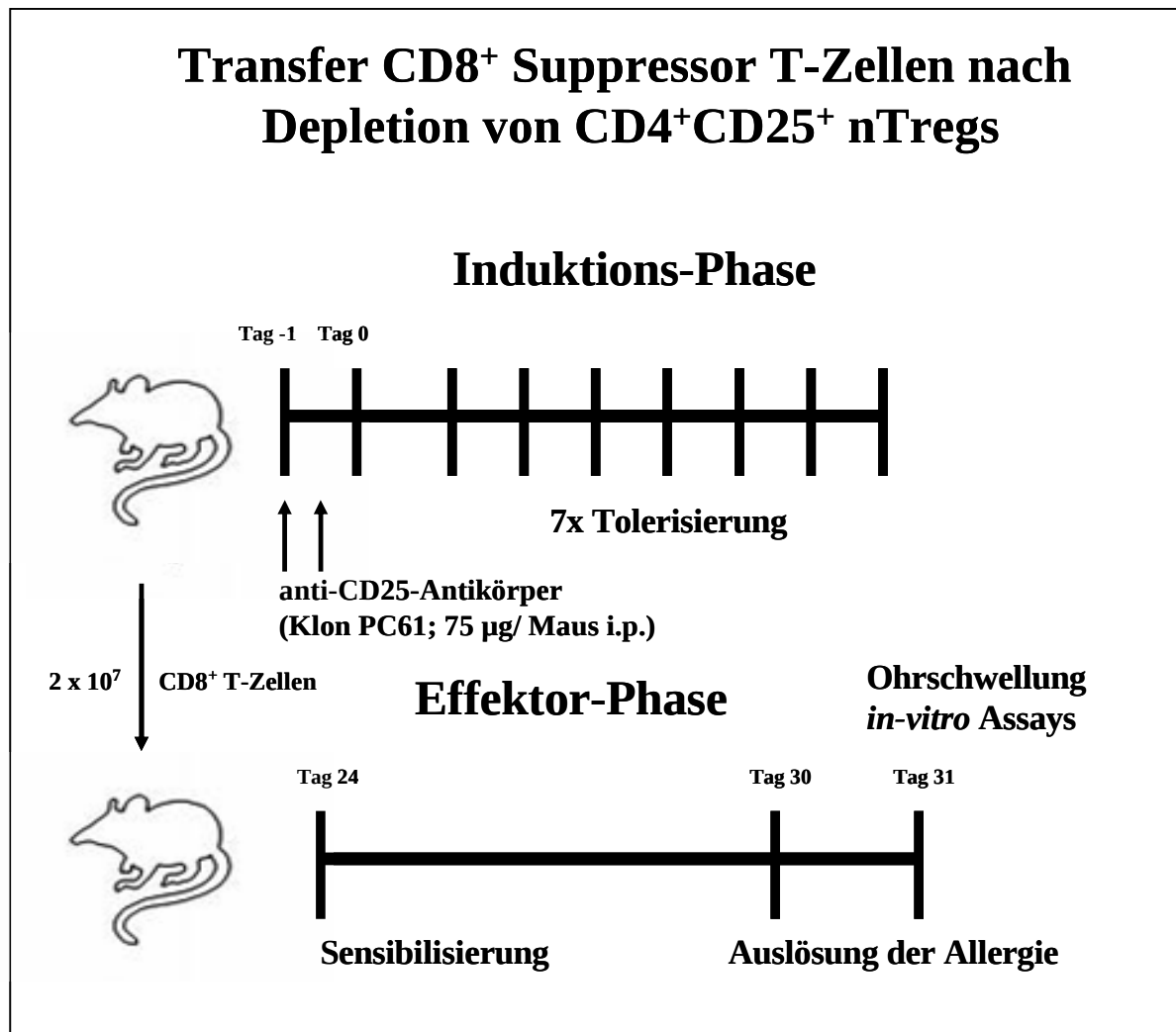


Abbildung 16: Schematischer Versuchsablauf: Transfer der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen nach Depletion CD4⁺CD25⁺ nTregs mit PC61

In den vier Kontrollgruppen wird eine Standard-CHS und -NZT ausgelöst, nachdem den Mäusen entweder ein Kontroll-IgG-Antikörper oder PC61 (je 75 µg/Maus) zweimal i.p. injiziert wurde (siehe Abb. 11). Die Spendertiere werden analog behandelt und nach Depletion der nTregs siebenmal tolerisiert bzw. mit AOO behandelt. Nach Wiederkehr der CD25⁺ T-Zellen werden die drainierenden Lymphknoten aus den tolerisierten und Kontroll-Mäusen entnommen. Mittels MACS-Aufreinigung werden die CD8⁺ Suppressor-T-Zellen gewonnen und 2 x 10⁷ der T-Zellen in naive Mäuse i.v. injiziert. Einen Tag später werden die Tiere sensibilisiert und fünf Tage später wird durch das Kontaktallergen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Die Ohrschwellung wird vor und 24 Stunden nach der Entzündung gemessen und anschließend die drainierenden Lymphknoten für weitere *in-vitro* Versuche entnommen.

Auch in diesen Versuchen zeigen die Kontrollgruppen eindeutig die Entwicklung einer NZT bzw. CHS anhand der unterschiedlichen Ohrschwellreaktionen (Abb. 17 A). Wie schon von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, stellen CD8⁺ Suppressor-T-Zellen die eigentlichen Effektor-T-Zellen der NZT dar, durch die auch der Toleranzeffekt in naive Mäuse übertragen werden kann. Durch die Abwesenheit der Ohrschwellung bei Mäusen, die CD8⁺ Suppressor-T-Zellen aus mit IgG injizierten und tolerisierten Mäusen (□ AT CD8⁺ T-Zellen) erhalten haben, ist dieses Phänomen erkennbar. Im Gegensatz hierzu zeigt sich nach Übertragung von

CD8⁺ T-Zellen aus Mäusen, die in Abwesenheit von CD25⁺ T-Zellen tolerisiert wurden, keine Entwicklung einer Toleranzreaktion, messbar durch eine verringerte Ohrschwellung, sondern eine CHS-Reaktion mit einer starken lokalen Entzündungsreaktion (Abb. 17 A) (AT CD8⁺ T-Zellen).

Die *in-vitro* gemessene T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation stellt ein ähnliches Bild dar (Abb. 17 B). Während die Kontrollgruppen die Ergebnisse aus unseren Vorarbeiten bestätigen, zeigt sich auch in diesen Versuchen aufgrund einer verstärkten T-Zell-Proliferationsrate nach adoptiven Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus depletierten und tolerisierten Tieren, dass die Entwicklung von CD8⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT in Abwesenheit von CD25⁺ Tregs nicht stattfinden kann. In der mit dem PC61-Antikörper injizierten Gruppe proliferieren die T-Zellen am stärksten, die aus tolerisierten, mit TNCB-vorbehandelten Mäusen entnommen wurden, welche auch die stärkste Entzündungsreaktion anhand der Ohrschwellung aufweisen.

Für weitere Untersuchungen der Immunreaktion ist die Zytokinproduktion der T-Zellen nach Hapten-spezifischer Restimulation in den Überständen der Lymphknotenzellen nach 48 Stunden in den verschiedenen Gruppen gemessen worden (Abb. 17 C). In den IgG-injizierten Kontrolltieren bestätigt sich durch erhöhte IFN- γ - und IL-2-Produktion eine CHS- und durch geringere IFN- γ - und IL-2-Sezernierung eine NZT-Induktion. In den PC61-injizierten Kontrolltieren wird in beiden Gruppen (AOO- oder TNCB-vorbehandelte Tiere) vermehrt IFN- γ und IL-2 sezerniert und somit keine NZT, sondern eine CHS-Reaktion ausgelöst. In den Überständen der Lymphknotenzellen der Tiere, die CD8⁺ T-Zellen aus IgG-behandelten Spendern empfangen haben, ist durch die geringe IFN- γ - und IL-2-Ausschüttung eine NZT charakterisiert. Dagegen sezernieren die Lymphknotenzellen aus den CD8⁺ T-Zell Empfänger-tieren der PC61-vorbehandelten Tiere vermehrt IFN- γ und IL-2.

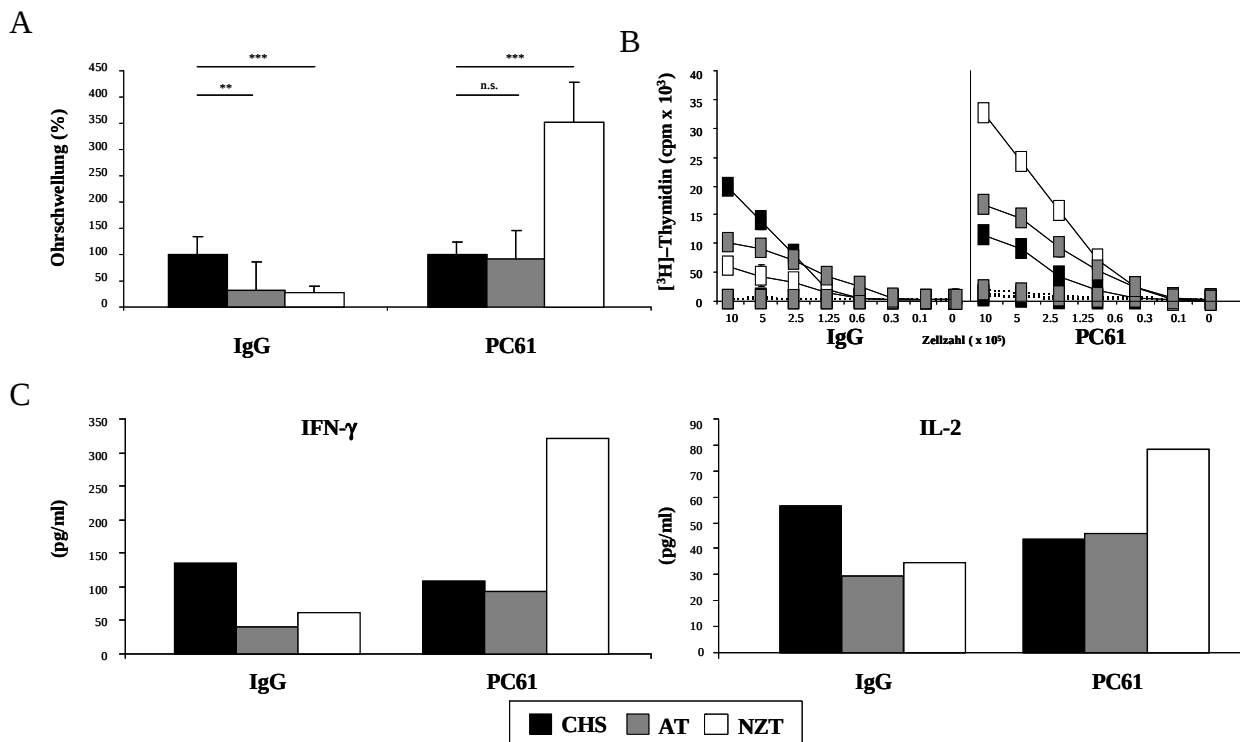


Abbildung 17: Analyse der Immunantworten nach Transfer CD8⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT

In der mit IgG-behandelten Kontrollgruppe sowie in der Gruppe, die bedingt durch die PC61 Gabe eine reduzierte Anzahl von CD25⁺ T-Zellen besitzt, wird durch wiederholte epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen TNCB eine NZT (□ NZT) oder von AOO eine CHS (■ CHS) ausgelöst. Einer Empfängergruppe (▣ AT) werden 2×10^7 CD8⁺ T-Zellen aus tolerisierten Tieren i.v. injiziert. Anschließend werden alle Gruppen sensibilisiert und eine Entzündungsreaktion ausgelöst. (A) Mittelwert der % Ohrschwellung mit entsprechender Standardabweichung, wobei die AOO-Gruppe einen Wert von 100 % annimmt (n=6). (B) Proliferation der gepoolten, drainierenden Lymphknotenzellen ohne (---) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (—) nach Kultivierung mit ³H-Thymidin. (C) Maximalwert der Zytokine: IL-2 und IFN-γ nach 48 Stunden in den Überständen (**: p = 0.001, ***: p = 0.0001). Abgebildet ist einer von drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diesen Adoptiven Transfer von CD8⁺ Suppressor-T-Zellen aus CD4⁺CD25⁺ T-Zellen depletierten und tolerisierten Mäusen die Notwendigkeit von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen für die Generierung der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen der NZT bestätigt wurde.

