

Die Rolle regulatorischer T-Zellen im experimentellen allergischen Asthma

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Aysefa Doganci
Geb. am 29.06.1972 in Duisburg

Mainz, im Mai 2007

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für zelluläre und molekulare Immunologie der Lunge an der I. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg Universität unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Dr. Susetta Finotto in der Zeit von 02.05.2003 bis Mai 2007 angefertigt.

Teilergebnisse der Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Doganci, A., Eigenbrod, T., Krug, N., De Sanctis, G.T., Hausding, M., Erpenbeck, V.J., El-Bdaoui, H., Lehr, H.A., Schmitt, E., Bopp, T., Kallen, K.J., Herz, U., Schmitt, S., Luft, C., Hecht, O., Hohlfeld, J.M., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Renz, H., Neurath, M.F., Galle, P.R., Finotto, S. 2005. **The IL-6R alpha chain controls lung CD4⁺CD25⁺ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo.** J Clin Invest. **115**(2):313-325.

Doganci, A., Sauer, K., Karwot, R., and Finotto, S. 2005. **Pathological Role of IL-6 in the Experimental Allergic Bronchial Asthma in Mice.** Clinical Reviews in Allergy and Immunology. **28**: 257-269.

Finotto, S., Eigenbrod, T., Karwot, R., Boross, I., **Doganci, A.,** Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Galle, P.R., and Neurath, M.F. 2007. **Local blockade of IL-6R signaling induces lung CD4⁺ T cell apoptosis in a murine model of asthma via regulatory T cells.** Internal Immunology. *in press*.

In Vorbereitung:

Doganci, A., Karwot, R., Lehr, A.H., Schmitt, S., Schmitt, E., Galle, P.R., and Finotto, S. **Local blockade of IL-2 receptor in the lung ameliorates airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma.**

Karwot, R., **Doganci, A.,** Maxeiner, J.H., Schmitt, S., Scholtes, P., Hausding, M., Lehr, H.A., Boross, I., Galle, R.P., Glimcher, L.H., and Finotto, S. **Essential role of NFATc2 in CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in a murine model of allergic sensitisation.**

Weitere Publikationen:

Finotto, S., Siebler, J., Hausding, M., Schipp, M., MWirtz, S., Klein, S., Protschka, M., **Doganci, A.**, Lehr, H.A., Trautwein, C., Khosravi-Fahr, R., Strand, D., Lohse, A., Galle, P.R., Blessing, M., and Neurath, M.F. 2004. **Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo** Gut. **53**:392-400.

Doganci, A., Neurath, M.F., and Finotto, S. 2005 **Mucosal immunoregulation: transcription factors as possible therapeutic targets** Inflammation and Allergy-Drug Targets. **4**(5): 565-575(11).

Finotto, S., Hausding, M., **Doganci, A.**, Maxeiner, J.H., Lehr, H.A., Luft, C., Galle, P.R., Glimcher, L.H. 2005. **Asthmatic changes in mice lacking T-bet are mediated by IL-13**. Int Immunol. **6**:1-15.

Hotz, M., **Doganci, A.**, Ohlweiler, S., Korn, A., and Nixdorff, K. 2005. **Cloning the OmpA gene from *P. mirabilis* and expression of the protein in *E. coli*. Comparison with OmpAs from other gram-negative bacteria**. Infection and Immunity.

Kongressbeiträge:

Doganci, A., Eigenbrod, T., De Sanctis, G.T., Hausding, M., Krug, N., Schmitt, S., Luft, C., Erpenbeck, V.J., Bopp, T., Schmitt, E., Kallen, K.-J., El-Bdaoui, H., Hecht, O., Herz, U, Hohlfeld, J.M., Renz, H., Neurath, M.F., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Galle, P.R., and Finotto, S. **The IL-6R alpha chain controls the development of lung Th2 cells and the function of lung CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells during allergic airway inflammation in vivo**. 16. Mainzer Allergie Workshop 14-15 März 2004.

Doganci, A., Eigenbrod, T., De Sanctis, G.T., Hausding, M., Krug, N., Schmitt, S., Luft, C., Erpenbeck, V.J., Bopp, T., Schmitt, E., Kallen, K.-J., El-Bdaoui, H., Hecht, O., Herz, U. Hohlfeld, J.M., Renz, H., Neurath, M.F., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Galle, P.R., and S. Finotto. **The IL-6R alpha chain**

controls the development of lung Th2 cells and the function of lung CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells during allergic airway inflammation in vivo. 35. Meeting DGFI October 2004, Maastricht, NL. Immunobiology 209:483.

Doganci, A., Eigenbrod, T., Krug, N., De Sanctis, G.T., Hausding, M., Erpenbeck, V.J., El-Bdaoui, H., Lehr, H.A., Schmitt, E., Bopp, T., Kallen, K.J., Herz, U., Schmitt, S., Luft, C., Hecht, O., Hohlfeld, J.M., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Renz, H., Neurath, M.F., Galle, P.R., Finotto, S. **The IL-6R alpha chain controls lung CD4⁺CD25⁺ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo.** 8th German Meeting on Th1/Th2research, 07.-08 Juli 2005, Marburg

Doganci, A., Ho, I.C., Scholtes, P., Maxeiner, J., Karwot, R., Hausding, M., Lehr, H.A., Bopp, T., Galle, P.R. and Finotto, S. **Simultaneous Blockade of the α and β chains of the IL-2R leads to amelioration of allergic airway inflammation in a murine model of asthma.** 18. Mainzer Allergie Workshop 10-11. März 2006.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	14
1.1 Asthma Bronchiale	14
1.1.1 Atemwegshyperreagibilität	15
1.1.2 Allergisches Asthma	15
1.1.3 Immunpathogenese des Asthma bronchiale	17
1.1.4 Cytokine	17
1.2 Intrazelluläre Signaltransduktion in T-Zellen	18
1.3 CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (Tregs)	19
1.3.1 Definition CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen.....	20
1.3.2 Mechanismus der Suppression durch regulatorische T-Zellen.....	22
1.4 Interleukin-6 (IL-6)	23
1.4.1 Der IL-6 Rezeptor Komplex	24
1.4.2 Inhibition des „Trans-Signalings“ mit Hilfe von gp130Fc.....	27
1.5 Interleukin-2 (IL-2)	28
1.5.1 Der IL-2 Rezeptor	28
1.5.2 Signalwege der Cytokinrezeptoren anhand des IL-2/IL-15- Rezeptors	30
1.5.3 Wirkmechanismus der anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper.....	31
1.5.4 Signaltransduktion in T-Zellen	32
2. Problemstellung	33
2.1 Chemikalien	35
2.2 Material.....	39
2.2.1 Antikörper	39
2.2.1.1 FACS-Antikörper.....	40
2.2.2 Oligonukleotide für RT PCR	40
2.2.3 Oligonukleotide für Real Time PCR.....	40
2.2.4 Molekularbiologische Reagenzien	41
2.2.4.1 Nukleinsäure- und Proteinstandards.....	41
2.2.5 Geräte	41
2.2.6 Biologisches Material / Substanzen.....	42
2.2.6.1 Mäuse	42
2.2.6.2 Verwendete Zelllinien.....	42
2.2.7 Zellkultur	42
2.2.7.1 Allgemeine Methoden	42
2.2.7.2 Gebrauchsmaterialien.....	43

2.2.7.3 Kits für ELISA	44
2.3 Methoden	45
2.3.1 Biologisches Material / Reagenzien.....	45
2.3.1.1 Versuchstiere.....	45
2.3.2 Versuchsprotokoll	45
2.3.2.1 Definition der Versuchsgruppen.....	45
2.3.2.2 Sensibilisierung der Mäuse.....	46
2.3.2.3 Antikörperbehandlung.....	47
2.3.3 Durchführung der Versuche	49
2.3.3.1 Invasive Messung der pulmonalen Resistance.....	49
2.3.3.2 Durchführung der broncho-alveolären Lavage.....	49
2.3.3.3 Aufbereitung der erhaltenen BAL.....	50
2.3.3.4 Histologie des Lungengewebes	50
2.3.3.5 Färbung der Cytospin-Objektträger mit Diff-Quick	51
2.3.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	52
2.3.4 Medienzusätze	52
2.3.5 Zellkulturmedien	53
2.3.6 Zellkultur.....	54
2.3.6.1 Passage und Aussaat der Antigen-präsentierenden Zellen.....	54
2.3.6.2 Mitomycin C-Behandlung.....	54
2.3.6.3 5- und 6- Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFSE).....	55
2.3.7 Zellisolation	56
2.3.7.1 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Milz mit MACS	56
2.3.7.2 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Lunge mit MACS.....	58
2.3.7.3 Isolierung CD4+CD25+ positiver T-Zellen mit MACS	58
2.3.7.4 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Lunge mit Dynal.....	59
2.3.8 (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) FACS.....	61
2.3.8.1 Aufbereitung der kultivierten T-Zellen für die FACS-Analyse.....	61
2.3.8.2 Intrazelluläre Foxp3 Färbung.....	62
2.3.9 Messung der Cytokine mittels ELISA	63
2.3.9.1 Cytometric Bead Array (CBA).....	63
2.3.10 Proteine und Verarbeitung.....	64
2.3.10.1 Proteinextraktion.....	64
2.3.10.2 Bestimmung des Proteingehalts	64
2.3.10.3 Western Blot	65
2.3.10.4 Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	66
2.3.10.5 Gießen eines Polyacrylamidgels (PAA)	66
2.3.10.6 Immunpräzipitation zum Nachweis von P-STAT5.....	68
2.3.10.7 Auftragung der Proben.....	68

2.3.10.8 Blotvorgang.....	69
2.3.10.9 Proteinnachweis auf der Nitrocellulose-Membran.....	69
2.3.10.10 Auswertung der <i>Western</i> -Analyse Filme	70
2.3.11 RNA.....	71
2.3.11.1 RNA-Extraktion mit Qiagen.....	71
2.3.11.2 Umschreiben in cDNA.....	71
2.3.11.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	72
2.3.11.4 Gelelektrophorese von DNA	72
2.3.11.5 Real-Time-PCR (RT-PCR).....	73
2.3.12 Immunhistologie	74
2.3.13 Statistische Analysen	74
3. Ergebnisse	75
3.1 Untersuchungen zur Blockade des IL-6R in einem murinen Asthmamodell.....	75
3.1.1 Der Einfluß auf T _H 2-Zellen.....	75
3.1.1.1 Der sIL-6R kontrolliert die T _H 2 Funktion bei Mäusen mit experimentellem Asthma nach Allergenexposition	75
3.1.1.2 Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3	76
3.1.1.3 Expression der GATA-3 und T-bet mRNA	77
3.1.1.4 Die Blockade des mIL-6R führt zur Reduktion der T _H 2-Cytokine IL-4 und IL-5	78
3.1.1.5 Quantifizierung der inflammatorischen Zellen in der BALF	79
3.1.2 Antiinflammatorischer Mechanismus durch die pulmonale Blockade des IL-6 <i>Signalings</i>	79
3.1.3 Anti-IL-6R Antikörper Behandlung induziert IL-10 und IFN γ Produktion in der BALF	80
3.1.3.1 Die lokale Blockade des mIL-6R führt zur Induktion von IL-10 und IFN γ -Produktion in CD4 ⁺ T-Zellen aus der Lunge	81
3.1.3.2 Bestimmung der Cytokine IL-10 und IFN γ nach Applikation des gp130Fc.....	83
3.1.4 Der Einfluß der Blockade des IL-6 <i>Signallings</i> auf Tregs	83
3.1.4.1 Vermehrte IL-10 Produktion in Foxp3 produzierenden CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen in der Lunge anti-IL-6R behandelte Mäuse	83
3.1.4.2 Foxp3 Expression in CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen aus der Lunge.....	85
3.1.4.3 Erhöhte Anzahl CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen in der Lunge von α IL-6R behandelten, OVA-sensibilisierten Mäusen	86
3.1.4.4 Immunsuppressive Funktion CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischer T-Zellen in der Lunge	87
3.1.4.5 Selektive mIL-6R-Expression in CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen aus der Lunge.....	88

3.1.4.6	Anti-IL-6R-Antikörper wirken der IL-6 induzierten Phosphorylierung von STAT-3 entgegen	88
3.1.4.7	Der adoptive Transfer von CD4+CD25+ T-Zellen von anti-IL-6R behandelten Mäusen führt zu einer Inhibition der Entzündungen in der Lunge	89
3.1.4.8	Weniger Effektorzellen in der Lunge nach Kotransfer mit CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen	91
3.2	Ergebnisse zur intranasalen Applikation von Antikörpern gegen die IL-2R α- bzw. β- in einem murinen <i>in vivo</i> Asthmodell.....	93
3.2.1	Messung der AHR unter Provokation mit dem Bronchokonstriktor Methacholin bei Tieren, die während der OVA-Provokationsphase mit Antikörpern gegen die IL-2R α bzw. - β -Kette behandelt wurden	93
3.2.2	Beurteilung der intrapulmonalen inflammatorischen Reaktion durch Analyse HE-gefärbter Lungenpräparate	94
3.2.3	Verminderte Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 in CD4+ T-Zellen, isoliert aus der Lunge anti-IL-2R β -Antikörper behandelter Mäuse.....	95
3.2.4	Konzentration einiger Cytokine in der BALF nach intranasaler Applikation der Antikörper gegen die IL-2R α bzw. β -Kette	97
3.2.5	Quantifizierung der inflammatorischen Zellen in der BALf nach i.n. Blockade der IL-2R α bzw. β -Kette in einer Konzentration von 50 μ g/Tag	98
3.2.6	Phosphorylierung von STAT-5 als Antwort auf die IL-2R Blockade.....	99
3.2.7	Die lokale Blockade der IL-2 Rezeptor α als auch β -Kette führen zu einer reduzierten Expression CD4+CD25+ T-Zellen in der Lunge ...	99
3.2.8	Analyse CD4+CD25+ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten	101
3.2.9	CD4+CD25+Foxp3+ Expression in Lunge und Lymphknoten Antikörper-behandelter Mäuse	102
3.2.10	Proliferation CD4 positiver T-Zellen in der Lunge und Lymphknoten.....	103
3.2.11	Die systemische Gabe von IL-2 bewirkt keine Induktion regulatorischer T-Zellen.....	104
3.2.12	Die i.p. Applikation von IL-2 während der Sensibilisierungsphase führt zur Phosphorylierung von STAT-5	106
4.	Diskussion	107
4.1	Diskussion der Methoden.....	107
4.2	Diskussion der Ergebnisse IL-6R	108
4.2.1	Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung des über den sIL-6R vermittelten <i>Trans-Signalings</i> durch Untersuchungen humaner BALF	109
4.2.2	Die Blockade des sIL-6R reguliert T _H 2 Cytokine in der BALF und GATA-3 in der Lunge.....	110