3.5 Die Hapten-unspezifische Wirkung CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der NZT

Im Weiteren stellte sich die Frage, ob auch durch CD4⁺CD25⁺ Tregs der Toleranzeffekt der NZT übertragen werden kann und ob dieser Effekt, wie bei den CD8⁺ Suppressor T-Zellen, Hapten-spezifisch ist. Andere Arbeiten in Bezug zur Funktion von nTregs konnten zeigen, dass diese zwar antigenspezifisch aktiviert werden müssen, in der Regel jedoch eine antigenunspezifische regulatorische Funktion besitzen^{108,133}.

Um diese Fragen zu beantworten, haben wir adoptive Transfer-Versuche von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus tolerisierten Spendern in naive Empfängertiere durchgeführt. Die anschließend

sowohl mit demselben Kontaktallergen (TNCB), das für die Tolerisierung verwendet wurde, als auch einem zweiten Hapten (DNFB) sensibilisiert wurden. Fünf Tage später wurde bei allen Mäusen die CHS ausgelöst, die Ohrdicke gemessen und die Lymphknoten entnommen (Abb. 18).

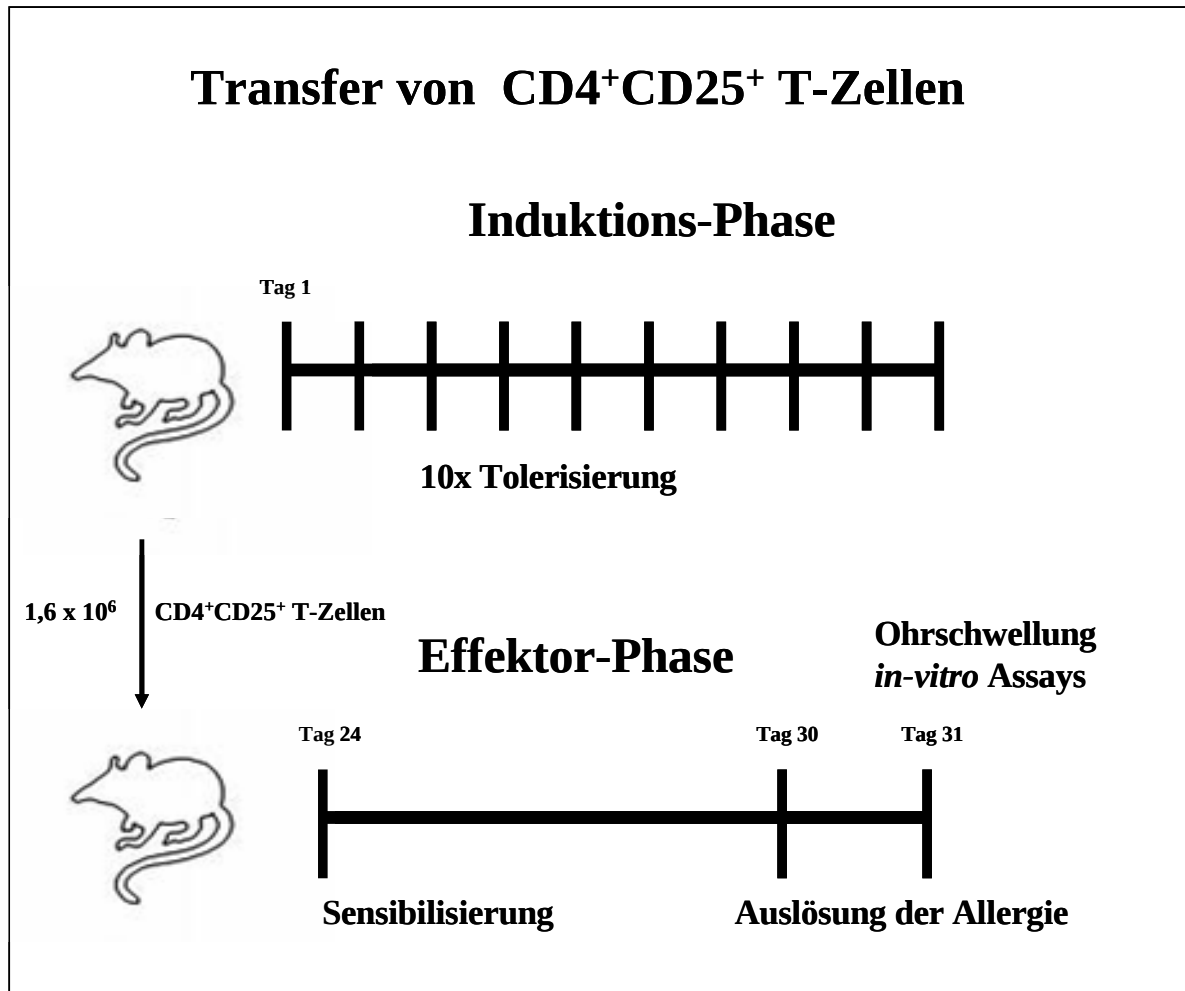


Abbildung 18: Schematischer Versuchablauf: Transfer regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen

In den Kontrollgruppen wird durch Behandlung entweder mit TNCB oder DNFB jeweils eine CHS bzw. NZT induziert und ausgelöst (siehe Abb. 5.). Die Spender-Mäuse werden zehnmal mit TNCB tolerisiert bzw. die Kontrolltiere mit AOO behandelt und anschließend die drainierenden Lymphknoten entnommen. Mittels MACS-Aufreinigung die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gewonnen und $1,6 \times 10^6$ der T-Zellen in naive Mäuse i.v. injiziert. Einen Tag später werden die Empfänger mit entweder mit TNCB oder DNFB sensibilisiert und fünf Tage später durch das jeweilige Kontaktallergen eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die Ohrschwellung wird vor und 24 Stunden nach der Entzündungsreaktion gemessen und anschließend die drainierenden LN für weitere *in-vitro*-Versuche entnommen

In den NZT-Kontrollen, der jeweils mit DNFB- bzw. TNCB-tolerisierten Mäusen ($\square$ NZT), ist eine deutlich verminderte Ohrschwellung im Gegensatz zu den CHS-Gruppen ($\blacksquare$ CHS) zu beobachten (Abb. 19 A). Aber auch in den Empfänger-Mäusen der $CD4^+CD25^+$ nTregs ($\blacksquare$ AT $CD4^+CD25^+$ T-Zellen) ist eine inhibierte kutane Entzündungsreaktion sowohl bei den mit TNCB als auch mit DNFB sensibilisierten Mäusen erkennbar, so dass der Toleranzeffekt der

NZT durch Tregs übertragen werden kann, aber keine Hapten-spezifische Wirkung der nTregs vorliegt (Abb. 19 A).

Diese Ergebnisse lassen sich auch durch die *in-vitro* detektierte T-Zell-Proliferation (Abb. 19 B) bestätigen. Auch in diesen Versuchen zeigt sich, dass ähnlich wie in den *in-vivo*-induzierten NZT-Gruppen, nach Transfer der $CD4^+CD25^+$ Tregs eine signifikant verminderte Proliferationsrate gemessen werden kann (Abb. 19 B). In den DNFB-Gruppen ist keine signifikante Differenzierung zwischen den verschieden behandelten Mäusen messbar, doch eine Tendenz ist auch hier erkennbar. Die T-Zellen der CHS- und NZT-Kontroll-Gruppen zeigen den bekannten hohen bzw. niedrigen T-Zell-Aktivierungsgrad.

Bei der Analyse des Zytokinprofils zeigt sich ebenfalls, dass durch adoptiven Transfer von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen die NZT übertragen werden kann, da sich in diesen Gruppen sowohl nach Sensibilisierung mit TNCB als auch DNFB signifikant reduzierte Mengen an IFN- γ und IL-2 nachweisen lassen. Im Vergleich dazu weisen die Kontroll-NZT- und -CHS-Gruppen das bekannte Zytokinmuster auf (Abb. 19 C). Bei den mit DNFB-behandelten Mäusen ist im Vergleich zur TNCB-Gruppe eine geringere Zytokinausschüttung zu sehen.

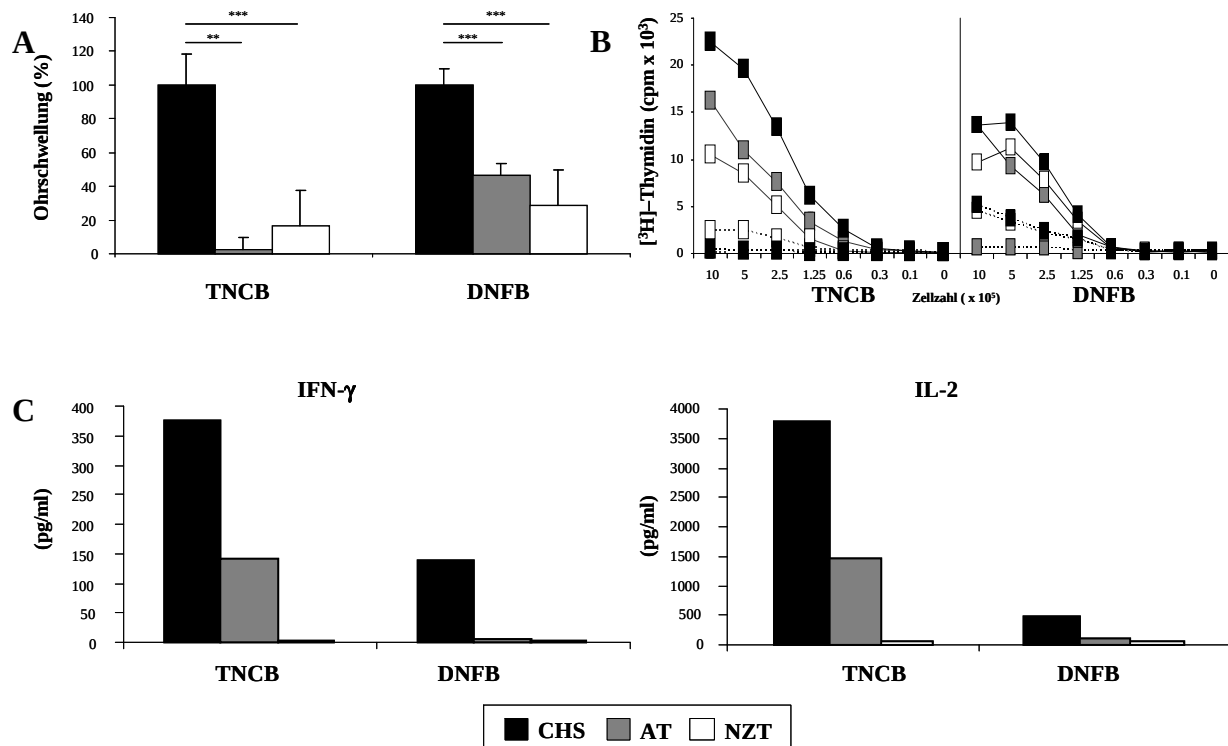


Abbildung 19: Untersuchung der immunologischen Prozesse nach Transfer $CD4^+CD25^+$ Tregs

In den jeweiligen Kontrollgruppen wird eine NZT (□ NZT) oder CHS (■ CHS) entweder mit TNCB oder DNFB induziert. Die zwei Empfängergruppen der tolerogenen $CD4^+CD25^+$ nTregs (▒ AT) werden entweder mit TNCB oder DNFB sensibilisiert und durch das jeweilige Kontaktallergen eine Entzündungsreaktion ausgelöst. (A) Mittelwert der % Ohrschwellung mit entsprechender Standardabweichung, wobei die CHS-Gruppe einen Wert von 100 % annimmt (n=6). (B) Proliferation der gepoolten, drainierenden Lymphknotenzellen ohne (---) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (—) nach Kultivierung mit 3H -Thymidin. (C) Maximalwert der Zytokine: IL-2 und IFN- γ nach 48 Stunden der Überständen der T-Zellen (**: p 0.001, ***: p = 0.0001). Abgebildet ist einer von vier unabhängigen Versuchen.

Gemessen anhand den *in-vivo* und *in-vitro* Parameter der resultierenden Immunantworten kann der Toleranzeffekt der NZT durch $CD4^+CD25^+$ T-Zellen übertragen werden. Die regulatorische Funktion dieser aktivierten nTregs während der Induktions-Phase der NZT ist jedoch haptenunspezifisch.