4.2.3	Geringer Einfluss der α IL-6R-Antikörper auf T_H2 -Cytokine in der BALF	111
4.2.4	Die lokale Behandlung mit anti-IL-6R-Antikörper zeigt einen Rückgang inflammatorischer CD4 ⁺ T-Zellen in der Lunge.....	112
4.2.5	Die Blockade des <i>Signalings</i> bzw. <i>Trans-Signalings</i> reguliert die AHR unabhängig von der IL-5 Produktion	112
4.2.6	Die i.n. Applikation der α IL-6R-Antikörper führt im Gegensatz zur systemischen Gabe zu einer Induktion CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischer T-Zellen in der Lunge	114
4.2.7	Die lokale Anti-IL-6R-Antikörper Behandlung induziert IFN γ und IL-10 in BALF und CD4 ⁺ T-Zellen der Lunge	115
4.2.8	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen aus α IL-6R-Antikörper behandelten Mäusen sezernieren vermehrt IL-10 und TGF β , verglichen zu OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren	116
4.2.9	Foxp3 Expression in CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen aus der Lunge	117
4.2.10	Selektive mIL-6R-Expression auf der Oberfläche CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen der Lunge, die in der Lage sind immunsuppressive Aktivitäten auszuüben	118
4.3	Diskussion der Ergebnisse IL-2R	120
4.3.1	Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette verringert die AHR und die Inflammation in den Atemwegen	120
4.3.2	Die Blockade der IL-2 β -Kette führt zur Inhibition der T_H2 Cytokine in der BALF	121
4.3.3	Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette führt zur Induktion von IFN γ in der BALF OVA-sensibilisierter und -provozierter Mäuse	122
4.3.4	Signaltransduktion	123
4.3.5	Die lokale Blockade der IL-2 Rezeptor β -Kette führt zu einer reduzierten Expression von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen in der Lunge, aber zu einer Induktion dieser Zellen in den Lymphknoten	123
4.3.6	Die systemische Gabe von IL-2 bewirkt keine Induktion regulatorischer T-Zellen.....	124
4.3.7	Die Blockade der IL-2R β -Kette reduziert CD8 ⁺ CD122 ⁺ regulatorische T-Zellen in Lunge und Lymphknoten.....	126
4.4	Gemeinsame Diskussion über IL-6 und IL-2 für Lungen Tregs	128
4.4.1	Die Cytokine IL-6 und IL-2 üben eine differenzierte Regulation auf CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs in der Lunge aus.....	128
5.	Ausblick	130
6.	Zusammenfassung	131
6.1	Die lokale Blockade der αIL-6R-Ketten	131

6.1.1	Schematische Darstellung der Blockade des <i>Signalings</i> bzw. <i>Trans-Signalings</i>	131
6.2	Die lokale Behandlung der IL-2Rα bzw. IL-2Rβ-Kette	133

Abkürzungsverzeichnis**Einheiten**

bp	Basenpaare	n	Nano- (10^{-9})	p	Pico- (10^{-12})
Da	Dalton	M	Molar	rpm	Umdrehungen/min
g	gramm	MG	Molekulargewicht	sec	Sekunde
h	Stunde	min	Minute	U	Unit
l	Liter	μ	Mikro- (10^{-6})	v/v	<i>volume per volume</i>
m	Milli- (10^{-3})	oD	optische Dichte	w/v	<i>weight per volume</i>

Abkürzungen einiger Antikörper

α IL-6R	anti-Interleukin-6 Rezeptor Antikörper
mIL-6R	membrangebundener IL-6R
sIL-6R	löslicher (<i>soluble</i>) IL-6 Rezeptor
α IL-2R	anti-Interleukin-2 Rezeptor Antikörper
α IL-2R β	Antikörper gegen die β Kette des Interleukin-2 Rezeptors
AK	Antikörper
mAK	monoklonaler Antikörper

Abkürzungen für das Behandlungsprotokoll der Mäuse

AHR	Atemwegs-Hyperreagibilität
Alum	Aluminiumpotassiumsulfat
BALF	Broncho-alveoläre Lavage Fluid
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
OVA	Ovalbumin
MCh	Methacholin

Sonstige Abkürzungen

α	anti- oder alpha
β	beta
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Aqua dest.	Aqua destillata

BSA	Bovines Serum Albumin
DC	<i>dendritic cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
et al.	et alteri
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
γ	gamma
gp	Glykoprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
JAK	Januskinase
K.O., (-/-)	<i>Knock out</i>
LK	Lymphknoten
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
T _H	T-Helferzelle
Treg	CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vs.	versus
Z	Zellen

1. Einleitung

1.1 Asthma Bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege mit reversiblen Atemwegsobstruktionen, erhöhter Mukusproduktion und einer schwer beherrschbaren Atemwegshyperreagibilität [Bousquet et al., 2000; Holt et al., 1999]. Das allergische Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter. Mittlerweile sind in Deutschland ca. 10% der Kinder und 5% der Erwachsenen von dieser Krankheit betroffen. Trotz des medizinischen Fortschritts steigen weltweit, überwiegend in den westlichen Industrieländern, die Prävalenz und die Inzidenz atopischer Erkrankungen weiter an [Leung et al., 1997; Herz et al., 1998; Shaw et al., 1990; Ninan et al., 1992].

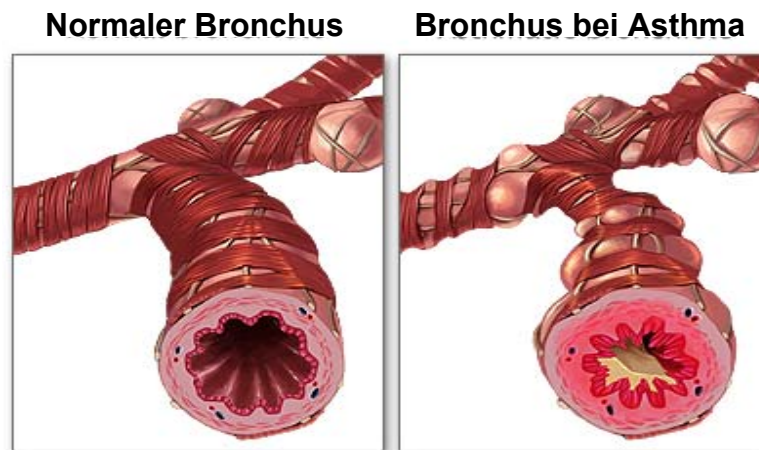


Abb. 1: Querschnitt durch einen gesunden (links) und asthmatischen Luftröhrenast (Bronchus)(rechts)

Quelle: <http://www.drgreene.org/blank.cfm?id=21&action=detail&ref=1252>

Ein gesunder Bronchus zeigt im Gegensatz zu einem asthmatischen eine flache, entspannte Bronchialmuskulatur und -Schleimhaut mit weit geöffnetem Atemweg. Bei asthmatischen Bronchien dagegen ist die Bronchialschleimhaut verdickt. Zusätzlich werden die Bronchien durch krampfartiges Zusammenziehen der Bronchialmuskulatur verengt. Bei einer asthmatischen Reaktion kommt es zur Vergrößerung der glatten Muskelzellen, einer Verdickung der Basalmembran sowie einer Metaplasie der Epithelzellen mit Umwandlung in Mukus-produzierende Becherzellen [Blyth et al., 1998; Hogan et al., 1997; Kay, 1996; Lambrecht et al.,

1998]. Durch vermehrte Schleimabsonderung werden die Atemwege verstopft, wobei die Sauerstoffversorgung der Lunge sinkt und somit die Atmung erschwert wird.

1.1.1 Atemwegshyperreagibilität

Asthma bronchiale ist auf eine Überempfindlichkeit der Atemwege auf unspezifische Reize zurückzuführen, d.h. die für die Induktion einer Atemwegskonstriktion notwendige Provokationsdosis konstriktorisch wirkender Stimuli ist geringer als bei Nichtasthmatikern. Um Asthma bronchiale zu diagnostizieren, welches durch eine bronchiale Hyperreaktivität charakterisiert ist, wird ein Provokationstest mit Metacholin durchgeführt. Hierbei wird die Schwellendosis von Metacholin ermittelt, bei der die Einsekundenkapazität (FEV1) auf weniger als 20% des Ausgangswertes abfällt. Ursprünglich wurde das Asthma bronchiale als ein vollständig reversibler Prozess angesehen. In zahlreichen Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Asthmatiker über Jahre hinweg einen stärkeren FEV1-Abfall zeigen als Kontrollpersonen [Lange 1998; Busse 2001].

Bei Tierversuchen hingegen wird meist der Atemwegswiderstand (*Resistance*) nach Gabe steigender Dosen Methacholins als Maß für die Hyperreagibilität ermittelt. Die für die Entstehung der AHR verantwortlichen Vorgänge aber sind bisher weitgehend unbekannt.

1.1.2 Allergisches Asthma

Unter Allergie versteht man die Immunreaktion gegen normalerweise harmlose Antigene, die auch Allergene genannt werden [Janeway et. al., 2005]. Sie fallen unter die Hypersensibilitätsreaktionen, die in eine noch heute gebräuchliche Einteilung in verschiedene Reaktionsformen nach Coombs und Gell erfolgen. Als Allergie wird die Typ1 Reaktion bezeichnet, die durch die Bindung von Allergenen an IgE auf Mastzellen ausgelöst wird. Zu diesen Reaktionen gehören Asthma, Heuschnupfen oder auch der anaphylaktische Schock [Naclerio und Solomon, 1997; Marone, 1998]. Die allergene Dosis und die Eintrittspforte des Allergens sind hier von großer Bedeutung. Während der Sensibilisierungsphase werden IgE-Antikörper gegen ein prozessiertes Allergen gebildet. Das Allergen regt dann durch Komplexbildung von IgE-Molekülen auf Mastzellen deren Aktivierung an (Abb. 2) und löst somit eine allergische Reaktion aus [Corry und Kheradmand 1999; Bacharier und Geha 2000]. Bei Wiederauftreten des Allergens wird die Ausschüttung von Mediatoren der allergischen Reaktion wie Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane und

Bradykinin, aber auch Cytokine und Chemokine veranlasst. Histamin z.B. löst eine unmittelbare Reaktion aus, wobei einige Mediatoren wie Leukotriene oder Cytokine längerfristige Reaktionen wie Eosinophilie oder chronische Entzündungszustände auslösen [Pearlman, 1999].

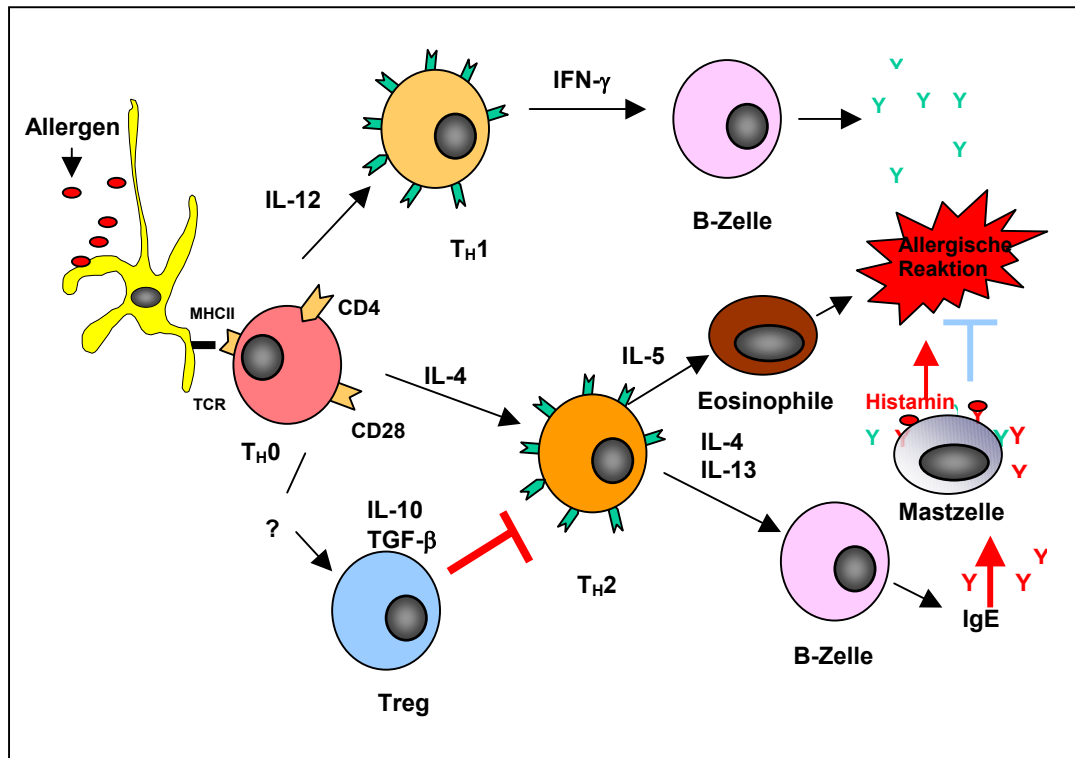


Abb. 2: Die allergische Reaktion

Allergische Reaktionen wie z.B. Asthma sind charakterisiert durch eine T_H2 vermittelte Immunantwort [Robinson et al., 1992; Robinson et al., 1993; Virchow et al., 1995; Romagnani et al., 1997; Finotto et al., 2000; Neurath et al., 2002]. Aktivierte T_H2 -Zellen produzieren die Cytokine IL-4, IL-5 und auch IL-13, die wiederum B-Zellen zur Produktion von IgE anregen und eosinophile Granulozyten aktivieren (Abb. 2) [MacDonald, 1998; de Vries et al., 1999]. Derzeit werden die Symptome des allergischen Asthma noch häufig mit Medikamenten bekämpft, die zu zahlreichen Nebenwirkungen führen können, u.a. erhöhte Histaminausschüttung und damit verbunden Ödeme und Ekzeme auf der Haut [Sampson und Rorke, 1996]. Daneben können Muskelerkrankungen und Gewebeschwund, durch Dünnwerden der Haut, Knochenentkalkung und Störungen des Mineralhaushaltes auftreten [Mutschler und Geisslinger, 2001]. Vorteilhafter wäre es, eine Verhinderung der allergischen Reaktion durch eine spezifische Immuntherapie zu erzielen. Dieser Ansatz geht davon aus, dass die Verschiebung des T_H1/T_H2 Gleichgewichtes durch eine verstärkte Produktion von allergenspezifischen IgG-Antikörpern, durch die

Regulation von kostimulatorischen Signalen, sowie durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen von großer therapeutischer Bedeutung sein könnte [Rolland und O’Hehir, 1998, Barnes, 2000, Winther et al., 2000].

1.1.3 Immunpathogenese des Asthma bronchiale

Die Grundlage der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale beruht auf der immunologischen Sensibilisierung gegen ein eigentlich harmloses Umweltallergen. Hierbei gelangt ein Antigen über epitheliale Barrieren (z.B. Atemwegsmukosa) in den Körper und wird von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. Lungenmakrophagen oder dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen, intrazellulär prozessiert und zusammen mit MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche als Peptidfragment präsentiert. CD4-positive (+) T-Helferzellen (T_H -Zelle) erkennen diesen Peptid-MHC-II-Komplex über einen entsprechenden T-Zellrezeptor und es kommt beim Kontakt mit B-Zellen, die antigenspezifische Immunglobuline (Ig) auf ihrer Oberfläche exprimieren, zur Induktion der Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Zelle zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Zunächst treten Antikörper der Klasse IgM auf. Anschließend entscheidet das Cytokinprofil der jeweiligen Zelle, welche Ig-Klasse von der B-Zelle sezerniert wird. T_H1 -Cytokine, wie $IFN-\gamma$ und IL-2 begünstigen einen Klassenwechsel zu IgG_{2A}, während gleichzeitig eine T_H2 -Antwort durch die ausgeschütteten Cytokine inhibiert wird. T_H2 -Cytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 induzieren die Bildung von IgA, IgE und IgG-Klassen, die wie die von T_H1 -Zellen ausgeschütteten Cytokine die andere Helferzellentwicklung hemmen. Die Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 sind ebenfalls von Bedeutung für die T_H1 -/ T_H2 -Entwicklung, da T-bet ausschließlich in T_H1 -Zellen, GATA-3 nur in T_H2 -Zellen exprimiert wird. Eine einmal eingeschlagene Richtung für die Immunantwort wird somit beibehalten. Welche Signale letztendlich eine T_H1 - und welche eine T_H2 -Immunantwort initiieren, ist derzeit nur unzureichend erforscht. Hier scheinen aber u.a. genetische Faktoren eine Rolle zu spielen [De Sanctis et al., 1995; Van Harwerden et al., 1995; Postma et al., 1995].

1.1.4 Cytokine

Cytokine sind Proteine, die Wachstum, Differenzierung und Proliferation von Zielzellen regulieren, indem sie die intrazelluläre Signalübertragung vermitteln. Ihre Wirkung entfalten Cytokine überwiegend parakrin über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Beim allergischen Asthma kommt es zu einem inflammatorischen

Prozess in den Atemwegen, wobei es zur Aktivierung von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten kommt. Zu den Letzteren gehören u.a. die proinflammatorischen T_H2 -Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Cytokine spielen auch bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle, indem sie zur Funktionssteuerung der Alveolarmakrophagen als Antigen präsentierende Zellen (APCs) führen [Spiteri et al., 1992]. Neben den proinflammatorischen Cytokinen gibt es auch eine Reihe von antinflammatorischen Cytokinen, die für Regulation der Entzündungsreaktion von Bedeutung sind, wobei hier das T_H2 Cytokin IL-10 von Relevanz ist. IL-10 wird neben T_H2 -Zellen auch von $CD8^+$ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierten B-Zellen sezerniert [Fiorentino et al., 1991]. Die Funktion von IL-10 liegt in der Inhibition der Funktion von Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen [De Waal Malefyt et al., 1991; Wang et al., 1994; Berkman et al., 1995]. Auf transkriptioneller Ebene hemmt IL-10 die Synthese u.a. von den Cytokinen IL-5 und IL-6 [Borish et al., 1996]. Zudem beschreiben Howard et al. [1993] im Tiermodell eine protektive Wirkung von IL-10 gegenüber einer letalen Endotoxindosis.

1.2 Intrazelluläre Signaltransduktion in T-Zellen

T-Zellen sind für die Immunabwehr eine wichtige Gruppe von weißen Blutkörperchen, die im Knochenmark gebildet werden und anschließend in den Thymus wandern. Dort werden T-Zellen für ihre bevorstehende Aufgabe als T Helfer (T_H) oder u.a. als regulatorische T-Zellen ausgebildet. T_H Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den CD4 Corezeptor. Regulatorische T-Zellen exprimieren neben dem CD4 Corezeptor auch einen Teil des IL-2 Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche. Ihre Aufgabe ist es, bei allergischen Reaktionen und Autoimmunerkrankungen zum Abklingen der Symptome zu führen. Zusätzlich tragen alle T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor (TCR) an ihrer Oberfläche, der einen Komplex aus antigenem Peptid und MHC-Molekül erkennt. Nur wenn der TCR spezifisch sowohl für das Peptid als auch das Proteinprodukt des individuellen MHC-Allels ist, wird ein spezifisches TCR-Signal ausgelöst [Viola und Lanzavecchia, 1996; Valitutti et al., 1996]. Im Gegensatz zu den Immunglobulinen auf B-Lymphozyten erkennen T-Lymphozyten keine freien, sondern nur zellgebundene Antigene, die ihnen von anderen Zellen mittels MHC-Molekülen präsentiert werden. Die Signaltransduktion zur vollständigen T-Zellaktivierung beginnt nach dem Zusammentreffen des TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex und dem Auslösen eines weiteren Signals durch die kostimulatorischen Proteine auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) und der T-Zelle. Dies führt zur Produktion

von IL-2 und dem Eintritt in den Zellzyklus. Diese Signale bewirken intrazelluläre Veränderungen im TCR/CD3-Komplex und u.a. die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen. Diese werden teilweise aktiviert und können in diesem Zustand in den Nukleus eintreten, um dort über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Transkription verschiedener Gene zu stimulieren, die u.a. den Zellzyklus und die Proliferation der T-Zellen induzieren. Die Aktivierung der Signalkaskaden kann über verschiedene Wege erfolgen wie z.B. dem Kalzium-Calcineurin-Weg, dem Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Weg oder dem Protein-Kinase C (PKC)-Weg.

1.3 CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (Tregs)

Bereits Anfang der 1970er Jahre schilderten Gershon und Kondo [1970 und 1971] eine T-Zell-Subpopulation, mit suppressiver Funktion auf die Immunantwort der B-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen und auch T-Zellen. Diese Theorie wurde allerdings wegen umstrittener Ergebnisse für viele Jahre in Zweifel gezogen und der Begriff „Suppressor T-Zellen“ nicht mehr verwendet. Erst 1995 beschrieben Sakaguchi und Kollegen wieder eine T-Zellpopulation, die neben CD4 auch die IL-2R α -Kette (CD25) konstitutiv exprimiert und zudem auch eine eindeutige Rolle in der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen *in vivo* zeigt. Sie erweckten damit erneutes Interesse an diesen „Suppressor T-Zellen“. Zudem demonstrierten die Autoren, dass die Depletion CD4+CD25+ T-Zellen bei adulten Mäusen zur Bildung verschiedener Autoimmunerkrankungen führt. Auch in humanen Studien konnte eine vergleichbare Population CD4+CD25+ T-Zellen mit supprimierenden Eigenschaften charakterisiert werden. Regulatorische T-Zellen repräsentieren 5-10% aller peripheren CD4+ T-Zellen und sind durch einen hypoproliferativen Phänotyp charakterisiert. Sie supprimieren außerdem autoreaktive T-Zellpopulationen und verhindern die Proliferation und Cytokinproduktion konventioneller T-Zellen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen den CD4+ regulatorischen T-Zellen zwei verschiedene Subtypen: Die natürlich vorkommenden CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen, welche im Thymus differenzieren und eine unabhängige Subpopulation von T-Zellen darstellen [Itoh, et al. 1999; Seddon und Mason, 2000; Shevach, 2002]. In der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen, die sich aus konventionellen CD4+ T-Zellen entwickeln, bilden die andere Untergruppe von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen. Im Wesentlichen lassen sich diese beiden Typen regulatorischer T-Zellen durch ihren Entstehungsort, je nachdem Thymus oder Peripherie, und ihre

suppressiven Eigenschaften unterscheiden. Bei CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, die dem Thymus entstammen ist die Suppression sowohl im murinen als auch humanen System zellkontaktabhängig, erfordert außerdem eine Stimulation der Tregs über ihren T-Zellrezeptor und ist unabhängig von löslichen supprimierenden Faktoren [Thornton und Shevach, 1998, Jonuleit et al., 2001].

1.3.1 Definition CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind eine spezielle Gruppe von T-Zellen, die andere B- oder T-Zellen in ihrer Umgebung hemmen. Damit spielen sie eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Immunsystems und der Selbsttoleranz. Als Selbsttoleranz wird die Fähigkeit des Immunsystems höherer Organismen bezeichnet, körpereigene Stoffe zu erkennen und zu tolerieren, um sie von abzuwehrenden körperfremden Stoffen zu unterscheiden [Janeway, 2005]. Diese Selbsttoleranz wird zum einen durch zentrale Toleranz bei der T-Zellentwicklung im Thymus erreicht, wobei hier der Prozess der positiven und negativen Selektion eine wichtige Rolle spielt. Bei der negativen Selektion werden T-Zellen aufgrund mangelnder Bindung an MHC-Moleküle selektioniert und bei der positiven Selektion aufgrund zu starker Bindung und somit Überaktivierung der T-Zellen. Zum anderen wird die Selbsttoleranz durch periphere Toleranz erreicht, dass durch Anergie, Deletion und Suppression durch regulatorische T-Zellen aufrechterhalten wird. Bei der Anergie wird einer T-Zelle ein Antigen ohne Co-Stimulation präsentiert. Dabei lebt die Zelle zwar weiter, kann aber nicht mehr aktiviert werden. Bei der Deletion wird ein Antigen ständig in zu hoher Konzentration präsentiert, wobei es zum Tod dieser T-Zelle kommt. Die Suppression durch regulatorische T-Zellen erfolgt TGF- β und IL-10 abhängig.

Bisher wurden regulatorische T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD25 identifiziert. CD25 befindet sich allerdings auch auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen. Deshalb werden diese Zellen heute über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*Forkhead box of protein 3*) identifiziert. Foxp3 ist derzeit der einzige anerkannte molekularbiologische Marker für regulatorischen T-Zellen und wird spezifisch im Thymus und der Peripherie exprimiert [Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003]. Dieser ist sowohl am anergen Phänotyp als auch an der suppressiven Kapazität von regulatorischen T-Zellen beteiligt. Die Relevanz des Foxp3 konnte anhand eines letalen Autoimmun-Syndroms (*Scurfy*), das in Mäusen mit einem Foxp3 Defekt vorkommt, gezeigt werden. Das Fehlen von Tregs führt bei diesen Tieren zu hyperproliferativen Lymphozyten und letztendlich zum Tod. Die

Rekonstitution dieser Tiere mit CD4⁺CD25⁺ T regs dagegen führte zur Aufhebung des Krankheitsbildes und zum Überleben der Mäuse [Fontenot et al. 2003; Fontenot und Rudensky, 2004]. Die Defekt-Mutation von Foxp3 bei IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome*) führt im humanen System zu einer seltenen Krankheit, welche durch autoaggressive T-Zellen verursacht wird und zu einem frühen Tod führt [Wildin et al. 2002]. In der folgenden Abbildung sind schematisch die Eigenschaften regulatorischer T-Zellen dargestellt.