3.6 Zusammenfassung der Resultate

Wie bereits beschrieben, kann eine NZT durch epikutan applizierte subimmunogene Dosen der Kontaktallergene TNCB und DNFB induziert werden, die durch $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen vermittelt wird. Im Vorfeld ist bereits gezeigt worden, dass IL-10 sezernierende $CD4^+$ T-Zellen während der Induktions-Phase der NZT notwendig sind. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob $CD4^+$ Tregs bei der NZT eine Rolle spielen. Gemessen anhand der *in-vivo* - (Ohrdicke, kutane Entzündungsreaktion) und *in-vitro*- (T-Zell-Proliferation und Zytokinsekernierung) Parametern der CHS und NZT sind weitere Ergebnisse erzielt worden:

- 1 Die Anzahl der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs sind in der NZT im Vergleich zu der CHS nicht erhöht.
- 1 Während der Induktions-Phase sind $CD4^+CD25^+$ nTregs für die Generierung der $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen der NZT notwendig.
- 1 Durch $CD4^+CD25^+$ Tregs kann die Toleranzinduktion in naive Mäuse übertragen werden.
- 1 $CD4^+CD25^+$ Tregs besitzen eine haptenunspezifische regulatorische Wirkung.

4. Diskussion

Das Immunsystem schützt den Organismus vor biologischen Pathogenen. Weiterhin muss das Immunsystem auch in der Lage sein, gesunde und entartete körpereigene Strukturen zu unterscheiden. Diese Aufgaben werden mit Hilfe der immunologischen Toleranz bewältigt. Zu der immunologischen Toleranz gehören die zentralen und peripheren Toleranzmechanismen²⁸, wobei hier die im Thymus entstehenden natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen (nTreg) eine der wichtigsten Rollen zugeschrieben wird¹⁰⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs im murinen Modell der Niedrigzonentoleranz (NZT) gegenüber Kontaktallergenen untersucht. Ausgangspunkt waren die Beobachtungen, dass die Applikation von subimmunogenen Dosen eines Kontaktallergens vor der Sensibilisierung eine Toleranz induzieren kann und diese Toleranz von $CD8^+$ Suppressor T-Zellen, die für ihre Entstehung IL-10 produzierende $CD4^+$ T-Zellen benötigen, vermittelt wird^{77,79}. Ziel war es demzufolge zu definieren, welche Population von $CD4^+$ T-Zellen entscheidend für die Generierung der $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen ist und ob möglicherweise $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs für den Toleranzeffekt der NZT verantwortlich sind.

4.1 Charakterisierung der regulatorische T-Zellen

Es gibt unterschiedliche Populationen von Tregs, die durch ihren Phänotyp und ihre Funktion unterschieden werden können: iTregs (induzierte Tregs: $CD4^+$ Tregs), $CD8^+$ Tregs und nTregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs). Tregs sind bereits seit 1969 beschrieben, doch bereitet die genaue Charakterisierung der T-Zellen durch Oberflächenmoleküle und andere Eigenschaften große Probleme.

4.1.1 Induzierte regulatorische T-Zellen

Die iTregs werden in der Peripherie induziert und gut charakterisierten Populationen sind die Tc1- und Th3-Zellen. Ihre suppressiven Eigenschaften werden durch lösliche Faktoren vermittelt, während Tr1-Zellen nach T-Zell-Rezeptor Stimulation IL-10 sezernieren, produzieren Th3-Zellen nach Stimulation $TGF-\beta^{34}$.

Die weitaus weniger untersuchten $CD8^+$ Tregs, früher $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen genannt, haben *in-vitro* und *in-vivo* verschiedene suppressive Eigenschaften¹⁰². Die $CD8^+$ Tregs können anhand von Oberflächenmarkern in mehrere Populationen aufgeteilt werden. Diese

Populationen haben unterschiedliche Suppressionsmechanismen: direkte Zerstörung der Zielzelle, APZ-Aktivierung oder Zytokinausschüttung³⁷.

Die Rolle der CD8⁺ Tregs zur Produktion von IL-10 in der NZT konnte bereits von Anfang an ausgeschlossen werden. Da bereits bekannt ist, dass nur CD4⁺ T-Zellen IL-10 während der NZT sezernieren, können CD8⁺ Tregs nicht die Tregs sein, die das notwendige IL-10 produzieren⁷⁹. iTregs, vor allem die IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen, aber auch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen unterdrücken die Entstehung einer Immunantwort^{84,99,134}. Da aber die Depletion (PC61) und Reduktion (Cyclophosphamid) von nTregs die Entstehung einer NZT unterdrückt, sind iTregs, im Besonderen Tr1-Zellen, ausgeschlossen worden (Abb. 12 und 15, siehe 4.2.3).

4.1.2 Natürliche vorkommende regulatorische T-Zellen

Die Population, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle in der NZT gegenüber Kontaktallergenen hat, sind nTregs. Die im Thymus generierten nTregs sind am besten charakterisierte Population der Tregs. nTregs besitzen eine eingeschränkte Proliferation und IL-2 Zytokinproduktion⁹⁹. Sie supprimieren die Entwicklung und Aktivierung von autoreaktiven Zellen^{81,82,135}. Nur 5-10 % von CD4⁺CD25⁺ Tregs wandern in die Peripherie aus. Dort supprimieren CD4⁺CD25⁺ nTregs nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation die Proliferation und Zytokinausschüttung konventioneller CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kontaktabhängig^{105,106}. nTregs gehören zu den Zellen, die sowohl die Aktivierung als auch Effektorfunktion von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen limitieren^{82,99}.

Zur Untersuchung und Differenzierung der nTregs in dieser Arbeit ist es notwendig, diese T-Zellen von anderen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen anhand eines spezifischen Markers zu unterscheiden. Nur mit dem Oberflächenmolekül CD4 allein können Tregs nicht charakterisiert werden, da es ein Glykoprotein auf der Oberfläche von Th-Zellen (Effektor-T-Zellen), Makrophagen und Monozyten ist¹³⁶. CD25 ist die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors und wird vermehrt auf der Oberfläche von aktivierten T- und B-Zellen gefunden¹³⁷. Da CD4⁺ Effektor-T-Zellen im aktivierten Zustand zusätzlich CD25 exprimieren, können nur anhand der Expression von CD4⁺ und CD25⁺ nicht automatisch nTregs identifiziert werden¹³⁶.

Nach langjähriger Suche nach einem spezifischen Molekül für nTregs wurde in der Maus der Transkriptionsfaktor FOXP3 identifiziert¹¹⁸. FOXP3 hat nicht nur eine essentielle Rolle in der Entstehung, sondern auch in der Funktion von nTregs. Weitere Studien in der Maus haben gezeigt, dass FOXP3 nicht in konventionellen aktivierten CD25⁺ T-Zellen gemessen wird^{118,138-140}. Anhand von Scurfy-Mäusen, die eine Mutation im *Foxp3* Gen aufweisen, wurde

gezeigt, dass FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen notwendig für die Entwicklung und Funktion von nTregs ist, da durch diese Mutation die Tiere an einer schweren und fatalen Autoimmunkrankheit leiden. Die CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse weisen eine verstärkte Proliferation und eine erhöhte Zytokin-Produktion auf^{93,120,141,142}.

Auch im human equivalenten IPEX-Syndrom ist gezeigt worden, dass *Foxp3* eine tödlich verlaufende Autoimmunerkrankung auslösen kann¹⁴³. Jedoch ist im humanen System ist die Eindeutigkeit von FOXP3 als Marker für nTregs bereits ausgeschlossen worden, da nicht nur nTregs diesen Transkriptionsfaktor exprimieren, sondern auch CD4⁺CD25⁺ Effektor-T-Zellen^{119,144,145}.

Da sich die Untersuchungen dieser Arbeit ausschließlich auf murine nTregs beziehen, sind die in dieser Arbeit untersuchten murinen nTregs ausreichend durch die Oberflächenmoleküle CD4⁺, CD25⁺ und FOXP3⁺ charakterisiert worden.

4.1.3 Die Rolle der nTregs in verschiedenen Krankheits-Modellen

1969 wurden Suppressor-T-Zellen, heutzutage auch Tregs genannt, zum ersten Mal identifiziert^{98,102,103}. Erst Mitte der 1990er Jahre wurde eine im Thymus reife Population von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen genauer charakterisiert¹⁰⁴. Seither sind in vielen Krankheiten die suppressiven Eigenschaften der nTregs untersucht worden. In Abwesenheit der nTregs entstehen schwere Autoimmunerkrankungen. Ein Beispiel hierfür ist das menschliche IPEX Syndrom¹³⁹ oder das äquivalente murine Scurfy Syndrom¹¹⁹.

Auch bei anderen Krankheiten ist die Rolle von verschiedenen Tregs-Populationen bereits untersucht worden. In diversen Tumormodellen ist eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Tregs-Zell-Zahl nachgewiesen worden. Tregs hemmen im Tumorgewebe die Effektorfunktion von Immunzellen, wie z.B. zytotoxische T-Zellen als auch natürliche Killer-Zellen und unterstützen somit das Tumorstadium¹⁴⁶.

Weiter wurde die Rolle von nTregs in Infektionen beschrieben. Dort wird Tregs eine eher widersprüchliche Aufgabe in der Kontrolle der Immunantwort gegenüber Pathogenen zugesprochen. Durch das Dulden der Pathogene (Suppression der Immunantwort) führen Tregs entweder zu einer günstigen Symbiose zwischen Pathogen und Wirt oder zu einer Parasitenresistenz¹⁴⁷. In Infektionen wie HIV, Hepatitis-B und Hepatitis-C führt die Deletion von Tregs zu einer erhöhten virusspezifischen Immunantwort *in vitro*^{148,149}. Andererseits leiden Hepatitis-C-infizierte Individuen mit einer erhöhten nTregs Anzahl seltener an Leberschäden¹⁵⁰. Die verschiedenen Wirkungsmechanismen der nTregs in Infektionen werden

weiterhin diskutiert. Bereits bekannt ist, dass nTregs durch die Produktion von IL-10, TGF- β und CTLA-4 die Effektor-Antwort des Immunsystems während der Infektion vermindern¹⁴⁷. Auch in Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Diabetes-Mellitus Typ 1 und die Multiple Sklerose, sind nTregs und ihre Funktion charakterisiert worden. In der autoimmunen Diabetes Typ 1 unterdrücken die CD28-abhängigen nTregs die Induktion einer Immunreaktion antigenspezifisch¹⁵¹. Patienten mit multipler Sklerose haben dieselbe Anzahl von Tregs wie gesunde Menschen, aber sie unterscheiden sich in ihrer Funktion, doch die Tregs Erkrankter haben keine supprimierende Funktion und dadurch eine eingeschränkte Aktivität in der Hemmung der Immunreaktion¹⁵².

4.1.4 Die Funktion von nTregs bei allergischen Immunreaktionen

In der heutigen westlichen Gesellschaft leiden ca. 15 % der Bevölkerung an den Folgen einer Allergie. Hierzu gehören im Besonderen das allergische Asthma, die allergische Rhinitis und die allergische Kontaktsensibilisierung. Die weitläufigen Ergebnisse, dass nTregs an immunologischen Krankheiten, im Besonderen Autoimmunkrankheiten, beteiligt sind, lässt darauf schließen, dass diese Zellen auch in der Allergie eine wichtige Rolle spielen¹⁵³. Neuste Untersuchungen zeigen, dass Tregs eine supprimierende Eigenschaft in der allergischen Kontaktdermatitis besitzen¹⁵⁴.

4.1.5 nTregs in der Kontakthypersensibilisierung

Die in dieser Arbeit beschriebene Kontakthypersensibilisierung ist eine Tc1-vermittelte Allergie vom Spät-Typ (Typ-IV). Erst nach der Sensibilisierung mit einem Allergen kann eine Kontakthypersensibilisierung 24 bis 72 Stunden nach nochmaligem Kontakt mit demselben Allergen auftreten. Diese äußert sich durch eine ekzematöse Veränderung der Haut: Ödem-Bildung, Rötung, Schwellung und Juckreiz.