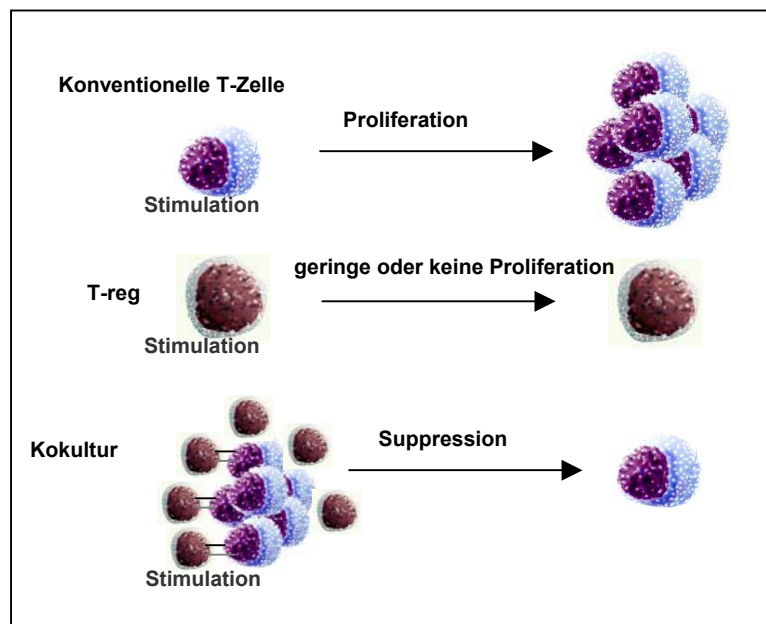


Abb. 3: Eigenschaften von konventionellen und regulatorischen T-Zellen nach Stimulation

Herkömmliche CD4⁺ T-Zellen proliferieren nach Stimulation über ihren T-Zellrezeptor. CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen dagegen proliferieren nach Stimulation kaum oder gar nicht und sezernieren auch keinerlei Cytokine [Shevach, 2002]. Sie sind aber in der Lage antigenunabhängig und zellkontaktabhängig die Proliferation sowie die Cytokinproduktion von konventionellen CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen *in vivo* und *in vitro* zu supprimieren [Thornton und Shevach, 2000; Piccirillo und Shevach, 2001]. Über welchen Mechanismus diese Suppression aber stattfindet, ist bislang unzureichend erforscht. Dennoch besteht großes Interesse an dieser Zellpopulation, da in zahlreichen Mausmodellen die immunsuppressive Funktion dieser Zellen belegt werden konnte. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen besitzen somit ein therapeutisches Potential und stellen einen Kandidaten zur Behandlung diverser Autoimmunkrankheiten dar.

1.3.2 Mechanismus der Suppression durch regulatorische T-Zellen

Der genaue Mechanismus dieser zellkontaktabhängigen Suppression ist bisher weitgehend unbekannt [Shevach, 2002; Wohlfert, 2004]. In *in vitro* Untersuchungen konnte aber belegt werden, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs in der Lage sind, die Proliferation naiver α CD3-stimulierter Effektorzellen wirkungsvoll zu inhibieren [Takahashi, et al., 1998]. Die Suppression durch Tregs erfolgt dabei durch einen inhibitorischen Effekt auf die IL-2 Produktion in konventionellen T-Zellen, welches ein wichtiger autokriner Wachstumsfaktor für diese Zellen ist [Thornton und Shevach, 1998; Thornton et al, 2004; Malek und Bayer, 2004]. Als ein zentraler Mechanismus wurde die Konkurrenz von regulatorischen T-Zellen und CD25⁺ Effektorzellen um IL-2 beschrieben [De la Rossa et al., 2004]. Im Gegensatz zu Effektorzellen besitzen Tregs eine größere Bindungskapazität für IL-2, da sie mehr CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren, was möglicherweise zu einem Mangel seitens der Effektorzellen führt. Steht dagegen IL-2 durch exogene Gabe im Überschuss zur Verfügung, wird das inhibitorische Potential der Tregs aufgehoben oder reduziert.

Bei der von der Peripherie stammenden Population ist die Suppression zellkontaktunabhängig. In der Peripherie scheint IL-2 dagegen für die Homeostase von CD4⁺CD25⁺ Tregs essentiell zu sein. Es wurde zwar auch eine Rolle von IL-2 bei der Aktivierung von CD4⁺CD25⁺ Tregs und ihrer Entstehung im Thymus diskutiert, jedoch konnte dies experimentell bei Mäusen mit Defekten in der IL-2 Produktion oder in der Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors widerlegt werden [Fontenot, 2005]. Bei der zellkontaktabhängigen Suppression stand auch die Rolle des TGF β zur Diskussion. Allerdings konnten Piccirillo et al. [2002] zeigen, dass TGF β *in vitro* nicht an der kontaktabhängigen Suppression von CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs beteiligt ist. In einem Colitis-Transfermodell konnten Fahlen et al. [2005] erstmalig zeigen, dass TGF β zwar entscheidend an der Hemmung der Effektor-T-Zellen beteiligt ist, dabei aber nicht durch CD4⁺CD25⁺ Tregs produziert wird. Diese Aussage wird bekräftigt durch die Tatsache, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen aus TGF β defizienten Mäusen ähnliche suppressive Eigenschaften zeigen wie Wildtyp CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen. Somit konnte die Rolle von TGF β bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression *in vitro* und auch *in vivo* ausgeschlossen werden. Andere Untersuchungen zur *in vivo* Funktionsweise von Tregs legen jedoch den Schluss nahe, dass hier die immunsuppressiven Cytokine IL-

10 und TGF β an der Suppression beteiligt sind, die *in vitro* wahrscheinlich keine Rolle spielen [Nakamura et al., 2001; Annunzio et al., 2002].

1.4 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein pleiotropes Cytokin, das vor allem von mononukleären Phagozyten, aber auch von T-Zellen, Fibroblasten oder Gefäßendothelzellen als Protein von ca. 26 kDa sezerniert wird [Janeway et al., 2005]. Als Monomer von 184 Aminosäuren befindet es sich auf dem Gen 7p21 [Ray et al., 1989]. Die biologischen Effekte des IL-6 schließen ein weites Spektrum ein, das angefangen bei der Stimulierung des Immunsystems über Fieber und Gewebszerstörung bis zum septischen Schock und sogar den Tod führen kann. Bei Asthma zeigt dieses Cytokin proinflammatorische Effekte [Yokoyama et al., 1995]. Dabei hängt die jeweilige Auswirkung von der produzierten Cytokinmenge ab [Abbas et al., 1997]. IL-6 kann direkt auf Zellen wirken, Effekte anderer Cytokine vermitteln, antagonistisch wirken oder auch mit Glucocorticoiden interagieren [Tamm, 1989]. Im Zusammenhang mit T-Zellen spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der frühen T-Zelldifferenzierung, indem es die Differenzierung von CD4 T-Zellen in T_H2 Richtung fördert [Janeway et al., 2005]. Yang und Kollegen [2005] demonstrieren, dass der T_H2-Transkriptionsfaktor GATA-3 von IL-6 positiv beeinflusst wird.

Außerdem induziert IL-6 bei T-Zellen die IL-2 Produktion und das Zellwachstum, sowie die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen [Garman et al. 1987; Lotz et al. 1988; Okada et al. 1988]. Neben seinen proinflammatorischen Effekten wie Einflussnahme auf Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen und der Induktion von akut-Phase Proteinen kann IL-6 auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten [Peters et al., 1997; Peters et al., 1998; Vercelli et al., 1989; Schindler et al., 1990; Xing et al., 1998; Ulich et al., 1991]. Da IL-6 unerwünschte Effekte im Immunsystem zeigt, wurden Versuche unternommen, seine Bindung an seinen Rezeptor zu inhibieren oder seine Sekretion zu vermindern. Als ein neuer

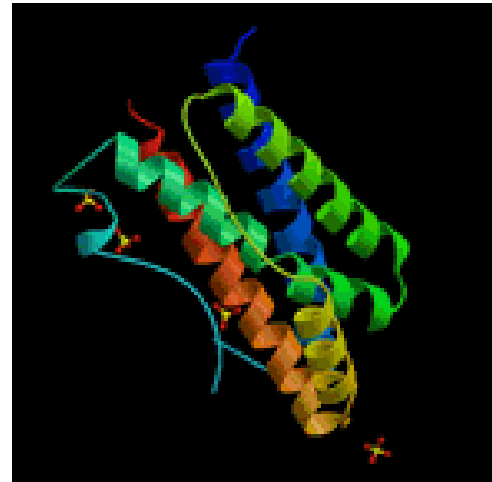


Abb. 4: dreidimensionale Struktur des IL-6-Proteins

Quelle: www.spendloveresearch.org/.../systemil6.htm

therapeutischer Ansatz werden sogar anti-IL-6 Rezeptor Antikörper bei der rheumatoiden Arthritis eingesetzt [El-Soaud, 2002].

Zudem wurde bei asthmatischen Patienten eine erhöhte Expression von IL-6 nachgewiesen [Marini et al., 1992; Bradding et al., 1994; Hamid et al., 1992; Striz et al., 1999]. Trotz der Erforschung der funktionellen Bedeutung verschiedener Cytokine bei Asthma, im Hinblick auf die Entwicklung potentieller therapeutischer Ansätze, ist die Rolle von IL-6 bisher weitestgehend unbekannt [Shardonofski, et al., 1999; Borish et al., 1999; Steinke und Borish, 2001]. In murinen *in vivo* Asthamodellen wurden sogar widersprüchliche Ergebnisse dargestellt. Einerseits konnten Wang et al. [2000] zeigen, dass die gezielte Deletion des IL-6 Gens in einer eosinophilen Infiltration der Atemwege und einer verstärkten T_H2 Cytokinexpression nach OVA-Sensibilisierung resultiert. Im Gegensatz dazu konnten DiCosmo et al. [1995] demonstrieren, dass die transgene Expression von IL-6 in bronchialen Epithelzellen bei Mäusen zu einer spontanen Entwicklung peribronchialer Infiltrate und einer verminderten AHR führt.

1.4.1 Der IL-6 Rezeptor Komplex

Der IL-6 Rezeptor kommt, wie die meisten Cytokin-Rezeptoren auch, in membrangebundener (mIL-6R) als auch in löslicher Form (sIL6R) vor, wobei beide Typen ihre Liganden mit vergleichbarer Affinität binden. Die meisten löslichen Rezeptoren wirken als Antagonisten zum membrangebundenen Gegenstück, indem sie um die Liganden kompetieren [Rose-John et al., 1998]. Es gibt aber auch agonistisch wirkende lösliche Rezeptoren, wie den sIL6R [Rose-John und Heinrich, 1994, Peters et al., 1996] bei dem ein Komplex aus Ligand und löslichem Rezeptor an einen zweiten Rezeptor auf den Zielzellen bindet und so die Signalübertragung ermöglicht. Dieser Vorgang wird als „*Trans-Signaling*“ bezeichnet [Rose-John und Heinrich, 1994] (Abb.6).

Der mIL-6 Rezeptor, ein 80 kDa großes membranständiges Glykoprotein, wird auf der Oberfläche vieler Zellen exprimiert, wie z.B. ruhenden T-Zellen, aktivierten B-Zellen, myeloiden Zellen und Hepatozyten [Zohlnhöfer et al., 1992]. Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor führt zur Assoziation des mIL-6R mit dem Transmembranprotein gp130, ein Glykoprotein von 130 kDa [Taga et al., 1989]. Die Einbeziehung eines zweiten gp130 Moleküls und die damit einhergehende Homodimerisierung von gp130 leitet die intrazelluläre Signaltransduktion über die Jak/STAT-Kaskade ein (Abb.5) [Murakami et al., 1993]. Die Phosphorylierung von STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription*) z.B. führt zur Transkription

von Genen, die in der Pathogenese von Asthma involviert sind. Der Komplex aus IL-6 und IL-6R bindet gp130, welcher auf allen Körperzellen vorhanden ist. IL-6 allein kann jedoch nicht an gp130 binden [Taga et al., 1989].

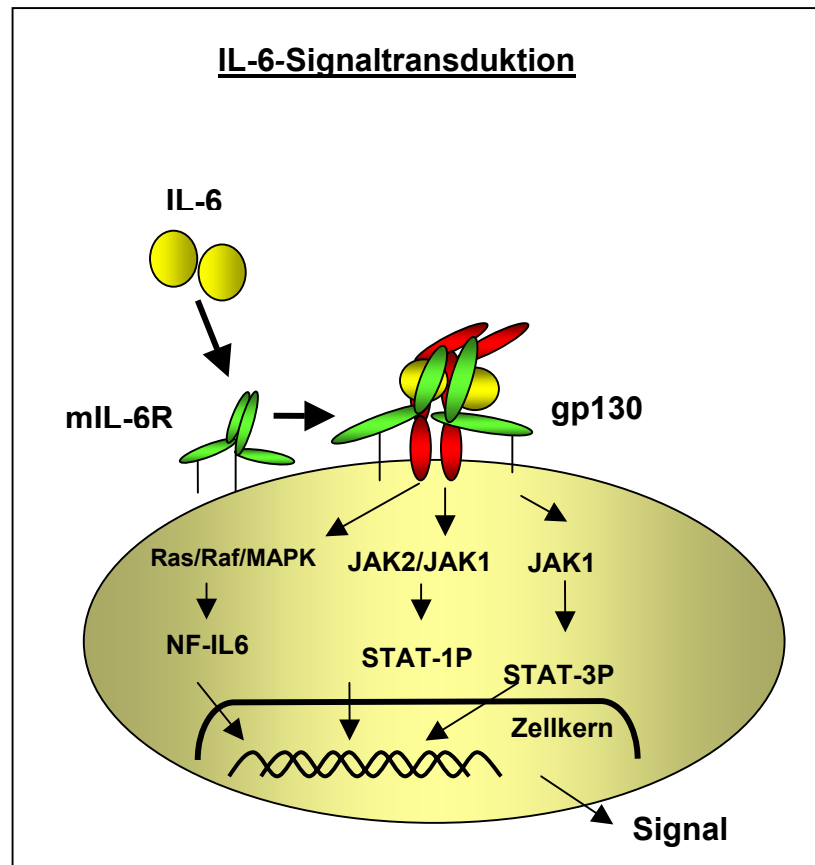


Abb. 5: Initiation der intrazellulären Signaltransduktionskaskade über den IL-6/IL-6R-Komplex
 Zunächst bindet IL-6 an den spezifischen IL-6-Rezeptor (mIL-6R) auf der Zelloberfläche. Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex bindet anschließend an gp130 und induziert dessen Homodimerisierung und die damit einhergehende Signaltransduktion. Der cytoplasmatische Teil vom IL-6R trägt nicht zur Signaltransduktion bei. Nur die Dimerisierung von gp130 bewirkt die Aktivierung der Janus-Tyrosinkinasen (JAK-Kinasen) und die Aktivierung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade. Die Jak-Kinasen phosphorylieren daraufhin intrazelluläre Tyrosinreste von gp130, die den STAT-Faktoren als Bindungsstellen dienen [Murakami et al., 1989; Hibi und Hirano, 1996]. STAT-1 und STAT-3 werden hierbei phosphoryliert, die dann Homo- oder Heterodimere bilden, die in den Zellkern transloziert werden und dort als Transkriptionsfaktoren die Aktivität von Zielgenen modulieren [Akira et al., 1994; Boulton et al., 1994; Stahl et al., 1994; Hibi et al., 1996]. Über die RAS, RAF und MAPK wird zudem ein weiterer Transkriptionsfaktor, NF-IL-6 (*Nuclear Factor IL-6*)

aktiviert, der auch wie die phosphorylierten und dimerisierten STAT-Faktoren weitere Zielgene im Zellkern aktiviert [Bonni, et al., 1997, Ihara et al., 1997].

Die lösliche Form des IL-6R wird entweder durch Transkription einer alternativ gespleißten mRNA oder durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne gebildet, welches als „*Shedding*“ bezeichnet wird [Lust et al. 1992; Müllberg et al. 1992; Rose-John et al. 1994].

Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R kann die Homodimerisierung von gp130 auf Zellen genauso induzieren, wie ein Komplex aus IL-6 mit membrangebundenem IL-6R [Taga et al. 1989]. Somit ermöglicht der sIL-6R die Stimulation von Zellen, die zwar gp130, aber keinen IL-6R auf der Oberfläche exprimieren (Abb. 6). Solche Zellen sind u.a. Endothelzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen oder Neuronalzellen [Peters et al., 1997 und 1998]. In Abwesenheit von sIL-6R können derartige Zellen nicht auf IL-6 reagieren [Mackiewicz et al. 1992]. Insofern erweitert der sIL-6R das Spektrum an Zielzellen für IL-6 erheblich.

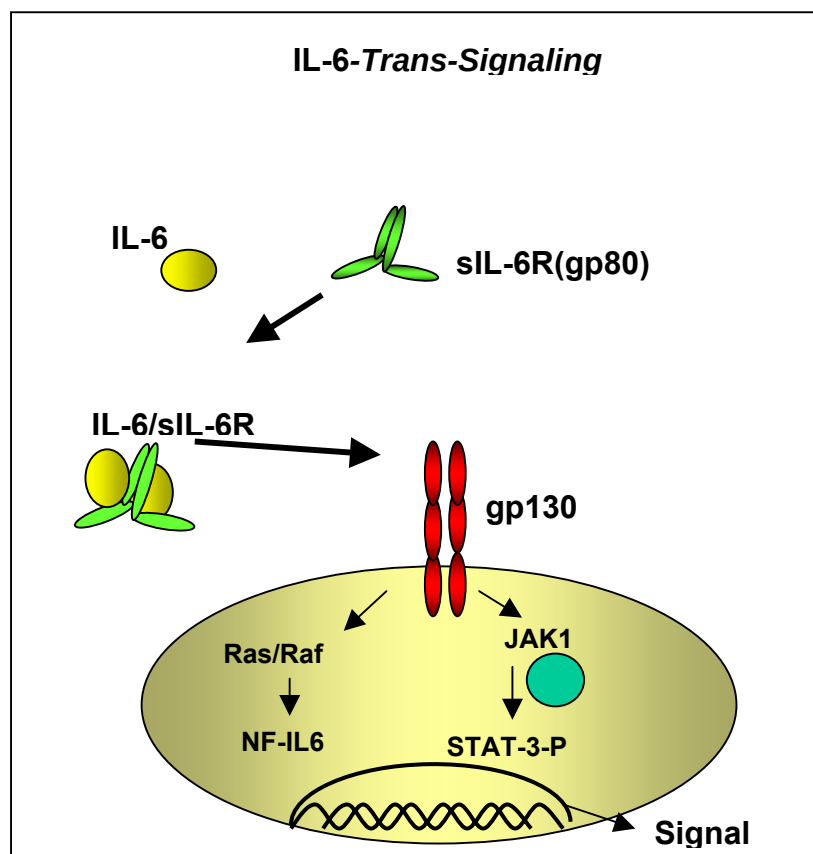


Abb. 6: „*Trans-Signaling*“ über den löslichen IL-6R

Der lösliche IL-6R wird von einer IL-6R exprimierenden Zelle freigesetzt, bindet IL-6 und induziert daraufhin die Homodimerisierung von gp130 auf einer Zielzelle, die selbst keinen IL-6R exprimiert. Die weitere Signaltransduktion wird somit initiiert.

Mittlerweile sind zahlreiche zelluläre Aktivitäten von IL-6 bekannt, die von der Anwesenheit des sIL-6R abhängig sind. In humanen Studien haben Versuche mit Nabelschnur-Endothelzellen gezeigt, dass eine Behandlung mit IL-6 und sIL-6R die Produktion von Chemokinen induziert, nicht aber eine Behandlung mit IL-6 ohne sIL-6R [Romano et al., 1997]. IL-6 inhibiert in Anwesenheit von sIL-6R u.a. die Proliferation von fibroblastischen Synovialzellen, die von Patienten mit rheumatoider Arthritis stammen [Norihiro et al. 2000]. Darüber hinaus kommt es bei adulten transgenen Mäusen, die IL-6 und sIL-6R in der Leber überexprimieren, zu einer massiven extramedullären Hämatopoese in Leber und Milz, wobei ein hoher Anteil der gebildeten Zellen hämatopoetische Stammzellen sind. Dieser Effekt bleibt bei Tieren aus, die nur IL-6 oder sIL-6R in der Leber überexprimieren [Peters, et al., 1996; Peters, et al., 1997].

1.4.2 Inhibition des „*Trans-Signalings*“ mit Hilfe von gp130Fc

Jostock et al. [2001] konnten zeigen, dass IL-6 *Trans-Signaling* in die Pathogenese chronischer Entzündungsreaktionen, wie rheumatoide Arthritis oder auch Asthma involviert ist. Zudem konnte in Tiermodellen demonstriert werden, dass die Symptome der Krankheiten durch die Blockade des *Trans-Signalings* aufgehoben werden konnte. Diese Blockade erfolgte mit gp130Fc, ein rekombinantes, lösliches gp130-Protein, das an die Fc-Region des humanen IgG₁ fusioniert ist [Jostock et al., 2001]. Ferner konnte gezeigt werden, dass lösliches gp130Fc-Protein selektiv Antworten über den löslichen IL-6R inhibiert, während Antworten über den membranständigen IL-6R nicht gehemmt werden. Somit wirkt das gp130Fc als ein natürlicher Inhibitor von IL-6/sIL-6R Komplexen.

1.5 Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 wurde zum ersten Mal von Morgan et al. [1976] als ein spezifischer Wachstumsfaktor für T-Zellen beschrieben. Es ist ein Glykoprotein von 15kDa mit einer für seine biologische Funktion wichtigen Disulfidbrücke (Abb. 7). IL-2 ist eines der wichtigsten Cytokine, die überwiegend von T-Helfer Zellen des Typs1 (T_H1) und auch von Subpopulationen von Thymozyten nach antigener oder mitogener Stimulation

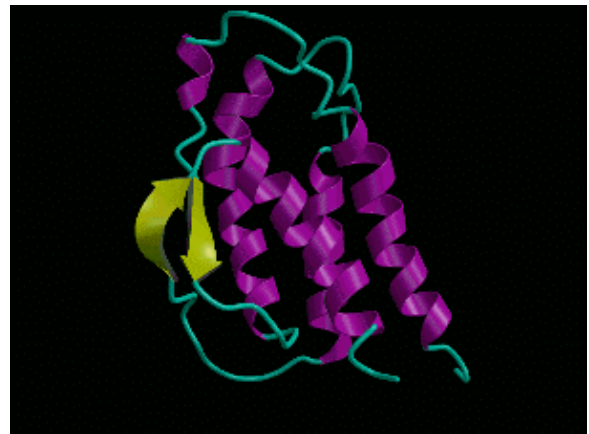


Abb. 7: dreidimensionale Struktur der sezernierten Form des IL-2 Proteins Quelle: www.ocms.ox.ac.uk/.../il2_f42a/f42a.gif

produziert wird [Nelson, 2002]. Neben seiner weitreichenden Wirkung, interagiert IL-2 mit spezifischen Oberflächenrezeptoren auf aktivierten B- und T-Lymphozyten und initiiert die Proliferation, Antikörperproduktion und zellvermittelte Immunantworten. Im weiteren Verlauf wird die Effektorfunktion der jeweiligen Zielzelle ermöglicht. Neben seiner Rolle als Aktivierungs- und Wachstumsfaktor für T-Zellen, wirkt IL-2 auch auf B-Zellen, zytotoxische Effektorzellen, wie NK-Zellen und Lymphokin-aktivierte Killer- (LAK) Zellen, von denen man eine wichtige Rolle bei frühen Abwehrmechanismen eines Wirtes noch vor Ausprägung der spezifischen Abwehr vermutet [Waldmann, 1991; Lin und Leonard, 1997]. Ferner nimmt IL-2 eine zentrale Stellung im Immunsystem ein, deren Synthese durch Cyclosporin A, ein Calcineurin (PP2A)-Inhibitor, blockiert wird und somit eine durch T-Zellen vermittelte Abstoßungsreaktion bei Transplantationen gehemmt wird [Emmel et al., 1989]. Überraschenderweise weisen IL-2 (-/-) Mäuse eine T-Zellüberproduktion auf, was auf den Einfluss von IL-2 auch auf die negative Regulation der Immunantwort und der Apoptose hindeutet [Kundig et al., 1993]. Seine Synthese beginnt nach der Bindung des spezifischen Antigens an den T-Zell-Rezeptor. Es kann die Zelle, die es freisetzt, stimulieren (autokrin) oder Zellen in direkter Umgebung aktivieren (parakrin).

1.5.1 Der IL-2 Rezeptor

Die Funktion des IL-2 und somit auch die Immunantwort wird kontrolliert durch die Expression des IL-2 Rezeptors und der Bindung von IL-2, von denen aus *downstream* Signale vermittelt werden. IL-2 Rezeptoren gehören zur Familie der Hämatopoietin Rezeptoren und werden nicht nur auf T-Zellen exprimiert, sondern

auch auf B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Thymozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen [Ruscetti, 1985]. Auch dendritische Zellen (DCs) exprimieren CD25 auf ihrer Oberfläche [Crowley et al., 1989, Pollard und Lipscomb, 1990]. Das erklärt die vielfältige Funktion von IL-2, wie die Immunglobulin-Produktion, Wachstum von B-Zell-Subpopulationen, Makrophagen-abhängige Cytotoxizität, Wachstum und Differenzierung von Oligodendrozyten und die Proliferation von LAK-Zellen. Eine ungewöhnlich hohe IL-2-Produktion führt zu Autoimmunerkrankungen, Immundefekten und unter bestimmten Umständen auch zu T-Zell Leukämie [Paetkau, 1985].

Der hochempfindliche IL-2-Rezeptor befindet sich nur auf aktivierten Lymphozyten. Durch Stimulierung treten naive T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus ein und synthetisieren IL-2 sowie die α -Kette des IL-2 Rezeptors. Der IL-2R besteht aus drei Proteinuntereinheiten, der 55kDa α -Kette, auch als CD25 oder T-Zell-Aktivierungs-Antigen (Tac) bekannt, einer 75kDa β -Kette (CD122) und einer 64kDa γ -Kette (γ c, CD132).

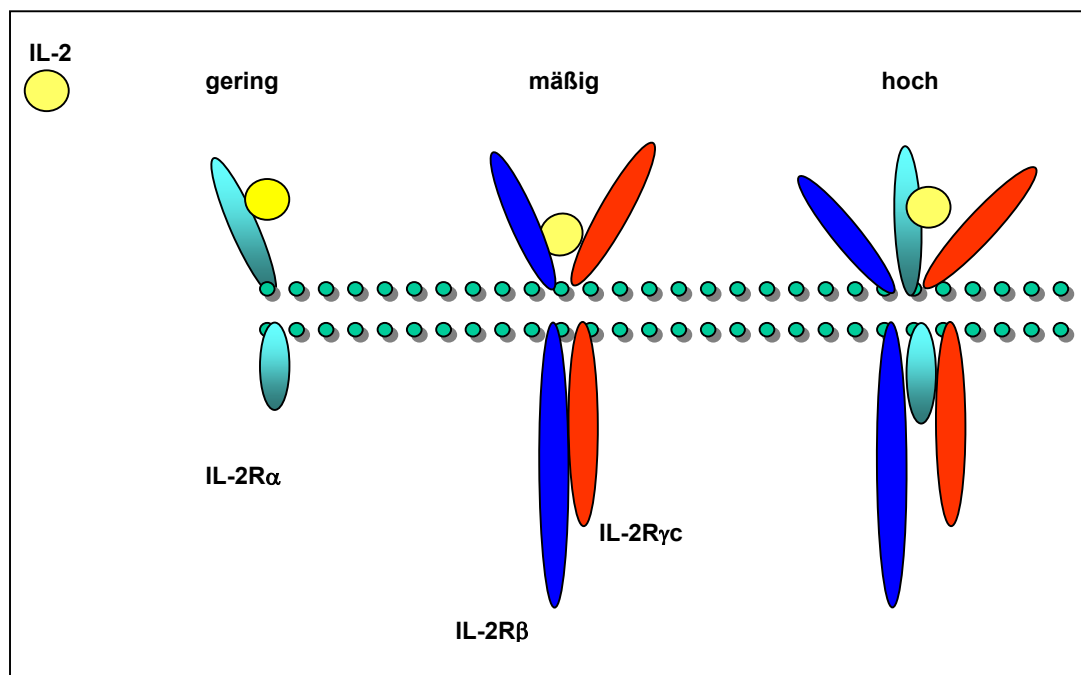


Abb. 8: Die Affinität des IL-2-Rezeptors

Die IL-2R α -Kette ($K_D \sim 10^{-8}$ M) kommt nur im IL-2R vor und wird nach TCR- und CD28 Stimulation verstärkt translatiert. Sie nimmt an der Signalübertragung nicht aktiv teil. Die IL-2R β und γ c-Ketten dagegen werden konstitutiv exprimiert und sind zum Teil an der Signaltransduktion anderer Rezeptoren beteiligt. Sie befinden sich