Das Modell der CHS sowie die Rolle der nTregs auf die Suppression der CHS ist zum Teil untersucht. Die Notwendigkeit von CD4⁺ T-Zellen für die Replikation der CHS ist bereits von Bour et al., 1995 beschrieben worden. In seinen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in MHC II-defizienten Mäusen eine verstärkte CHS-Reaktion auftritt, die sogar nach CD25⁺ T-Zell-Depletion erhöht werden kann¹⁴. Diese Daten geben Hinweis auf die supprimierenden Eigenschaften von nTregs in einer CHS. Zwar wurde 1997 beschrieben, dass für das Priming der CD8⁺ Effektor-Zellen der CHS CD4⁺ T-Zellen nicht notwendig sind¹⁵, doch zeigte

Gorbachev und Fairchild, dass $CD4^+$ T-Zellen die Generierung von $CD8^+$ Effektor T-Zellen unterstützt¹⁵⁵.

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen, die IL-10 und IL-4 produzieren, eine inhibitorische und damit regulatorische Rolle bei der CHS spielen¹⁵. Die Arbeitsgruppe um Ring et al., zeigte, dass $CD8^+$ Effektor-T-Zellen der CHS durch die Gabe von $CD4^+$ Tregs gehemmt werden, in das entzündete Gewebe zu migrieren und dadurch die CHS inhibiert wird⁹⁵. Weiterhin ist beobachtet worden, dass die Wirkung der nTregs während der CHS durch einen Adenosin-anhängigen Mechanismus (CD39) bedingt ist¹⁵⁶.

Auch verschiedenen Zytokinen wird eine wichtige Rolle in der CHS zugesprochen. Ein Zytokin, das eine wichtige Funktion in der CHS spielt, ist IL-2. IL-2 ist notwendig zur Generierung und Funktion $CD4^+CD25^+$ T-Zellen¹⁰⁴. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wiederum verhindern das Priming von $CD8^+$ Effektor-T-Zellen der CHS und dadurch die Entstehung der allergischen Immunreaktion¹⁵⁷. Darüber hinaus zeigte Ring et al., dass während einer CHS $CD4^+CD25^+$ Tregs immunsuppressive Zytokine wie IL-10 produzieren, die die Reaktion auf eine allergische Kontaktsensibilisierung regulieren¹⁵⁸.

Auch dem Chemokin-Rezeptor CCR7 (C-C Chemokinrezeptor 7) wird eine wichtige Rolle in der Migration von nTregs zugeschrieben. nTregs exprimieren CCR7, welches zur Einwanderung der nTregs in die Lymphknoten benötigt wird, damit diese dann nach antigenspezifischer Stimulation expandieren und die Effektor-T-Zellantwort regulieren. CCR7-defiziente Mäuse haben im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte CHS-Reaktion, die nach Gabe von Wildtyp-nTregs aufgehoben wird¹⁵⁹.

Mäuse mit einer Überexpression von RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) in der Epidermis unter der Kontrolle von Keratin 14 zeigen eine abgeschwächte CHS-Reaktion. Das Protein RANKL aktiviert Langerhans Zellen und kontrolliert dadurch die Anzahl von $CD4^+CD25^+$ nTregs¹⁶⁰.

In der CHS transportieren Langerhans Zellen und dermale dendritische Zellen das Antigen von der Haut in die Lymphknoten, wo nach Prozession und Präsentation des Allergens $CD8^+$ Effektor-T-Zellen aktiviert werden, die eine Entzündungskaskade auslösen^{7,11}. In der NZT sind die verantwortliche APZs noch nicht charakterisiert worden. Bisweilen ist nur bekannt, dass weder Langerhans Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen noch Makrophagen in der NZT eine wichtige Rolle spielen^{22,78,161}. Somit scheint auch die Rolle der Überexpression von RANKL keine wichtige Rolle in der NZT zu haben. Dies bestätigen auch vorläufige Versuche

mit RANKL-überexprimierenden Mäusen, in denen keine verstärkte NZT beobachtet wurde (Daten nicht abgebildet).

Das nach Depletion oder Reduktion von nTregs (durch CY- und PC61-Gabe) eine erhöhte Entzündungsreaktionen ausgelöst wird, ist in CHS-Modellen bereits untersucht worden^{157,162}. In einem Maus-Modell von Kish et al., wird gezeigt, dass die Gabe von PC61 während der Sensibilisierung zu einer erhöhten CD8⁺ Effektor-T-Zell-Aktivierung führt, die eine CHS verstärken¹⁵⁷. Auch in einem UVB-Modell ist die ausgelöste Immunsuppression durch die Gabe von CY vor Bestrahlung inhibiert worden¹⁶³. Diese Reduktion von nTregs durch CY erhöht die Entzündungsreaktion auf das Allergen FITC und Oxazolon durch Inhibierung der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen¹⁶³. Im Weiteren zeigt die Arbeitsgruppe Steinbrink et al., dass CY-vorbehandelte Mäuse auf eine niedrigere Sensibilisierungsdosis reagieren. Die CHS-Reaktion auf Kontaktallergene war auch in diesem Modell verstärkt⁷⁷. Auch die Arbeiten von Ikezawa et al. bestätigen, dass die Gabe von CY eine erhöhte CHS-Reaktion hervorruft, sowie, dass nach Transfer von naiven nTregs in CY-behandelte Mäuse diese erhöhte CHS supprimiert werden kann¹⁶².

4.2 Die Bedeutung der nTregs in der Niedrigzonentoleranz

Die Charakterisierung von nTregs in der Niedrigzonentoleranz gegenüber Kontaktallergenen ist Ziel dieser Arbeit. Die NZT ist eine Hapten-spezifische Toleranzreaktion, die durch die epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen eines Kontaktallergens ausgelöst wird^{57,77}.

4.2.1 Die Niedrigzonentoleranz wird durch CD8⁺ iTregs vermittelt

Weitere Arbeiten der Gruppe Steinbrink haben gezeigt, dass für die Induktion der NZT Tc2-CD8⁺ Suppressor-T-Zellen essentiell sind^{77,78}. CD8⁺ T-Zellen können durch ihr Zytokinmuster unter anderem in zwei Populationen unterteilt werden: die IFN- γ - und IL-2-produzierenden Tc1-T-Zellen und die IL-10-, IL-5- und IL-4- sezernierenden Tc2-T-Zellen¹⁶⁴. Während der Effektor-Phase der Toleranz wird sowohl verstärkt IL-4 als auch IL-10 sezerniert⁷⁷ (Abb.7). Nur in CD8⁺ T-Zellen und nicht CD4⁺ T-Zellen aus tolerisierten Mäusen wurde sowohl eine verstärkte IL-4- und IL-10- als auch geringe IFN- γ - und IL-2-Sezernierung nach Auslösen der Entzündungsreaktion gemessen⁵⁷. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine CHS nur unterdrückt werden kann, wenn CD8⁺ T-Zellen vorhanden sind⁷⁷. Auch zeigte Maurer et al., dass CD8⁺ Tc2-Suppressor-T-Zellen durch IL-10, das von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sezerniert wird,

entstehen. Des Weiteren können $CD8^+$ T-Zellen aus tolerisierten Mäusen, transferiert in naive Tiere, eine CHS-Entstehung unterdrücken⁷⁹.

Da die $CD25^+$ T-Zell-Depletion und $CD4^+CD25^+$ Tregs-Reduktion die Toleranzinduktion der NZT verhindert und die CHS-Reaktion verstärkt, ist zu vermuten, dass nTregs während der NZT für die Inhibition der $CD8^+$ Effektor-T-Zellen der CHS und damit für die Verhinderung der allergischen Reaktion notwendig sind. Um zu beweisen, dass nicht nur nTregs in einer NZT die CHS inhibieren, sondern dass nTregs an der Generierung der $CD8^+$ iTregs beteiligt sind, ist durch die adoptiven Transfer Versuche von $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen bestätigt worden. Anhand von Vorversuchen ist bekannt, dass eine NZT gegenüber Kontaktallergenen Hapten-spezifisch durch $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen in naive Mäuse transferiert werden kann⁷⁶⁻⁷⁸. Adoptive Transfer-Versuche von nTregs in dieser Arbeit zeigen, dass die Generierung dieser $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen durch die Depletion von nTregs (durch PC61) beeinträchtigt wird (Abb. 18), da die Übertragung von $CD8^+$ T-Zellen aus $CD25^+$ nTregs depletierten und tolerisierten Mäusen keine Toleranz in den Empfänger-mäusen induzieren können. Schon die Versuche von Kripke und McClendon 1986 zeigten, dass die Suppressor-T-Zellen, die für eine Inhibition der CHS verantwortlich sind, CY-abhängig sind¹⁶⁴. Diese CY-Abhängigkeit kann nun als Abhängigkeit von IL-10-sezernierenden nTregs charakterisiert werden.

Anhand dieser und der hier gewonnen Daten wird deutlich, dass die NZT nur induziert werden kann, wenn $CD8^+$ Tregs in Anwesenheit von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen während der Induktionsphase vorhanden sind (Abb. 12, 15, 17).

4.2.2 Die Rolle von IL-2 in der Niedrigzonentoleranz

IL-2 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vermehrt nach dem Auslösen einer Entzündungsreaktion produziert wird. Auch in der CHS sezernieren $CD8^+$ T-Zellen nach Sensibilisierung vermehrt IL-2⁵⁷ (Abb. 7). IL-2 kann die Aktivierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen fördern, wobei in der CHS durch die IL-2-Induktion $CD8^+$ Effektor-T-Zellen vermehrt aktiviert werden, die eine Entzündungsreaktion verstärken¹⁵⁷. Diese erhöhte T-Zell-Proliferation und IL-2 Sezernierung nach Auslösung einer CHS ist auch in den hier gewonnenen Daten nach Hapten-spezifischen Restimulation der $CD8^+$ T-Zellen zu sehen (Abb. 6 und 7). In der NZT ist IL-2 nur in geringen Mengen vorhanden. Die $CD8^+$ Tregs der NZT produzieren weniger IL-2 nach der Sensibilisierung, was zu einer verringerten T-Zell-Aktivierung führt⁵⁸ (Abb. 6).

IL-2 ist notwendig zur Generierung von nTregs, doch nach Aktivierung wird die IL-2-Sezernierung herunterreguliert, um die Generierung von aktivierten Effektor-T-Zellen zu hemmen^{157,104,165}. Da mit Hilfe von IL-2 eine stärkere Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann¹⁵⁷, ist es nicht verwunderlich, dass nach der Inhibition der CHS IL-2 in geringeren Mengen ausgeschüttet wird⁷⁷ (Abb. 6). Weitere Untersuchungen in Transplantationsmodellen haben gezeigt, dass CD25⁺ T-Zellen für die Anergieentwicklung und IL-2-Regulierung während der Toleranzinduktion notwendig sind, jedoch nicht mehr für die Aufrechterhaltung dieser Toleranzreaktion¹⁶⁶. Ob nun wirklich vermehrt IL-2 während der Induktionsphase der NZT ausgeschüttet wird, um die Aktivierung von Tregs zu unterstützen, ist noch nicht untersucht worden, aber anzunehmen.

4.2.2 Die Induktion der Niedrigzonentoleranz ist IL-10-abhängig

Das die NZT IL-10 abhängig ist, zeigt sich dadurch, dass in IL-10-defizienten Mäusen keine NZT induziert werden kann⁷⁹. Nur nach Rekonstitution von IL-10 sezernierenden CD4⁺ T-Zellen während der Induktions-Phase der NZT kann die Toleranzreaktion gegenüber einem Kontaktallergen wiederhergestellt werden⁷⁹. Auch in anderen Toleranz-Modellen produzieren nTregs IL-10 zur Inhibition von Allergien und Autoimmunkrankheiten^{167,168}.

Patienten, die eine atopische Dermatitis aufweisen, haben eine verringerte Anzahl an CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen und IL-10-Sezernierung in den betroffenen Hautstellen¹⁶⁹. Die Suppression der Effektor-T-Zellen wird abgeschwächt und die betroffenen Hautstellen werden von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen infiltriert und die Allergie ausgelöst¹⁷⁰. Wie in dieser Arbeit beschrieben, wird im NZT-Modell nach Unterdrückung der CHS vermehrt IL-10 sezerniert (Abb. 7). Auch Maurer et al., konnten zeigen, dass dieses IL-10 von CD4⁺ T-Zellen gebildet wird⁷⁷⁻⁷⁹.