auf den meisten ruhenden T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Mit den Bestandteilen der β und γ -Kette ist der Rezeptor nur mäßig empfindlich. Nach Aktivierung durch ein fremdes Antigen oder IL-2 wird die α -Kette rasch synthetisiert und assoziiert dann mit dem konstitutiv exprimierten β/γ -Dimer ($K_D \sim 10^{-9}$ M) in der Zellmembran zu dem hochaffinen IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -Komplex ($K_D \sim 10^{-11}$ M) (Abb. 8). Die α - und β -Ketten können IL-2 unabhängig voneinander binden. Die Bindungsstärke des Rezeptorkomplexes aber ist wesentlich höher als die der einzelnen Ketten. Für die Signaltransduktion ist die β -Kette in Verbindung mit der γ -Kette verantwortlich. Die β -Kette besitzt verschiedene cytoplasmatische Bindungsregionen für spezifische Proteine. An die Serin-reiche Domäne z.B. binden sich Jak1 und Syk, während die Prolin-reiche Domäne der β -Kette als Bindungsstelle für PI3-K, sowie STAT3 und STAT5 dient [Taniguchi et al., 1995]. Die Interaktion von IL-2 mit seinem hoch-affinen Rezeptor fördert die Zellzyklusprogression, Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten. Dies führt zu einem raschen Anstieg verschiedener T-Lymphozyten mit Helfer- (CD4+), Suppressor- (CD4+CD25+) oder zytotoxischer (CD8+) Aktivität [Waldmann et al., 1992]. Zudem wird verstärkt IL-2 produziert und sezerniert, so dass sich das System selbst stimuliert (autokrin). IL-2 teilt viele seiner Funktionen mit anderen Cytokinen wie z.B. IL-15, da der IL-2R starke Homologien zum IL-15R aufweist, genau wie IL-2 zu IL-15 [Nelson, 2002]. Die Stimulation des IL-2R führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen [Leonard et al., 1985, Liu et al., 1996].

1.5.2 Signalwege der Cytokinrezeptoren anhand des IL-2/IL-15-Rezeptors

Während CD25 (IL-2R α) erst nach Aktivierung von Effektor- als auch regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und alleine keine oder nur geringe Affinität zur IL-2-Bindung besitzt, dienen die konstitutiv exprimierte IL-2R β -Kette (CD122) und IL-2R γ -Kette (CD132) zur intrazellulären Signaltransduktion und werden außerdem u.a. von dem Cytokin IL-15 als Signaltransduktoren verwendet [Agostini et al., 1996]. Genau wie der IL-2R besitzt der IL-15R eine dritte Untereinheit, die IL-15R α -Kette, welche spezifisch für IL-15 ist.

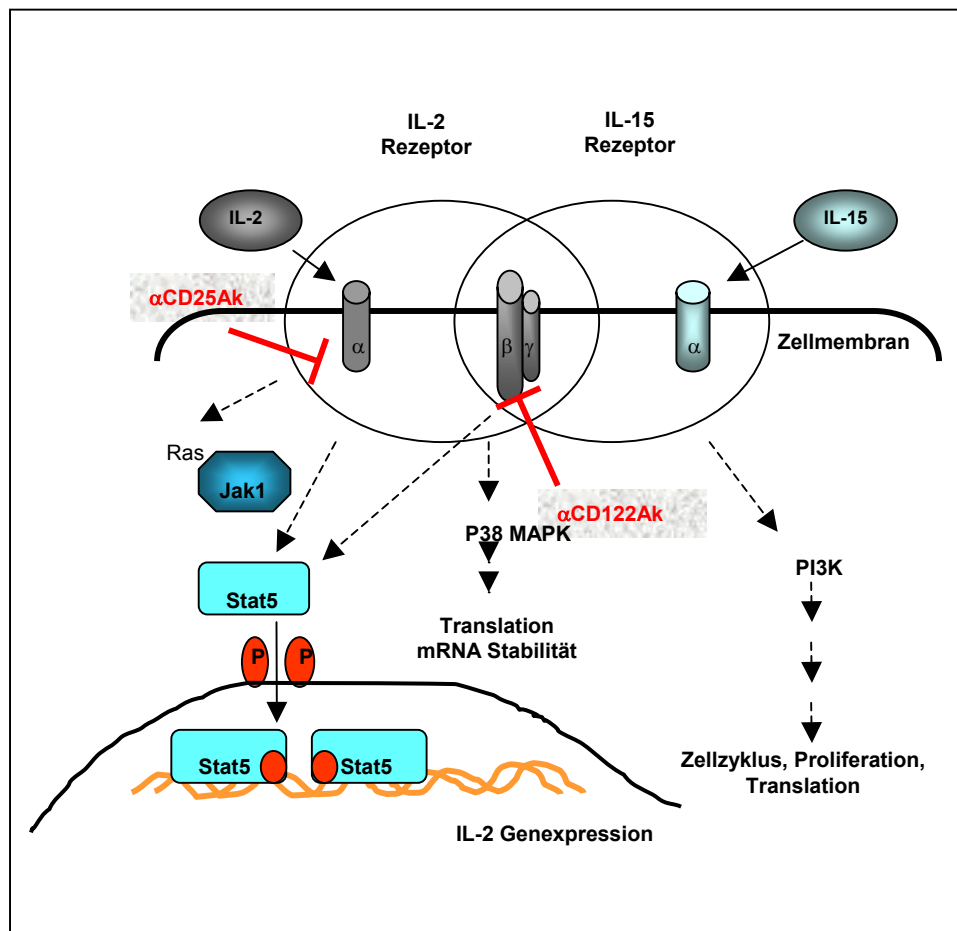


Abb. 9: Vereinfachte schematische Darstellung der IL-2/IL-15 Rezeptor-induzierten Signalwege und Blockade der IL-2R α bzw β -Kette mit entsprechenden Antikörpern

1.5.3 Wirkmechanismus der anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper

Derzeit gibt es verschiedene Klone, die anti-IL2-Rezeptor-Antikörper produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell der Klon PC61 (CD25 oder IL-2R α) als Antikörper verwendet. Anders als der 3C7- oder 7D4-Klon bindet dieser an ein Epitop von CD25, welches die Bindung von IL-2 an die IL-2R α -Kette verhindert, indem es zu einer Konformationsänderung von CD25 führt. Die Klone 7D4 oder 3C7 dagegen binden an unterschiedliche Epitope des Rezeptors und lassen die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor zu [Lowenthal et al., 1985; Moreau et al., 1987].

Anti-CD25 wirkt gezielt gegen T-Lymphozyten, indem es an die α -Kette des IL-2 Rezeptors bindet und so die Bindung von IL-2 an die aktivierte T-Zelle verhindert. Eine Cytokinausschüttung ist somit nicht mehr möglich und damit auch keine Proliferation von T-Zellen, die fremde Antigene erkennen. Dieser Antikörper wirkt nur auf aktivierte T-Zellen, bzw. regulatorische T-Zellen, die auch CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ruhende T- und B-Zellen und auch ruhende NK-Zellen

bleiben unbeeinflusst, da deren IL-2-Rezeptor nur aus einer β - und γ -Kette besteht [Taniguchi und Minami, 1993; Garni-Wagner et al., 1990]. Die Blockade der IL-2R β -Kette mit antiCD122 Antikörpern dagegen, beeinflusst die weitere Signaltransduktion in der Zelle, da die weitere Signaltransduktion in der Zelle über die IL-2R β und γ c verläuft [Taniguchi et al., 1995].

1.5.4 Signaltransduktion in T-Zellen

Die wichtigste Signaltransduktion von IL-2 führt über den Jak/Stat Signalweg (Abb. 9), welcher Cytokinsignale extrem schnell und spezifisch von der Plasmamembran in den Zellkern transportiert. Hierbei bewirkt die Bindung von IL-2 an den trimeren IL-2 Rezeptor eine Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten Jak-Kinasen, welche dann Tyrosinreste der Prolin-reichen Region der β -Kette (Y392 und Y510) phosphorylieren, an die sich nun die STAT-Proteine STAT3 und STAT5 mit Hilfe der SH2-Domänen binden können [Ihle, 1995; Hibi und Hirano, 1998]. Die STAT-Proteine werden von aktiven Jak-Kinasen phosphoryliert und dimerisieren daraufhin, um nach Translokation in den Zellkern die Transkription der Zielgene zu ermöglichen.

2. Problemstellung

Dass das pleiotrope Cytokin IL-6 sowohl über den löslichen (s)IL-6R als auch den membrangebundenen (m)IL6R wirken kann, fand bisher wenig Beachtung in der Forschung. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden deshalb in einem experimentellen Asthmodell Antikörper gegen einerseits den sIL-6R und andererseits gegen sowohl sIL-6R als auch mIL-6R verabreicht, womit gleichzeitig *Trans-Signaling* als auch *Signaling* inhibiert werden. Als ein Cytokin mit proinflammatorischen Effekten bei Asthma polarisiert IL-6 naive CD4 T-Zellen gegen einen T_H2 Phänotyp. Im Übrigen kann der suppressive Effekt von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf andere Zellen des Immunsystems durch IL-6 inhibiert werden, welches u.a. durch aktivierte dendritische Zellen gebildet wird [Dodge et al., 2003]. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, welchen Einfluss neutralisierende Antikörper gegen den sIL-6R oder den mIL-6R auf T_H2 Zellen und deren Cytokinproduktion haben. Zudem sollte untersucht werden, ob diese Behandlung eine Induktion regulatorischer T-Zellen bewirkt. Der spezifische Mechanismus, durch die regulatorische T-Zellen reguliert werden und funktionieren, ist bisher weitestgehend unbekannt. Daher sollten die molekularbiologischen Mechanismen, welche in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach Kontakt mit CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen zur Hemmung von Proliferation und Cytokinproduktion führen, näher untersucht werden. Natürlich stellte sich auch die Frage, ob vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse potentielle therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden könnten.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der lokalen Blockade der IL-2R α und β -Kette. IL-2 nimmt eine zentrale Stellung im Immunsystem ein und ist zudem ein spezifischer Aktivierungs- und Wachstumsfaktor von T-Zellen [Morgan et al., 1976]. Es wurde bereits gezeigt, dass monoklonale Antikörper gegen die IL-2R α -Kette (CD25) die Proliferation inhibieren und selektive Immunsuppression fördern [Leonard et al., 1982]. Die Blockade des IL-2R α auf aktivierten T-Zellen verhindert die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor und somit die T-Zell-Proliferation. Ziel war es, T_H2 Effektorzellen, die verantwortlich für eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die Atemwege und erhöhte AHR sind, in ihrer Proliferation und Aktivierung zu inhibieren. Da die Signaltransduktion über die IL-2R β -Kette verläuft, war ein weiterer Aspekt, diese zu inhibieren und den weiteren Verlauf auf die AHR, Cytokinproduktion

und vor allem auch den Einfluss auf CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen zu untersuchen.

2.1 Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Albumin, chicken egg, 5x crystalline	Calbiochem, Bad Soden
Aluminium Potassium Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Riedel de Haen, Seelze
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin from bovine lung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl_2)	E. Merck AG, Darmstadt
Chlorophorm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	E. Merck AG, Darmstadt
Collagenase Type II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
Dapi Mounting Medium	Vector Laboratories
Dextransulfat	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumcitratdihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	E. Merck AG, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
DnaseI	Qiagen AG, Hilden
ECL plus Western blotting detection system	Amersham Pharmacia Biotech UK
Entellan Mounting Medium	E. Merck AG, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Ethylene-Glycol-bis(β) Aminoethyl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Farblösung für Proteinassay (Bradford)	Biorad, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Formaldehyd	E. Merck AG, Darmstadt
Giemsas-Lösung-Azur-Eosin-Methylenblau	E. Merck AG, Darmstadt
Glycerin	E. Merck AG, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glucose	E. Merck AG, Darmstadt
Glycylglycin (Gly-Gly)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HRP Streptavidin	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaleidoskop prestained standards	Biorad, München
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (K_2HPO_4)	E. Merck AG, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydroxid-Plätzchen	E. Merck AG, Darmstadt
Kodak-Filme	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kodak-Film-Entwickler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kodak-Film-Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Loading Dye 6-fach	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Luria B, Roth Base	Invitrogen
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	E. Merck AG, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	E. Merck AG, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	E. Merck AG, Darmstadt
May-Grünwalds Eosin-Methylenblau	E. Merck AG, Darmstadt
Methacholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N-(1-Naphtyl) Ethyl-Enediamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natrimhydrogenphosphat	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat wasserfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumnitrit (NaNO_2)	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid Sodium nitrite	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P 40	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>phosphat buffered saline</i> (PBS)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluoride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ponceaurot S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Polyacrylamid 40%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Potassium Bicarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pufferlösung pH 4,00	E. Merck AG, Darmstadt
Pufferlösung pH 7,00	E. Merck AG, Darmstadt

RNase Inhibitor	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Roti-load 4x konz., reduzierend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPML-Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl) 25%	E. Merck AG, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodium azide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sulfanilamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
2,2,2 Tribromethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
3,3,5,5-Tetramethylbenzidin	Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau 0,4%	Gibco, Invitrogen Corporation, N.Y.
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween-20	E. Merck AG, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	E. Merck AG, Darmstadt

2.2 Material

2.2.1 Antikörper

Antikörper	Firma
Actin, mouse monoclonal IgG ₁	Santa Cruz, Heidelberg
GATA-3 (HG3-31)	Santa Cruz, Heidelberg
IL-6, human	Strathman Biotech, Hamburg
Normal mouse IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Normal rabbit IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Phospho STAT3 (Tyr705)	New England BioLabs, Frankfurt
Phospho-STAT5 (Tyr694)	Cell signaling
Protein A/G plus Agarose	Santa Cruz, Heidelberg
p-Tyr, mouse monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Purified hamster anti-mouse CD28	BD Biosciences Pharmingen
Purified hamster anti-mouse CD3e (CD3 ϵ chain)	BD Biosciences Pharmingen
Purified rat anti mouse, human pig TGF- β 1 (rat IgG2a, κ)	BD Biosciences Pharmingen
Purified rat anti-mouse CD122 (TM- β 1)	BD Biosciences Pharmingen
Purified rat anti-mouse CD25 (PC61)	BD Biosciences Pharmingen
Purified rat IgG1, λ	BD Biosciences Pharmingen
Purified rat IgG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen
Rat IgG1 Isotype control	R&D Systems
Recombinant mouse gp130Fc Chimera	R&D Systems
STAT3, rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg
STAT5	Cell signaling

2.2.1.1 FACS-Antikörper

Antikörper	Firma
CD4	BD Biosciences Pharmingen
CD25	BD Biosciences Pharmingen
CD122	BD Biosciences Pharmingen
Foxp3	eBiosciences, San Diego, USA
CD4	eBiosciences, San Diego, USA
CD25	eBiosciences, San Diego, USA
CD8	BD Biosciences Pharmingen

2.2.2 Oligonukleotide für RT PCR

Name	Sequenz: 5'-3'
GATA3	rev: CTG GAG GAG GAA CGC TAA TG fw: GGT TGA AGG AGC TGC TCT TG
T-bet	rev: TGC CTG CAG TGC TTC TAA CA fw: TGC CCC GCT TCC TCT CCA ACC AA
mIL-6R	rev: TAC CAC AAG GTT GGC AGG TG fw: ACA CAC TGG TTC TGA GGG AC
mouse TGFβ	rev: CAC TGC TTC CCG AAT GTC TGA fw: TGC TGC TTT CTC CCT CAA CCT
Actin	rev: TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA fw: CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG
Foxp3	rev: CAT TTG CCA GCA GTG GGT AG fw: CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G

2.2.3 Oligonukleotide für Real Time PCR

Name	Sequenz: 5'-3'
Foxp3	rev: TTC CAG GTG GCG GGG TGG TTT CTG fw: CTT ATC CGA TGG GCC ATC CTG GAA G
HGPRT	rev: GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT fw: GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G

2.2.4 Molekularbiologische Reagenzien

2.2.4.1 Nukleinsäure- und Proteinstandards

Marker	Hersteller
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, ready to use	MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, ready to use	MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot
PeQGold 100 bp DNA-Leiter	PeQ Lab
<i>Kaleidoscope Prestained Standards</i>	Bio-Rad, München

2.2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Binokularmikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Brutschrank, Cellstar	Nunc, Wiesbaden
BUXCO	BUXCO Electronics, Sharon, CT
Cytospin	Shandon, Pittsburgh, PA
Disperiergerät Ultra-Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
ELISA-Reader	Dynex Technologies, Chantilly VA
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACS	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierkryostat Leica CD1900	Vertrieb Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, München
Sterilbank Topsafe 1.5	Nunc GmbH, Wiesbaden
PeQLab primus 96 advanced	PeQLab Erlangen
Thermomixer compact	Eppendorf , Wesseling-Berzdorf

Alle verwendeten Glasgeräte wie Flaschen, Messzylinder usw. wurden 20 min bei 121°C autoklaviert und bei 100-160°C zwei Stunden hitzesterilisiert. Die verwendeten Plastikmaterialien wie Pipettenspitzen (Eppendorff, Hamburg) oder Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) wurden steril bezogen.

2.2.6 Biologisches Material / Substanzen

2.2.6.1 Mäuse

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten ausschließlich an weiblichen Balb/cJ Mäusen, die im Alter von 4 Wochen aus der Produktionszucht in den Tierstall geliefert wurden und zu Versuchsbeginn 6 Wochen alt waren. Die Mäuse wurden an Tag 0 und 14 intraperitoneal mit OVA/Alum gespritzt und nach einer weiteren Woche für die weitere Behandlung ins Labor transportiert.

2.2.6.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	Literatur
APC A20	Murine B-Zelllinie	IMDM/RPMI	Kim et al., 1979
PC61	Murine T-Zelllinie	RPMI	Lowenthal et al., 1985

Bei A20 handelt es sich um eine murine Balb/c B-Zelllinie mit adhärentem Wachstum. Diese Zellen wurden uns in freundlicher Kooperation von Prof. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

PC61 ist ein IL-2 abhängiger, zytolytischer T-Zellklon aus der Maus. Er blockiert die Bindung von IL-2 an die IL-2R α -Kette, indem er eine Konformationsänderung in CD25 verursacht. Der Antikörper wurde zum Teil von der Firma BD Biosciences, Heidelberg bezogen (Best. nr.:557325). Ein weiterer Teil wurde uns freundlicherweise von der AG Prof. E. Schmitt zur Verfügung gestellt.

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Allgemeine Methoden

Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco, Invitrogen bezogen und mit sterilem Penicillin/Streptomycin (1%), FCS (5%) und Natriumpyruvat (1%) versetzt.

2.2.7.2 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
ELISA-Platte PS Microplatte 96 <i>wells</i>	Nunc, Wiesbaden
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Filterpapiere für Cytospin	Shandon, Pittsburgh, PA
Glasplatten für Mini-Protean	Biorad, München
Kamm	Biorad, München
Kanülen, Sterican 0,45x12mm	Braun, Melsungen
Kulturflaschen (25 bzw. 75 cm ²)	Renner GmbH, Dannstadt
Kulturplatten (6-, 24-, 48- bzw. 96- <i>well</i>)	Renner GmbH, Dannstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MACS Separationssäule	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe
Microküvette Nr.1201	Ratiolab, Dreieich
Nitocellulosemembran Protran	Schleicher+Schuell, Dassel
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Chicago, IL
Petrischale	Nunc, Wiesbaden
pH Indikatorstäbchen 4,5-10,0	Machery-Nagel, Düren
Pinzette	FST, Heidelberg
Pipettenspitzen Standardtips	Eppendorf, Hamburg
Polysine-Objektträger	Menzel, Braunschweig
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenkassette	Röntgen Bender, Baden-Baden
Sieb Cell strainer 40µmNylon	BD Falcon, Bedford, MA
Spritze, Injekta F 1ml oder 5 ml	Braun, Melsungen
Sterilisationsfilter 22 µm	Millipore, Bedford, MA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, GB
Zentrifugenröhrchen 15 oder 50ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatte 24, 48 oder 96 <i>wells</i>	<i>Cellstar TC-Plate</i> , Nunc, Wiesbaden

Die Zellkulturversuche wurden in einer Sterilbank (Topsafe 1.5, Nunc GmbH, Wiesbaden) durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem elektronisch CO₂-Begasungsbrutschrank (Typ Cellstar, Nunc, Wiesbaden) in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ in sterilen Zellkulturplatten kultiviert.

2.2.7.3 Kits für ELISA

ELISA-Kits	Hersteller
IL-4	BD Pharmingen, Heildeberg
IL-5	BD Pharmingen, Heildeberg
IL-6	BD Pharmingen, Heildeberg
IFN γ	BD Pharmingen, Heildeberg
IL-10	BD Pharmingen, Heildeberg
IL13	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-15	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
CBA: <i>Mouse inflammation kit</i>	BD Pharmingen, Heidelberg

2.3 Methoden

2.3.1 Biologisches Material / Reagenzien

2.3.1.1 Versuchstiere

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich mit weiblichen Balb/c-Mäusen durchgeführt, die aus der Produktionszucht der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Klinik bezogen wurden. Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 22+/-2° C und relativen Luftfeuchte von 50 – 70 %. Die zu Beginn des Protokolls sechs Wochen alten Mäuse verblieben während der zweifachen intraperitonealen OVA-Sensibilisierung in den Räumen der ZVTE, die Aerosol- und Antikörperbehandlungen erfolgten anschließend im Labor.

2.3.2 Versuchsprotokoll

2.3.2.1 Definition der Versuchsgruppen

Folgende Versuchsgruppen wurden im Rahmen der durchgeführten Studien aufgestellt:

- Saline behandelte Mäuse als Negativ-Kontrolle
- OVA behandelte Mäuse als Positiv-Kontrolle
- OVA und i.n. anti-IL-6 Rezeptor behandelte Mäuse als Behandlungsgruppe
- OVA und i.n. gp130Fc behandelte Mäuse als Behandlungsgruppe
- OVA und i.n. IgG behandelte Mäuse als Kontrollgruppe
- OVA und i.p. anti-IL-6 Rezeptor behandelte Mäuse als Behandlungsgruppe
- OVA und i.p. IgG behandelte Mäuse als Kontrollgruppe

Für die Blockade des IL-2R wurden die im Folgenden aufgeführten Versuchsgruppen aufgestellt:

- Saline behandelte Mäuse als Negativ-Kontrolle
- OVA behandelte Mäuse als Positiv-Kontrolle
- i.n. anti-IL-2 Rezeptor α behandelte Mäuse als Behandlungsgruppe
- i.n. anti-IL-2 Rezeptor β behandelte Mäuse als Behandlungsgruppe
- i.n. IgG behandelte Mäuse als Kontrollgruppe

Die mit Antikörpern behandelten Mäuse wurden im Anschluss an die Narkose mit einer 1%igen OVA-Lösung in einer Kammer aerosolisiert.

OVA-Aerosolisierungslösung 1 %

<i>Albumin-chicken egg</i> (Ovalbumin)	1mg
PBS	100ml

2.3.2.2 Sensibilisierung der Mäuse

Das zur Induktion von Asthma verwendete Sensibilisierungsprotokoll ist aus Henderson et al. [1997] entnommen und wurde gegebenenfalls wie in der Arbeit aufgeführt modifiziert. Das Protokoll erstreckte sich über einen Zeitraum von 28 Tagen. An den Tagen 0 und 14 wurde den zu sensibilisierenden Mäusen nach Desinfektion der Injektionsstelle mit 70% Ethanol intraperitoneal 200µl OVA komplexiert mit Aluminiumpotassiumsulfat (Alum) verabreicht. Diese entspricht einer Menge von 100µg OVA.

Aluminium-Potassium-Sulfat- (Alum)-Lösung

Aluminium Potassium Sulfat	3g
aqau dest. steril	30ml
entspricht 10% (w/v)	

Saline-Gebrauchslösung

NaCl 0,9%	10ml
Alum	10ml
pH 6,5 durch 10N NaOH	

1 Stunde unter mehrfach leichtem über Kopf Schwenken bei RT inkubieren.

OVA-Gebrauchslösung

<i>Albumin-chicken egg</i> (Ovalbumin)	5mg
NaCl 0,9%	10ml
pH 6,5 einstellen durch 10N NaOH	

1 Stunde unter mehrfach leichtem über Kopf Schwenken bei RT inkubieren (Bildung des OVA-Alum-Komplexes). Nach der Inkubationszeit werden die Lösungen 5min bei 1500rpm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird der Rückstand ad 10 ml in 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert.

Um eine Verletzung innerer Organe und Gefäße durch die Injektionsnadel weitgehend auszuschließen, wurde als Injektionsort der rechte oder linke untere Quadrant des Abdomens gewählt. An den Tagen 25-27 erfolgte eine intranasale Provokation mit OVA. Hierzu wurden die Mäuse zunächst mit einer intraperitonealen Gabe von 200-250µl Avertin anästhesiert.

Avertin-Gebrauchslösung

2,2,2-Tribromoethanol	1g
t-Amyl-Alkohol	1ml
PBS	39ml

Intranasale Behandlung

Ovalbumin	10 mg
PBS	10 ml

Nach Eintritt der Narkose nach etwa 5-10 Minuten erhielten die Mäuse intranasal 50 μ l OVA in PBS, entsprechend einer Dosis von 50 μ g OVA. Für die intranasale Applikation wurde eine mit 50 μ l gefüllte Pipette direkt über der Nase der Mäuse gehalten und so entleert, dass die Tiere die Lösung aspirieren konnten.

Kontrollmäuse erhielten analog an den Tagen 0 und 14 intraperitoneal Saline/alum und an den Tagen 25-27 eine intranasale Dosis Saline.

2.3.2.3 Antikörperbehandlung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper wurden entweder intranasal oder intraperitoneal appliziert. Dabei galt es die Funktion des löslichen IL-6R durch das Fusionsprotein gp130Fc oder des membrangebundenen IL-6R zu analysieren. Das gp130Fc blockiert durch Bindung an IL-6/sIL-6R Komplexe selektiv den löslichen IL-6R, der anti-IL-6R Antikörper dagegen wirkt als Antagonist sowohl gegen die durch den löslichen als auch die durch den membrangebundenen IL-6 Rezeptor alpha-Kette vermittelten Effekte.

Antikörperlösungen

α IL-6R, gp130Fc oder IgG	50 μ g/50 μ l
PBS	50 μ l

Der α IL-6R-Antikörper wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Kishimoto, Osaka University, Japan und das gp130Fc größtenteils von Prof. Dr. Rose-John, biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Teilweise wurde das gp130Fc von R&D Systems, Wiesbaden bezogen. Das Ratten-IgG wurde uns z.T. von Prof. Dr. Schmitt, Abteilung für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein anderer Teil wurde ebenfalls von R&D Systems, Wiesbaden, bezogen. Die bei dieser Studie verwendeten Antikörper gegen die IL-2R α - und β -Kette als auch IgG₁ und IgG_{2B} wurden von der Firma BD-Pharmingen, Heidelberg bezogen. Auch hier stellte uns

Prof. E.Schmitt teilweise in freundlicher Kooperation den IL-2R α -Antikörper zur Verfügung.