Weiter wird die IL-10-Abhängigkeit in Autoimmunkrankheiten beschrieben. Wie in der NZT supprimieren in der rheumatischen Arthritis IL-10-sezernierenden nTregs die Immunantwort¹⁷¹. Bei der rheumatischen Arthritis und in der CHS zeigen IL-10-defiziente Mäuse eine erhöhte Immunreaktion^{79,172}. Eine Arthritis wird abgeschwächt durch die Gabe von IL-10, die die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert, dadurch die Funktion der APZs herunterreguliert und die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung hemmt¹⁷³.

Anhand einer durchflusszytometrischen Untersuchung wurde die Anzahl der nTregs während den verschiedenen Phasen der NZT beobachtet. Da gezeigt worden ist, dass während der Induktions-Phase vermehrt IL-10 von nTregs produziert wird (unveröffentlichte Daten), wird

eine erhöhte Anzahl von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs nach Tolerisierung erwartet. Weiterhin wird eine gleiche Anzahl der nTregs nach Sensibilisierung und Auslösung der Entzündungsreaktion angenommen, da in dieser Zeit die Rolle von IL-10 sezernierende $CD4^+$ T-Zellen ausgeschlossen wurde⁷⁹.

Die durchflusszytometrischen Daten in dieser Arbeit zeigen dagegen, dass in der NZT während keiner Phase die Anzahl der nTregs erhöht ist (Abb. 6). Während der Induktions-Phase der NZT scheinen nicht vermehrt nTregs induziert zu werden, sondern diese nur vermehrt IL-10 während der Induktions-Phase nach Aktivierung zu sezernieren. Die gleiche Anzahl der nTregs während der Effektor-Phase (Sensibilisierung und Auslösen der Entzündungsreaktion) kann sich darauf zurückführen lassen, dass während dieser Phase keine $CD4^+$ T-Zellen, also auch nTregs, notwendig sind zur Inhibition der CHS⁷⁹.

Ob eine Subpopulation der nTregs für die IL-10-Sezernierung zuständig ist, muss durch weitere Charakterisierung der nTregs, z.B. durch Oberflächenmoleküle wie CTLA-4 untersucht werden. Somit können wir zeigen, dass in der NZT die Anzahl der nTregs gleichbleibend ist, sich aber wahrscheinlich in der Funktion unterscheiden müssen. Dies ist bereits in Patienten mit multipler Sklerose, bei der auch die Anzahl der nTregs gleich bleibt, aber die nTregs der erkrankten Patienten eine inaktivierte Funktion haben beobachtet worden¹⁴⁸. Die Arbeitsgruppe hat weiter zeigen können, dass die isolierten nTregs aus den Patienten keine aktivierten $CD25^+$ T-Zellen sind und dadurch eine T-Zell-Aktivierung nicht hemmen¹⁵².

4.2.3 Die Rolle $CD4^+CD25^+$ T-Zellen für die NZT

Da aktivierte $CD4^+$ T-Zellen und nTregs $CD25^+$ auf der Oberfläche exprimieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob aktivierte $CD4^+$ T-Zellen oder nTregs während der Induktions-Phase der NZT wichtig sind. Dies wurde in dieser Arbeit anhand der *in-vivo* und *in-vitro* Daten einer nTregs-Depletion und -Reduktion im NZT-Modell genauer untersucht (Abb. 11 und 14).

Mittels Literaturrecherche wurde nach Methoden zur temporären Depletion und Reduktion von nTregs gesucht. Für die Versuche in dem hier beschriebenen Toleranz-Modell wurden einerseits durch einen anti- $CD25$ Antikörper (PC61)¹⁷⁴ die Anzahl der nTregs depletiert und durch Gabe eines Chemotherapeutikum Cyclophosphamid (CY)¹³² die Anzahl der nTregs reduziert und in ihrer Aktivität eingeschränkt.

Alle nTregs exprimieren die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), aber nicht alle $CD25^+$ T-Zellen gehören zur Population der nTregs. CD25 wird sowohl auf den Vorläufern als auch aktivierten T-Zellen und B-Zellen exprimiert^{175,176}. IL-2 alleine gebunden an CD25 ist nur von niedriger Affinität. Nur wenn die weiteren Ketten des IL-2 Rezeptors (β : CD122 und γ : CD132) an CD25 bindet, bildet sich ein Heterodimer und es entsteht eine hohe Affinität zwischen CD25 und IL-2¹⁷⁷.

Nach anfänglichen kontroversen Diskussionen, ob der Antikörper PC61 $CD25^+FOXP3^+$ nTregs depletiert oder diese nur funktionell inaktiviert, ist gezeigt worden, dass PC61 zu einer starken Reduktion von $CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen führt, aber zu keiner Erhöhung der $CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen und dass der Antikörper 7D4 die $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs in ihrer Funktion beeinträchtigt^{174,178}.

Im Rahmen der NZT-Versuche sollten zunächst $CD25^+FOXP3^+$ T-Zellen möglichst vollständig depletiert und nicht nur in der Funktion beeinträchtigt werden, weshalb der Antikörper PC61 verwendet worden ist. Durch durchflusszytometrische Kontrollen (Abb. 10) in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach zweimaliger PC61-Gabe von je 75 μ g/Maus die $CD25^+$ T-Zellen in den Lymphknoten schon am dritten Tag stark depletiert werden. Nach weiterer Charakterisierung der $CD25^+$ T-Zellen ist eine Depletion der $CD4^+CD25^+$ und auch der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs-Population drei Tage nach zweimaliger Injektion zu beobachten. Diese Depletion ist nur von limitierter Dauer, da schon am Tag 28 die Zell-Populationen wieder auf ihre Anfangszahlen ansteigen.

Eine Tumorentwicklung kann durch nTregs begünstigt werden. Deshalb wird in der Krebstherapie das Chemotherapeutikum CY verwendet, da CY nicht nur die Anzahl der $CD4^+CD25^+$ nTregs reduziert, sondern auch die suppressiven Eigenschaften dieser nTregs inhibiert¹³². Die vielseitige Wirkung von CY wird dadurch gezeigt, dass CY-sensitive T-Zellen auch die Generierung von antigenspezifischen cytotoxischen T-Zellen verhindern können¹⁷⁹. Wegen dieser temporären supprimierenden Eigenschaften von CY wird es zur Vorbeugung bei Graft-versus-Host Erkrankungen nach Knochenmarks- und Organtransplantation gegeben, um eine Abstoßung zu vermeiden. Vor allem wird CY auch als Chemotherapeutikum bei Lymphomen oder bei Autoimmunerkrankungen verwendet¹⁸⁰⁻¹⁸³.

CY selber wirkt zytotoxisch auf schnell proliferierende Zellen und da nTregs eine höhere Proliferationsrate haben als aktivierte $CD4^+$ Effektor-T-Zellen scheinen nTregs nach CY-Gabe vermehrt in Apoptose getrieben zu werden¹⁸⁴. Auch in den durchflusszytometrischen Kontrollen dieser Arbeit (Abb. 13) wird nach einmaliger Gabe von CY die Anzahl der

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nTregs reduziert. Die Anzahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen dagegen zeigen keine großen Unterschiede. Auch die Wirkung von CY ist, wie die Gabe des Antikörpers PC61, nur von limitierter Dauer. Die Wirkung von CY dauert nach Verwendung unserer Protokolle nur sieben Tage, bei Verwendung des Antikörper PC61 28 Tage.

Um zu untersuchen, ob nTregs während der Induktions-Phase der Toleranz beteiligt sind, wurden die nTregs nur während der Induktions-Phase depletiert bzw. reduziert. Im Gegensatz zur PC61-Gabe werden mittels CY die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nur zum Teil depletiert, aber auch in ihrer Funktion eingeschränkt^{131,132}.

In beiden Versuchsabläufen (Abb. 9 und 12) wurde nach Depletion oder Reduktion von nTregs eine deutlich ausgeprägte CHS-Reaktion und daher eine Inhibition der NZT gegenüber dem Antigen gemessen. Die Ergebnisse der resultierenden Immunantwort (anhand von Ohrschwellung, T-Zell-Proliferation und T-Zell-Zytokinproduktion) ist in beiden Versuchsansätzen fast nahezu identisch. Die eigentliche Toleranzinduktion durch subimmunogene Dosen des Kontaktallergens nach PC61- oder CY-Gabe zeigt sogar eine erhöhte Immunreaktion im Vergleich zu den Mäusen, die nur sensibilisiert worden sind. Besonders auffällig waren hier die *in-vivo* erhöhten Ohrschwelldaten, doch auch *in-vitro* (T-Zell Proliferation und Zytokinausschüttung) kann eine verstärkter Immunantwort gemessen werden.

Obwohl anhand *in-vivo* Ohrschwellung und *in-vitro* T-Zell-Proliferation der hier untersuchten Gruppen eine eindeutige erhöhte Immunreaktion in den eigentlich tolerisierten Mäusen nach PC61- oder CY-Gabe gemessen wird, ist diese Überreaktion in der Zytokinproduktion für die Zytokine IFN- γ und IL-2 nicht so deutlich. Die Zytokine der depletierten und reduzierten Gruppen weisen keine erhöhten sondern eine ähnlich hohe Zytokinproduktion der CHS-Kontrollgruppen auf. Ähnlich zeigt auch Quinn et al., dass die IL-2- und IFN- γ - Sezernierung in PC61-depletierten Mäusen in einem Tuberkulose-Modell im Gegensatz zu den Kontrollen nur leicht signifikant erhöht ist¹⁸⁵.

Ob im NZT-Modell gegenüber Kontaktallergenen durch die Depletion und Reduktion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen die Dosis für eine Sensibilisierung herabgesetzt wird und die Mäuse während der eigentlichen Tolerisierung mehrmals sensibilisiert worden wären, ist noch zu untersuchen. In einem anderen Allergietyp-Modell, Typ I, hat die Arbeitsgruppe von van Wijk et al., gezeigt, dass, gemessen anhand der Mastzelldegranulation, die Depletion der nTregs mit anschließender Tolerisierung durch subimmunogene Dosen des Allergens nicht ausreicht, um eine Sensibilisierung in den Mäusen hervorzurufen. Weiterhin hat diese Arbeitsgruppe

gezeigt, dass $CD4^+CD25^+$ Tregs essentiell für die Toleranzinduktion gegenüber oral eingenommenen Antigenen und Regulierung der Intensität der Entzündungsreaktion sind, aber $CD4^+CD25^+$ Tregs nicht notwendig für das Auslösen der Entzündungsreaktion sind³⁸.

Diese Ergebnisse und die gewonnenen Beobachtungen der Depletion mit PC61 und Reduktion durch CY-Gabe zeigen, dass für die Generierung von $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ nTregs notwendig sind.

4.2.4 Die suppressive Funktion von nTregs der NZT ist Hapten-unspezifisch

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur durch $CD8^+$ Suppressor T-Zellen, sondern auch durch $CD4^+CD25^+$ Tregs die NZT übertragen werden kann. Die $CD8^+$ T-Zellen sind in der Lage, den Toleranzeffekt Hapten-spezifisch zu transferieren⁵⁷. Im Gegensatz zu den $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen konnten wir jedoch keinen Hapten-spezifischen Toleranzeffekt nach Transfer von $CD4^+CD25^+$ Tregs beobachten, da nach Überprüfung der Toleranz durch Sensibilisierung mit einem zweiten Kontaktallergen, das nicht für die Toleranzinduktion verwendet wurde, auch eine Toleranzreaktion nachweisbar war.

In der heutigen Literatur existieren diverse Daten zur Antigenspezifität von nTregs. Beweise der Antigenspezifität zeigen Mausmodelle verschiedener Autoimmunkrankheiten, bei denen beschrieben wird, dass nTregs antigenspezifisch aktiviert werden und eine antigenspezifische Wirkung haben¹⁸⁶. In den Arbeiten von Yoshiki et al., wurde aus Haut nach Sensibilisierung nTregs gewonnen, und nach Transfer der Zellen in naive Mäuse konnte nur die CHS supprimiert werden, die durch dasselbe Hapten ausgelöst wurde, mit dem die Spenderhaut sensibilisiert wurde¹⁸⁶.

In der UV-Toleranz wurde gezeigt, dass nach Immunisierung auf UV-bestrahlter Haut nTregs nur die CHS-Reaktion inhibieren können, die durch das immunisierende Hapten ausgelöst wird. Eine CHS, bedingt durch ein zweites Hapten, konnte nicht inhibiert werden¹⁸⁷. Auch Dubois et al., hat die Haptenspezifität der nTregs im Modell der oralen Toleranz beschrieben: nTregs inhibieren die Hapten-spezifische $CD8^+$ T-Zell Proliferation⁵⁶.

Andererseits existieren auch Publikationen, die CHS-Mausmodellen untersuchen, die die unspezifische Funktion von nTregs belegen. Hier wurden in naive Mäusen naive nTregs vor dem Auslösen einer Entzündungsreaktion transferiert, die die darauffolgende CHS-Entstehung inhibieren^{155,188}. Die antigenunspezifische Supprimierung lässt sich eventuell daraus erklären, dass nTregs mit suppressiven Eigenschaften als eigenständige Subpopulation von T-Zellen im

Thymus vor Erstkontakt mit dem Antigen gebildet werden. Dagegen werden iTregs erst nach dem Kontakt mit einem Antigen induziert¹⁸⁹.

In einem Autoimmun-Gastritis-Modell wurde beschrieben, dass nTregs antigenunspezifisch die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen inhibieren, aber dafür eine Aktivierung der nTregs durch Zytokine der Effektor-T-Zellen notwendig ist¹⁹⁰. Diese unspezifische Funktion wurde durch die schon vorhandenen aktiven nTregs erklärt, die als Erste auf die Anwesenheit der Effektor-T-Zellen reagieren und damit eine Autoimmunität durch die Induktion von suppressiven T-Zellen verhindern¹⁹⁰.

Die unspezifische Wirkung der nTregs im NZT-Modell dieser Arbeit kann daraus resultieren, dass nTregs aktiviert wurden und darüberhinaus IL-10 produziert haben. Zur Induktion der hapten-spezifischen CD8⁺ Tregs müssen jedoch noch weitere Immunreaktionen, induziert durch APZs, ablaufen. Weiterhin ist es aber möglich, dass die aktivierten nTregs keine NZT induzieren, sondern nur eine CHS unterdrücken.

Anhand der durchflusszytometrischen Daten sind nicht vermehrt nTregs induziert worden, aber möglicherweise sezernieren die vorhandenen nTregs vermehrt IL-10. Um dies weiter zu untersuchen, sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Zum einen sollen nicht-aktivierte nTregs aus naiven Mäusen transferiert werden, um zu testen, ob auch eine erhöhte Anzahl der nTregs ausreicht, um eine CHS zu unterdrücken. Zum anderen sollte untersucht werden, ob CD4⁺CD25⁺ nach Sensibilisierung in der Lage sind, eine CHS zu inhibieren.

4.3 nTregs in anderen Toleranz-Modellen

Ob die hier gewonnenen Daten der NZT auch auf andere Toleranz Modelle übertragbar sind, ist noch nicht untersucht worden. Doch gibt es bereits mehrere Publikationen, die einer Rolle der nTregs in weiteren Toleranz-Modellen beschreibt. Die möglichen Diskrepanzen der verschiedenen Toleranzmechanismen lassen sich durch die verschiedenen immunologischen Mechanismen erklären, die durch die Menge, aber auch die Art des verwendeten Allergens beeinflusst werden.

4.3.1 nTregs in der oralen Toleranz

Das bekannteste und am besten untersuchte Modell einer peripheren Toleranzreaktion ist die orale Toleranz gegenüber Protein/Peptid-Allergenen. Eine orale Toleranz kann sowohl durch hohe als auch niedrigen Gaben induziert werden⁴⁰⁻⁴². Die Gabe des Allergens in hohen Dosen vor der Sensibilisierung resultiert in einer Anergie oder Depletion der reaktiven T-Zellen^{40,41}. Die Gabe von niedrigen Dosen des Allergens induziert dagegen eine aktive Suppression durch

Tregs, bei der verschiedene Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-4 beteiligt sein können⁴⁷. Hierbei spielen iTregs wie Th3- als auch Tr1-Zellen eine wichtige Rolle. Doch auch nTregs werden durch die Produktion von TGF- β , das durch die Sekretion von IL-10 der Tr1-Zellen ausgeschüttet wird, angeregt. TGF- β ist wiederum für die Expressierung von FOXP3 und die supprimierende Funktion von nTregs notwendig^{48,192}.

In einem Mausmodell gegenüber Haptenen von Dubois et al., ist bereits gezeigt worden, dass nach einmaliger Gabe von hohen Mengen DNFB CD4⁺ T-Zell-defiziente Mäuse nicht oral toleriert werden können. Doch nach Transfer von nTregs vor einer Sensibilisierung kann eine IL-10-unabhängige Toleranz hervorgerufen werden. Die Toleranzinduktion wird durch Inhibierung der Entstehung von Hapten-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verursacht⁵⁶. Des Weiteren ist im murinen Modell der oralen Toleranz gegenüber Nickel die Toleranzantwort IL-10-abhängig, wird aber durch natürliche Killer-Zellen vermittelt. Die anschließend induzierten nTregs sind für die Suppression der Allergie gegenüber Nickel nicht mehr abhängig von der Anwesenheit der natürlichen Killer-Zellen^{192,193}.

Weitere Unterschiede der Dosisabhängigkeit im oralen Toleranzmodell sind durch Seidel-Guyenot et al. charakterisiert worden. Hier wurde gezeigt, dass im Modell der oralen Toleranz durch die Applikation von subimmunogenen Dosen des Kontaktallergens TNCB der Toleranzeffekt IL-10-abhängig und durch CD8⁺ Suppressor-T-Zellen übertragbar ist⁵⁷. Diese Daten korrelieren mit den bereits erworbenen Daten der epikutan induzierte NZT gegenüber Haptenen^{77,79}. Da auch die in dieser Arbeit untersuchte epikutan induzierten NZT IL-10-abhängig und durch CD8⁺ T-Zellen übertragbar ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch in der oralen NZT gegenüber Haptenen IL-10-sezernierenden nTregs die Generierung der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen induzieren und ob eine Toleranz durch nTregs haptenunspezifisch übertragbar ist.

4.3.2 nTregs in der UVB-Toleranz

Ein weiteres gut beschriebenes Toleranzmodell ist die Toleranz induziert durch UVB-Bestrahlung. Diese kann sowohl einen lokalen als auch systemischen Toleranzeffekt induzieren. Durch niedrige Dosen der UV-Bestrahlung entsteht eine lokal verminderte CHS-Antwort, die als Resultat einer lokalen Toleranz entsteht⁶⁰. Auch durch hohe UVB-Dosen wird die Entwicklung einer CHS verhindert. Diese Bestrahlung führt jedoch zu einer systemischen Immuntoleranz⁶³.

Am besten charakterisiert sind die nTregs in der UVB-Toleranz gegenüber Kontaktallergenen,

die durch niedrige Bestrahlung ausgelöst wird. Anhand adoptiver Transferversuche sowie Depletionsversuchen werden auch in der UVB-Toleranz Tregs als essentiell beschrieben¹⁹⁴. Bei einer lokalen Toleranzinduktion nach geringer UVB-Bestrahlung ist die Funktion der Langerhans Zelle beeinträchtigt und diese Suppression IL-10-abhängig⁶¹. Das Auslösen einer CHS durch Haptene nach einer geringen UVB-Bestrahlung zeigt, dass eine andauernde Toleranz induziert werden kann, die Hapten-spezifisch ist^{195,196}. Weiterhin kann die erworbene Toleranz durch Lymphknoten-Zellen adoptiv in naive Mäuse transferiert werden¹⁹⁷. Diese Hapten-spezifische Toleranz wird durch CD4⁺ IL-10-sezernierende Suppressor-T-Zellen vermittelt¹³⁵.

In den weiteren Daten von Schwarz et al. werden CTLA-4⁺CD4⁺T -Zellen eine wichtige Rolle in der systemischen Toleranzinduktion zugesprochen. In diesen Versuchen wurde gezeigt, dass CTLA-4⁺CD4⁺T-Zellen aus toleranten Mäusen vermehrt IL-10, TGF- β und IFN- γ sezernieren. Dies lässt darauf schließen, dass durch Tr1 Tregs eine UVB-vermittelte Toleranz durch IL-10 sezernierende T-Zellen transferiert werden kann⁷⁴.

Die Ergebnisse, dass Langerhans Zellen eine Rolle in der durch UV-vermittelten Toleranz spielen deutet auf verschiedenen Mechanismen der NZT- und UV-induzierten Toleranz. Doch könnten ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen, da die Toleranzinduktion IL-10-abhängig ist.

5. Zusammenfassung

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine der häufigsten Berufserkrankungen, die durch die Exposition mit hohen Mengen eines Kontaktallergens ausgelöst wird. In Mausmodellen sehen wir, dass mittels einer Niedrigzonentoleranz (NZT) die Bildung einer Kontaktsensibilisierung unterdrückt werden kann. Bei der NZT führt die epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen zu einer systemischen Toleranzentwicklung, die durch $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen Hapten-spezifisch vermittelt wird. Für die Generierung dieser $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen sind IL-10-sezernierende $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (Tregs) notwendig. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob natürlichen Tregs (nTregs) bei der NZT eine Rolle spielen und die Funktion und Aufgaben dieser Zellen während der NZT untersucht werden.

Wir konnten keine erhöhte Anzahl von nTregs während der Niedrigzonentoleranz gegenüber Kontaktallergenen im Vergleich zur CHS charakterisieren. Weiterhin haben wir gezeigt, dass eine Reduktion der nTregs durch Depletion mittels anti-CD25-Antikörper oder durch Cyclophosphamid-Gabe die Entstehung der $CD8^+$ Suppressor-T-Zellen der NZT unterdrückt und damit die Entwicklung der Toleranzreaktion verhindert wird. Ferner wurde beobachtet, dass eine epikutane NZT Hapten-spezifisch durch $CD8^+$ T-Zellen übertragen werden kann, während $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eine Hapten-unspezifische Wirkung zeigten.

6. Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., P. Travers and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, USA, pp. 555-556.
2. Murphy, K., P. Travers and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, USA, pp. 587-588.
3. Lushniak, B. D. 2003. The importance of occupational skin diseases in the United States. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76:325.
4. Rycroft, R. J., and V. S. Neild. 1992. Allergic contact dermatitis from MCI/MI biocide in a printer. *Contact Dermatitis* 26:142.
5. Saint-Mezard, P., A. Rosieres, M. Krasteva, F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 2004. Allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 14:284.
6. Gocinski, B. L., and R. E. Tigelaar. 1990. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144:4121.
7. Kripke, M. L., C. G. Munn, A. Jeevan, J. M. Tang, and C. Bucana. 1990. Evidence that cutaneous Antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* 145:2833.
8. Murphy, K., P. Travers and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, USA, pp. 736-737.
9. Saint-Mezard, P., F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 2004. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 14:131.
10. Bursch, L. S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. H. Kaplan, and K. A. Hogquist. 2007. Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:3147.
11. Lepoittevin, J.P., Basketter, D.A., Goossens, A. and Karlberg, A.T., Editors, 1997. *Allergic Contact Dermatitis*, Springer, New York, pp. 68–80.
12. Watanabe, T., M. Yoshida, Y. Shirai, M. Yamori, H. Yagita, T. Itoh, T. Chiba, T. Kita, and Y. Wakatsuki. 2002. Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.* 168:2188.
13. Gorbachev, A. V., P. S. Heeger, and R. L. Fairchild. 2001. CD4⁺ and CD8⁺ T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *J. Immunol.* 166:2323.
14. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J. L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J. P. Revillard, and J. F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted

- CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 25:3006.
15. Xu, H., N. A. DiIulio, and R. L. Fairchild. 1996. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 183:1001.
 16. Pease, J. E., and T. J. Williams. 2006. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:305.
 17. He, D., L. Wu, H. K. Kim, H. Li, C. A. Elmetts, and H. Xu. 2006. CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol.* 177:6852.
 18. Zhu, J., T. S. Davidson, G. Wei, D. Jankovic, K. Cui, D. E. Schones, L. Guo, K. Zhao, E. M. Shevach, and W. E. Paul. 2009. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103⁺ inducible regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206:329.
 19. Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiyama, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, K. Sudo, S. Nakae, C. Sasakawa, and Y. Iwakura. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity.* 30:108.
 20. Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 17:375.
 21. Guo, S., D. Cobb, and R. B. Smeltz. 2009. T-bet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4⁺ Th17 cells in a T cell-intrinsic manner. *J. Immunol.* 182:6179.
 22. Seidel-Guyenot, W., R. Alt, S. Perschon, J. Knop, and K. Steinbrink. 2004. B cells are not required for T cell priming in low zone tolerance to contact allergens and contact hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 34:3082.
 23. Mariathasan, S., R. G. Jones, and P. S. Ohashi. 1999. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin. Immunol.* 11:263.
 24. Mariathasan, S., S. S. Ho, A. Zakarian, and P. S. Ohashi. 2000. Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur. J. Immunol.* 30:1060.
 25. Jameson, S. C., and M. J. Bevan. 1998. T-cell selection. *Curr. Opin. Immunol.* 10:214.
 26. Stefanski, H. E., D. Mayerova, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2001. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* 166:6602.
 27. Utting, O., S. J. Teh, and H. S. Teh. 1998. T cells expressing receptors of different affinity for antigen ligands reveal a unique role for p59fyn in T cell development and optimal stimulation of T cells by antigen. *J. Immunol.* 160:5410.

28. Murphy, K., P. Travers and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, USA, pp. 602-603.
29. Jenkins, M. K., and R. H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302.
30. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21:305.
31. Friedline, R. H., D. S. Brown, H. Nguyen, H. Kornfeld, J. Lee, Y. Zhang, M. Appleby, S. D. Der, J. Kang, and C. A. Chambers. 2009. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med.* 206:421.
32. Van Parijs, L., A. Biuckians, A. Ibragimov, F. W. Alt, D. M. Willerford, and A. K. Abbas. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R α)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J. Immunol.* 158:3738-3745.
33. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3:745.
34. Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237.
35. Akdis, M., K. Blaser, and C. A. Akdis. 2005. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:961.
36. Goleva, E., I. D. Cardona, L. S. Ou, and D. Y. Leung. 2005. Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:1094.
37. Smith, T. R., and V. Kumar. 2008. Revival of CD8⁺ Tregs-mediated suppression. *Trends Immunol.* 29:337.
38. van Wijk, F., and L. Knippels. 2007. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.* 61:8.
39. Weiner, H. L. 2000. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest* 106:935.
40. Friedman, A., and H. L. Weiner. 1994. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:6688.
41. Mowat, A. M., S. Strobel, H. E. Drummond, and A. Ferguson. 1982. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology* 45:105.
42. Weiner, H. L., A. Friedman, A. Miller, S. J. Khoury, A. al Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R. B. Nussenblatt, D. E. Trentham, and D. A. Hafler. 1994. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 12:809.

43. Zhang, Z. J., L. Davidson, G. Eisenbarth, and H. L. Weiner. 1991. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:10252.
44. Melamed, D., and A. Friedman. 1993. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.* 23:935.
45. Whitacre, C. C., I. E. Gienapp, A. Meyer, K. L. Cox, and N. Javed. 1996. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 778:217.
46. Miller, A., O. Lider, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and H. L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:421.
47. Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 206:232.
48. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H. L. Weiner. 2003. CD4⁺. *J. Immunol.* 170:2516.
49. Shevach, E. M., D. Q. Tran, T. S. Davidson, and J. Andersson. 2008. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 38:915.
50. Fujihashi, K., T. Dohi, P. D. Rennert, M. Yamamoto, T. Koga, H. Kiyono, and J. R. McGhee. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:3310.
51. Fairchild, R. L., and J. W. Moorhead. 1991. Soluble factors in tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. X. IL-2 is the activation signal mediating release of synthesized suppressor factor. *Cell Immunol.* 133:147.
52. Claman, H. N. 1976. Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. V. Induction of tolerance with DNP compounds and with free and membrane-associated DNFB. *J. Immunol.* 116:704.
53. Gautam, S. C., and J. R. Battisto. 1989. Feeding trinitrochlorobenzene inhibits development of hapten-specific cytotoxic T lymphocytes by interfering with helper T-cell function. *Reg Immunol.* 2:33.
54. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737.
55. Desvignes, C., N. Etchart, J. Kehren, I. Akiba, J. F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 2000. Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8⁺ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 164:2515.

56. Dubois, B., L. Chapat, A. Goubier, M. Papiernik, J. F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 2003. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 102:3295.
57. Seidel-Guyenot, W., S. Perschon, N. Dechant, R. Alt, J. Knop, and K. Steinbrink. 2006. Low zone tolerance induced by systemic application of allergens inhibits Tc1-mediated skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:1170.
58. Valenti, R., V. Huber, P. Filipazzi, L. Pilla, G. Sovenia, A. Villa, A. Corbelli, S. Fais, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 2006. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* 66:9290.
59. Enk, A. 1996. Dendritic cells--a new weapon in therapy of melanoma?. *Hautarzt* 47:488.
60. Weiss, J. M., A. C. Renkl, R. W. Denfeld, R. R. de, M. Spitzlei, E. Schopf, and J. C. Simon. 1995. Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 25:2858.
61. Dittmar, H. C., J. M. Weiss, C. C. Termeer, R. W. Denfeld, M. B. Wanner, L. Skov, J. N. Barker, E. Schopf, O. Baadsgaard, and J. C. Simon. 1999. In vivo UVA-1 and UVB irradiation differentially perturbs the antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells. *J. Invest Dermatol.* 112:322.
62. Ito, M., Y. Minamiya, H. Kawai, S. Saito, H. Saito, T. Nakagawa, K. Imai, M. Hirokawa, and J. Ogawa. 2006. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J. Immunol.* 176:5637.
63. Beissert, S., and T. Schwarz. 1999. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4:61.
64. Ullrich, S. E., and D. A. Schmitt. 2000. The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression. *J. Dermatol. Sci.* 23 Suppl 1:S10-S12.
65. Aberer, W., G. Schuler, G. Stingl, H. Honigsmann, and K. Wolff. 1981. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J. Invest Dermatol.* 76:202.
66. Kripke, M. L. 1977. Ultraviolet radiation and tumor immunity. *J. Reticuloendothel. Soc.* 22:217.
67. DeFabo, E. C., and M. L. Kripke. 1979. Dose-response characteristics of immunologic unresponsiveness to UV-induced tumors produced by UV irradiation of mice. *Photochem. Photobiol.* 30:385.
68. Alard, P., I. Kurimoto, H. Niizeki, J. M. Doherty, and J. W. Streilein. 2001. hapten-specific tolerance induced by acute, low-dose ultraviolet B radiation of skin requires mast cell degranulation. *Eur. J. Immunol.* 31:1736
69. Noonan, F. P., E. C. De Fabo, and M. L. Kripke. 1981. Suppression of contact hypersensitivity by UV radiation and its relationship to UV-induced suppression of tumor immunity. *Photochem. Photobiol.* 34:683.

70. Morison, W. L., C. Bucana, and M. L. Kripke. 1984. Systemic suppression of contact hypersensitivity by UVB radiation is unrelated to the UVB-induced alterations in the morphology and number of Langerhans cells. *Immunology* 52:299.
71. Schwarz, A., A. Maeda, and T. Schwarz. 2007. Alteration of the migratory behavior of UV-induced regulatory T cells by tissue-specific dendritic cells. *J. Immunol.* 178:877.
72. Walterscheid, J. P., D. X. Nghiem, and S. E. Ullrich. 2002. Determining the role of cytokines in UV-induced immunomodulation. *Methods* 28:71.
73. Schwarz, T. 2005. Regulatory T cells induced by ultraviolet radiation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:187.
74. Schwarz, A., S. Beissert, K. Grosse-Heitmeyer, M. Gunzer, J. A. Bluestone, S. Grabbe, and T. Schwarz. 2000. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J. Immunol.* 165:1824.
75. Maeda, A., A. Schwarz, K. Kernebeck, N. Gross, Y. Aragane, D. Peritt, and T. Schwarz. 2005. Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *J. Immunol.* 174:5968.
76. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634.
77. Steinbrink, K., C. Sorg, and E. Macher. 1996. Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8+ T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 183:759.
78. Steinbrink, K., G. Kolde, C. Sorg, and E. Macher. 1996. Induction of low zone tolerance to contact allergens in mice does not require functional Langerhans cells. *J. Invest Dermatol.* 107:243.
79. Maurer, M., W. Seidel-Guyenot, M. Metz, J. Knop, and K. Steinbrink. 2003. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J. Clin. Invest* 112:432.
80. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22:329.
81. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6:345.
82. von, Boehmer. H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6:338.
83. Stassen, M., H. Jonuleit, C. Muller, M. Klein, C. Richter, T. Bopp, S. Schmitt, and E. Schmitt. 2004. Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J. Immunol.* 173:267.

84. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182:18.
85. Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2004. The role of regulatory T cells in allergy. *Springer Semin. Immunopathol.* 25:295.
86. Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders, and F. Powrie. 2003. CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197:111.
87. Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R. H. Dekruffy. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* 3:715.
88. Perez-Machado, M. A., P. Ashwood, M. A. Thomson, F. Latcham, R. Sim, J. A. Walker-Smith, and S. H. Murch. 2003. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur. J. Immunol.* 33:2307.
89. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608.
90. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 199:1567.
91. Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 5:271.
92. Lin, W., N. Truong, W. J. Grossman, D. Haribhai, C. B. Williams, J. Wang, M. G. Martin, and T. A. Chatila. 2005. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:1106.
93. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20.
94. Curotto de Lafaille, M. A., S. Muriglan, M. J. Sunshine, Y. Lei, N. Kutchukhidze, G. C. Furtado, A. K. Wensky, D. Olivares-Villagomez, and J. J. Lafaille. 2001. Hyperimmunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 194:1349.
95. Ring, S., S. C. Schafer, K. Mahnke, H. A. Lehr, and A. H. Enk. 2006. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* 36:2981.

96. Vocanson, M., A. Hennino, M. Cluzel-Tailhardat, P. Saint-Mezard, J. Benetiere, C. Chavagnac, F. Berard, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 2006. CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J. Invest Dermatol.* 126:815.
97. Cavani, A., F. Nasorri, C. Prezzi, S. Sebastiani, C. Albanesi, and G. Girolomoni. 2000. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J. Invest Dermatol.* 114:295.
98. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753.
99. Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389.
100. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162:5317.
101. Seddon, B. 2000. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: generation, specificity and mode of action. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 48:339.
102. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723.
103. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903.
104. 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.
105. Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 167:1137.
106. Shevach, E. M., R. S. McHugh, C. A. Piccirillo, and A. M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 182:58.
107. Bala, K. K., and K. D. Moudgil. 2006. Induction and maintenance of self tolerance: the role of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 54:307.
108. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183.
109. 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.

110. Almeida, A. R., B. Rocha, A. A. Freitas, and C. Tanchot. 2005. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 17:239.
111. Papiernik, M., M. L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.* 10:371.
112. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188:287.
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.
114. Malek, T. R., and A. L. Bayer. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4:665.
115. Valzasina, B., C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A. D. Weinberg, and M. P. Colombo. 2005. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 105:2845.
116. Zheng, Y., C. N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K. I. Mead, and D. M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:2778.
117. Stephens, G. L., R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins, and E. M. Shevach. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* 173:5008.
118. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057.
119. Ziegler SF. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24:209
120. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68.
121. Adler, H. S., and K. Steinbrink. 2007. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur. J. Dermatol.* 17:476.
122. Taylor, J. J., M. Mohrs, and E. J. Pearce. 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J. Immunol.* 176:5839.

123. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182:68.
124. Buckner, J. H., and S. F. Ziegler. 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* 6:215.
125. Weiner, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes. Infect.* 3:947.
126. Adler, H. S., and K. Steinbrink. 2008. MAP kinase p38 and its relation to T cell anergy and suppressor function of regulatory T cells. *Cell Cycle* 7:169.
127. Adler, H. S., S. Kubsch, E. Graulich, S. Ludwig, J. Knop, and K. Steinbrink. 2007. Activation of MAP kinase p38 is critical for the cell-cycle-controlled suppressor function of regulatory T cells. *Blood* 109:4351.
128. Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99:2468.
129. Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159:4772.
130. Maloy K.J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2:816
131. Comes, A., O. Rosso, A. M. Orengo, C. E. Di, C. Sorrentino, R. Meazza, T. Piazza, B. Valzasina, P. Nanni, M. P. Colombo, and S. Ferrini. 2006. CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine. *J. Immunol.* 176:1750.
132. Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom, and H. Sabzevari. 2005. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 105:2862.
133. Akdis, C. A., and M. Akdis. 2009. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:735.
134. Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton, and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160:1212.
135. Schwartz, R. H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 6:327.
136. Murphy, K., P. Travers and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, USA, p. 784.
137. Robb, R. J., A. Munck, and K. A. Smith. 1981. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154:1455.

138. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4:337.
139. 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.
140. Fontenot, J. D., and A. Y. Rudensky. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 6:331.
141. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Prohl, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27:18.
142. Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A. M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest* 106:R75-R81.
143. Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S. E. Allan, L. Perroni, F. gna-Bricarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S. F. Ziegler, M. K. Levings, and M. G. Roncarolo. 2006. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest* 116:1713.
144. Walker, M. R., D. J. Kasproicz, V. H. Gersuk, A. Benard, L. M. Van, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J. Clin. Invest* 112:1437.
145. Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:6659.
146. Gallimore, A. M., and A. K. Simon. 2008. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* 27:5886.
147. Belkaid, Y. 2008. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur. J. Immunol.* 38:918.
148. Kinter, A. L., M. Hennessey, A. Bell, S. Kern, Y. Lin, M. Daucher, M. Planta, M. McGlaughlin, R. Jackson, S. F. Ziegler, and A. S. Fauci. 2004. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med.* 200:331.
149. Pereira, L. E., F. Villinger, N. Onlamoon, P. Bryan, A. Cardona, K. Pattanapanyasat, K. Mori, S. Hagen, L. Picker, and A. A. Ansari. 2007. Simian immunodeficiency virus (SIV) infection influences the level and function of regulatory T cells in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* 81:4445.

150. Bolacchi, F., A. Sinistro, C. Ciaprini, F. Demin, M. Capozzi, F. C. Carducci, C. M. Drapeau, G. Rocchi, and A. Bergamini. 2006. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4⁺ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin. Exp. Immunol.* 144:188.
151. Bluestone, J. A., Q. Tang, and C. E. Sedwick. 2008. T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J. Clin. Immunol.* 28:677.
152. Costantino, C. M., C. Baecher-Allan, and D. A. Hafler. 2008. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J. Clin. Immunol.* 28:697.
153. Robinson, M. R., C. C. Chan, J. C. Yang, B. I. Rubin, G. J. Gracia, H. N. Sen, K. G. Csaky, and S. A. Rosenberg. 2004. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma: a new cause of uveitis. *J. Immunother.* 27:478.
154. Cavani, A. 2008. T regulatory cells in contact hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8:294.
155. Gorbachev, A. V., and R. L. Fairchild. 2001. Regulatory role of CD4⁺ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol. Res.* 24:69.
156. Ring, S., S. J. Oliver, B. N. Cronstein, A. H. Enk, and K. Mahnke. 2009. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:1287.
157. Kish, D. D., A. V. Gorbachev, and R. L. Fairchild. 2005. CD8⁺ T cells produce IL-2, which is required for CD(4⁺)CD25⁺ T cell regulation of effector CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.* 78:725.
158. Ring, S., M. Thome, L. Pretsch, A. H. Enk, and K. Mahnke. 2007. Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. *J. Immunol. Methods* 326:10.
159. Schneider, M. A., J. G. Meingassner, M. Lipp, H. D. Moore, and A. Rot. 2007. CCR7 is required for the in vivo function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 204:735.
160. Loser, K., A. Mehling, S. Loeser, J. Apelt, A. Kuhn, S. Grabbe, T. Schwarz, J. M. Penninger, and S. Beissert. 2006. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat. Med.* 12:1372.
161. Frankenberg U, N Lorenz, T Sparwasser, T Jakob, S Martin and K Steinbrink. hapten-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are critical for low zone tolerance to contact allergens and induction of CD8⁺ suppressor T cells. (Manuskript in Vorbereitung).
162. Ikezawa, Y., M. Nakazawa, C. Tamura, K. Takahashi, M. Minami, and Z. Ikezawa. 2005. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *J. Dermatol. Sci.* 39:105.

163. Kripke, M. L., and E. McClendon. 1986. Studies on the role of antigen-presenting cells in the systemic suppression of contact hypersensitivity by UVB radiation. *J. Immunol.* 137:443.
164. Fong, T. A., and T. R. Mosmann. 1990. Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* 144:1744.
165. Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *Eur. J. Immunol.* 34:366.
166. Pan, H., H. M. Lu, W. M. Hu, B. L. Tian, X. B. Liu, Z. D. Zhang, and G. Mai. 2007. Anti-CD25 mAb, anti-IL2 mAb, and IL2 block tolerance induction through anti-CD154 mAb and rapamycin in xenogeneic islet transplantation. *Transplant. Proc.* 39:3452.
167. Nandakumar, S., C. W. Miller, and U. Kumaraguru. 2009. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clin. Mol. Allergy* 7:5.
168. Elkord, E. 2006. Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 5:211.
169. Verhagen, J., M. Akdis, C. Traidl-Hoffmann, P. Schmid-Grendelmeier, D. Hijnen, E. F. Knol, H. Behrendt, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2006. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:176.
170. Taams, L. S., D. B. Palmer, A. N. Akbar, D. S. Robinson, Z. Brown, and C. M. Hawrylowicz. 2006. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 118:1.
171. Guichelaar, T., C. B. ten Brink, P. J. van Kooten, S. E. Berlo, C. P. Broeren, E. W. van, and F. Broere. 2008. Autoantigen-specific IL-10-transduced T cells suppress chronic arthritis by promoting the endogenous regulatory IL-10 response. *J. Immunol.* 180:1373.
172. Yudoh, K., H. Matsuno, F. Nakazawa, T. Yonezawa, and T. Kimura. 2000. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:617.
173. Moore, K. W., M. R. de Waal, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683.
174. Kohm, A.P., J.S. McMahon, J.R. Podojil, W.S. Begolka, M. DeGutes, D.J. Ziegler, and S.D. Miller. 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* 176:3301.
175. Lowenthal, J. W., R. H. Zubler, M. Nabholz, and H. R. MacDonald. 1985. Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature* 315:669.

176. Lowenthal, J. W., C. Tougne, H. R. MacDonald, K. A. Smith, and M. Nabholz. 1985. Antigenic stimulation regulates the expression of IL 2 receptors in a cytolytic T lymphocyte clone. *J. Immunol.* 134:931.
177. Lowenthal, J. W., P. Corthesy, C. Tougne, R. Lees, H. R. MacDonald, and M. Nabholz. 1985. High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. *J. Immunol.* 135:3988.
178. Tanaka, H., J. Tanaka, J. Kjaergaard, and S. Shu. 2002. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Immunother.* 25:207.
179. Rollinghoff, M., A. Starzinski-Powitz, K. Pfizenmaier, and H. Wagner. 1977. Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 145:455.
180. Aschan, J., S. Carlens, H. Hagglund, S. Klaesson, J. Mattsson, and M. Remberger. 1999. Improved survival after bone marrow transplantation for early leukemia using busulfan-cyclophosphamide and individualized prophylaxis against graft-versus-host disease: a long-term follow-up. *Clin. Transplant.* 13:512.
181. Uchida, S., K. Suzuki, S. Akiyama, M. Miyamoto, T. Juji, and M. Fujiwara. 1994. Suppressive effect of cyclophosphamide on the progression of lethal graft-versus-host disease in mice--a therapeutic model of fatal post-transfusion GVHD. *Ther. Immunol.* 1:313.
182. Itescu, S., E. Burke, K. Lietz, R. John, D. Mancini, R. Michler, E. Rose, M. Oz, and N. Edwards. 2002. Intravenous pulse administration of cyclophosphamide is an effective and safe treatment for sensitized cardiac allograft recipients. *Circulation* 105:1214.
183. Lien, Y. H., and K. Scott. 2000. Long-term cyclophosphamide treatment for recurrent type I membranoproliferative glomerulonephritis after transplantation. *Am. J. Kidney Dis.* 35:539.
184. Brode, S., T. Raine, P. Zaccane, and A. Cooke. 2006. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 177:6603
185. Quinn, K. M., R. S. McHugh, F. J. Rich, L. M. Goldsack, G. W. de Lisle, B. M. Buddle, B. Delahunt, and J. R. Kirman. 2006. Inactivation of CD4+ CD25+ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load. *Immunol. Cell Biol.* 84:467.
186. Yoshiki, R., K. Kabashima, K. Sugita, K. Atarashi, T. Shimauchi, and Y. Tokura. 2009. IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. *J. Invest Dermatol.* 129:705.
187. Ghoreishi, M., and J. P. Dutz. 2006. Tolerance induction by transcutaneous immunization through ultraviolet-irradiated skin is transferable through CD4+CD25+ T regulatory cells and is dependent on host-derived IL-10. *J. Immunol.* 176:2635.

188. Atarashi, K., T. Mori, R. Yoshiki, K. Kabashima, H. Kuma, and Y. Tokura. 2009. Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci.* 53:216.
189. Miyara, M., K. Wing, and S. Sakaguchi. 2009. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:749.
190. Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thornton. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212:60.
191. Schwarz, A., S. Grabbe, H. Riemann, Y. Aragane, M. Simon, S. Manon, S. Andrade, T. A. Luger, A. Zlotnik, and T. Schwarz. 1994. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.* 103:211.
192. Roelofs-Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak, M. Fang, S. Artik, and E. Gleichmann. 2003. Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* 173:1043.
193. Roelofs-Haarhuis, K., X. Wu, and E. Gleichmann. 2004. Oral tolerance to Nickel requires invariant NKT cells for specific infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *J. Immunol.* 171:2863.
194. Schwarz, T. 2008. 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochem. Photobiol.* 84:10.
195. Toews, G. B., P. R. Bergstresser, and J. W. Streilein. 1980. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124:445.
196. Cooper, K. D., L. Oberhelman, T. A. Hamilton, O. Baadsgaard, M. Terhune, G. LeVee, T. Anderson, and H. Koren. 1992. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:8497.
197. Elmetts, C. A., P. R. Bergstresser, R. E. Tigelaar, P. J. Wood, and J. W. Streilein. 1983. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 158:781.

7. Abkürzungen

AICID	aktivierungsinduzierter Zelltod
AOO	Aceton Olivenöl
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpresentierende Zelle
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CHS	Kontakthypersensibilisierung
CpA	Capture Antikörper
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CY	Cyclophosphamid
DA	Detection Antikörper
DNBS	Sodium 2, 4-dinitrobenzensulfonate
DNFB	1 Fluoro-2, 4 dinitrobenzene
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ER	Enzyme Reagent
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas Death Domain
FAS	Fas Rezeptor
FASL	Fas Ligand
FCS	Foetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein
FOXP3	Forkhead Box Protein 3
GITR	Glucocorticoid -Induced Tumor Nekrosis Factor Receptor
HRP	Horse Raddisch Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICOS	Inducible Costimulator
ICOSL	Inducible Costimulator Ligand
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin

iTregs	induzierbare regulatorische T Zelle
MACS	Magnetische Zell Separation
MHC	Major Histokompatiblility Complex
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
NMS	normales Maus Serum
nTregs	natürlich vorkommende regulatorische T Zelle
NZT	Niedrigzonentoleranz
OVA	Ovalbumin
OX40	CD134
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cy 5.5
Tc	zytotoxische T Zelle
TGF- β	Tumor Growth Factor betta
Th	T-Helfer Zelle
TNCB	2, 4, 6-Trinitro-1-Chlorobenzol
TNFR2	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2
TNF- α	Tumor.Nekrose Faktor alpha
Tr	T regulatory Typ
Treg	regulatorische T Zelle
UV	Ultraviolett
UVB	Ultraviolett Bestrahlung
Z	Zelle

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ulrike Luckey (geb. Frankenberg)
Email: ulmalufra@yahoo.com
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Hochschulausbildung

2006-2009 Dissertation an der Universitätsmedizin Mainz
2003-2006 Master-Studium an der Technischen Universität München (TUM)
2001-2003 Bachelor-Studium an der University of the District of Columbia, USA (UDC)
1999-2001 Associate of General Science-Studium an dem Northern Virginia Community College, USA (NVCC)

Schulische Ausbildung

1990-1999 Abitur am Huber-Gymnasium, München
1988-1990 Grundschule an der Gotzmannstrasse, München
1987-1988 Grundschule der Deutschen Schule Riadh, Saudi Arabien
1985-1987 Grundschule der Deutschen Schule Jeddah, Saudi Arabien