Die intraperitoneale Antikörper-Behandlung (100 μ g) erfolgte mit der ersten OVA-Sensibilisierung an den Tagen 0 und 14. Die intranasale Behandlung hingegen erfolgte an den Tagen 25-27, wobei den Mäusen nach Anästhesierung täglich je nach Behandlungsgruppe eine Dosis von 50 μ g/50 μ l α IL-6R-, gp130Fc- oder IgG-Lösung verabreicht wurde. Für die zweite Studie wurden je 50 μ g/50 μ l α IL-2R α , α IL-2R β , IgG₁ oder IgG_{2B} intranasal verabreicht. Die Gabe des Antikörpers erfolgte in allen Fällen 30 Minuten vor der intranasalen Provokation mit OVA am jeweiligen Tag. In späteren Experimenten wurden die Mäuse nach dem Aufwachen aus der Narkose mit einer 1%igen OVA-Lösung aerosolisiert. Diese Behandlung erfolgte statt einer intranasalen OVA-Provokation, um eine unnötige Belastung des Immunsystems der Tiere zu vermeiden.

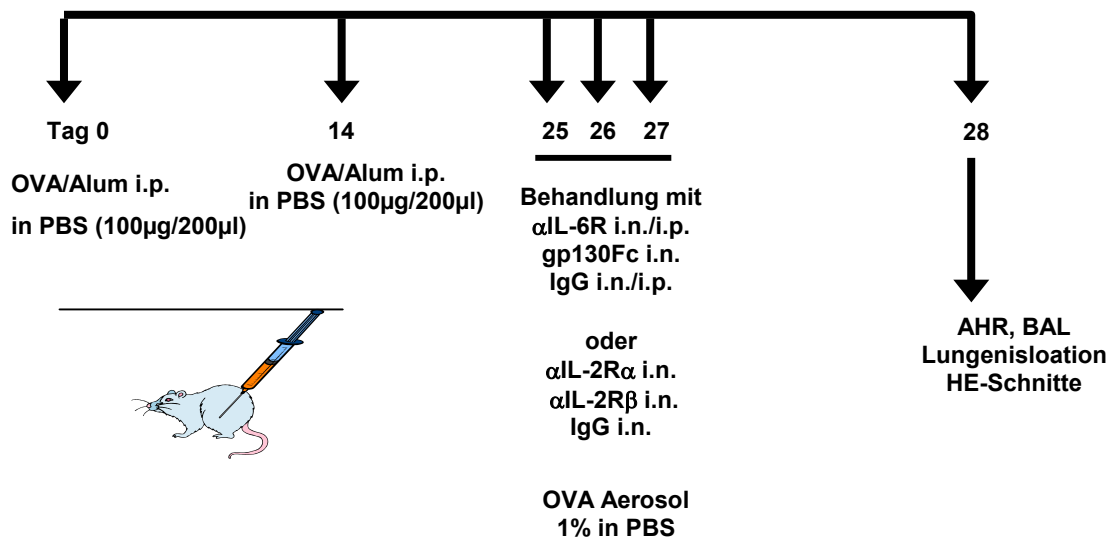


Abb. 10: Versuchsprotokoll zur OVA-Sensibilisierung und Antikörperbehandlung

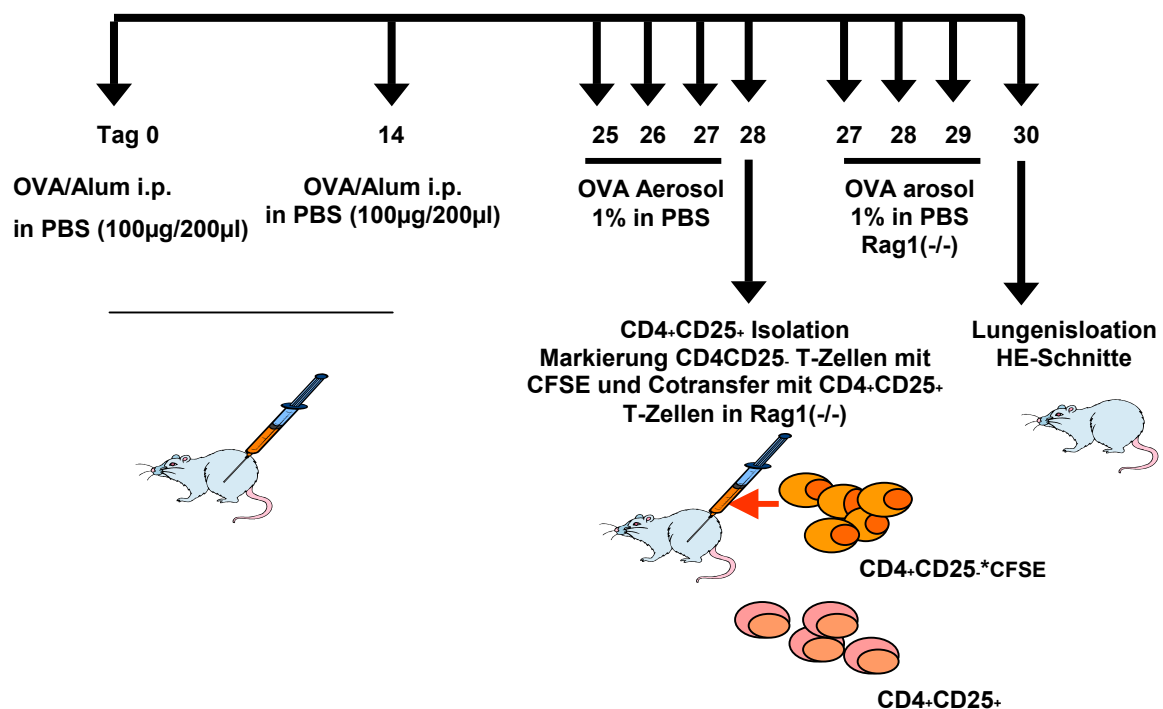


Abb. 11: Versuchsprotokoll zur OVA-Sensibilisierung und adoptiver Transfer von CD4+CD25- bzw. CD25+ T-Zellen in Rag1(-/-) Mäuse

2.3.3 Durchführung der Versuche

2.3.3.1 Invasive Messung der pulmonalen Resistance

Die invasive Messung der Atemwegshyperreaktivität erfolgte in den Versuchsgruppen Saline, OVA, OVA+ α IL-2R α , OVA+ α IL-2R β und OVA+IgG. Dazu wurden die anästhesierten und tracheotomierten Mäuse in die Kammern eines Plethysmographen gelegt, in dem der Widerstand durch den Vergleich des pulmonalen Druckes und des Körperdruckes in Abhängigkeit von der verabreichten Methacholinmenge gemessen wurde. Als Gerät wurde ein System der Firma Buxco (Buxco Electronics, Inc. UK) verwendet. Die Tiere wurden in diesem Gerät mechanisch ventiliert. Ein Schlauch wurde dabei in den Oesophagus und ein Schlauch in die Trachea eingeführt. Es wurden 10µl der jeweiligen Metacholinlösung durch einen Nebulizer direkt intratracheal verabreicht. Anschließend erfolgte die Messung der *Resistance* über einen Zeitraum von 25min mit einer Metacholinkonzentration von 0-30 mg/ml.

2.3.3.2 Durchführung der broncho-alveolären Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) wurde an Tag 28 des Protokolls durchgeführt, 24 Stunden nach der letzten OVA- bzw. Saline-Provokation [Maxeiner et al., 2007]. Dazu wurden die Mäuse mit 2-3ml Narkoren (Pentobarbital-Natrium) (75mg/kg)

anästhesiert und anschließend mit einem Skalpell die Trachea freigelegt. Hierzu wurden die oberflächlichen Fell- und Hautschichten durchtrennt. Nach dem Durchtrennen des intercartilaginären Gewebes, erfolgte eine Tracheotomie mittels Einführung eines 19 Gauge durchmessenden Tubus, der vorsichtig in den rechten Hauptbronchus vorgeschoben wurde. Bei korrekter Lage des Tubus kam es zu einem Widerstand, verursacht durch den geringeren Durchmesser des Hauptbronchus. Während der Lavage wurde der Tubus mit einem Faden an der Trachea fixiert, um ein Verschieben zu vermeiden. Das Ende des Tubus wurde über eine Kanüle an eine 1ml Spritze angeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Lavage durch viermaliges Spülen mit je 0,75ml 0,9% NaCl. Nach der BAL wurde der Thorax der Mäuse für die Organentnahme unter Durchtrennung der Rippen lateral des Sternums geöffnet und beide Lungenflügel entnommen. Die rechte lavagierte Lunge wurde für die weitere Proteinextraktion in Stickstoff eingefroren (Arpege 70 Air Liquide). Der nicht-lavagierte linke Lungenflügel wurde bis zur weiteren histologischen Aufbereitung in 10% Formalin/PBS fixiert und bei RT gelagert.

2.3.3.3 Aufbereitung der erhaltenen BAL

Die erhaltenen BAL-Proben wurden während des Versuchs auf Eis gelagert und anschließend mit 1500rpm für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels Pipette abgenommen, das Volumen bestimmt und bis zur Durchführung der ELISA's bei -80°C aufbewahrt. Das Zellsediment wurde in 1ml PBS resuspendiert und ein Aliquot von 50µl entnommen, um die Vitalität der Zellen durch Zugabe einer 0,4% Trypanblaulösung zu überprüfen. Außerdem wurden mit je 100µl der BALF Cytospins durchgeführt. Dabei wurden die Zellen 5 Minuten lang mit 450rpm bei RT auf unbeschichtete oder Polylysin-beschichtete Objektträger zentrifugiert. Polylysin ermöglicht eine Adhäsion der Zellen an der Oberfläche der Objektträger. Nach dem Trocknen der Objektträger bei RT wurden die Präparate bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.3.4 Histologie des Lungengewebes

Die histologische Aufarbeitung des in 10% Formalin/PBS fixierten Lungengewebes erfolgte in freundlicher Kooperation mit Prof. Dr. Lehr, Institut für Pathologie Lousanne, Schweiz. Die Proben wurden nach einem Standardprotokoll in Paraffin gebettet und mit Hematoxilin-Eosin (HE) gefärbt. Diese Färbungen erlauben eine Analyse der histologischen Struktur der Lunge als auch der Mukusproduktion durch bronchiale Becherzellen. Zur Auswertung der Entzündung in den Atemwegen wurde

zunächst unter dem Mikroskop der Grad der vorliegenden Inflammation in den HE gefärbten Lungengewebe eingeschätzt. Anschließend wurde zur genauen Quantifizierung Prof. Dr. Lehr als unabhängiger Pathologe hinzubezogen. Mit Hilfe von Photoshop wurde die Anzahl inflammatorischer Zellen pro mm² peribronchiales Areal festgestellt. Dazu wurden je Versuchstier 4 repräsentative Felder (je 150.000µm²) bei 250-facher Vergrößerung aufgenommen, wobei ein flächenmäßiger Abzug der Bronchial- und Gefäßlumina in Photoshop erfolgte. In der verbleibenden Fläche erfolgte die Auszählung der Zellkerne. Die so ermittelte Zahl umfasst jedoch Entzündungszellen als auch Alveolarwandzellen. Um den Wert der reinen Entzündungszellen zu ermitteln, wurde die in der histologisch unauffällig erscheinenden Negativkontrolle ermittelte, den Alveolarepithelien entsprechende Zellzahl als physiologischer Basalwert zugrunde gelegt und von den in den übrigen Versuchsgruppen gewonnenen Zahlen abgezogen.

2.3.3.5 Färbung der Cytospin-Objektträger mit Diff-Quick

Für die Zählung von Eosinophilen, Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen wurden die Cytospin-Objektträger zur besseren Unterscheidung mit Diff Quick (Medion Diagnostics AG, CH-3186 Düringen) angefärbt. Dafür wurden die Objektträger kurz aufgetaut, bei RT getrocknet und 3x1 sec in einer Küvette mit Fixierlösung inkubiert. Es erfolgte eine 3x1 sekundige Färbung in Lösung 1 und anschließend 3x1 sec in Lösung 2. Die Objektträger wurden zur Entfernung überschüssiger Farbreste in Küvetten mit aqua dest. gewaschen, bis keine Farbwolke mehr austrat und bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Präparate mit *Entellan Mounting Medium* eingedeckt.

DiffQuick:

Fixierlösung:	<i>Fast Green (0,002g/l) in methanol</i>
Färbelösung 1:	<i>Eosin Y (1,22g/l) in phosphate buffer (pH 6,6) and 0,1% (w/v) sodium azide as preservative</i>
Färbelösung 2:	<i>Thiazine Dye (1,1g/l) in phosphate buffer (pH 6,6)</i>

Mit der Diffquick-Färbung werden Zellkerne violett angefärbt, das Cytoplasma erscheint heller. Granulozyten weisen im Unterschied zu Monozyten und Lymphozyten eine Segmentation des Zellkerns auf. Die Zählung erfolgte mikroskopisch nach morphologischen Kriterien an ca. 100 Zellen bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der eosinophilen

Granulozyten zu den Monocyten bestimmt. Durch eine mäanderförmige Durchmusterung des Cytospins wurde das gesamte Präparat somit repräsentativ erfasst.

2.3.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgte durch die Trypanblau-Exklusionsmethode. Der Farbstoff Trypanblau liegt im physiologischen pH-Bereich als Anion vor, kann leicht an Proteine binden und diffundiert so bei geschädigten Zellen ins Cytoplasma. Trypanblau kann intakte Plasmamembranen nicht durchdringen, daher werden keine lebenden Zellen angefärbt. Tote Zellen hingegen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop blau.

Für die Durchführung wurde das Zellsediment in einem definierten Volumen, abhängig von der Größe des Sediments in 5 oder 10ml Medium, resuspendiert, ein Aliquot von 10µl aus der jeweiligen Zellsuspension entnommen und mit einer 0,4% Trypanblaulösung 1:1 verdünnt. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen wurde anschließend in einer Thoma-Zählkammer bei 300-facher Vergrößerung in 2 Quadraten zu je 16 Feldern ausgezählt. Die Thoma-Zählkammer weist ein genau definiertes Volumen auf, so dass man die Zellzahl im Sediment berechnen kann.

2.3.4 Medienzusätze

Antibiotika

In der Zellkultur werden zur Vermeidung von Kontaminationen Antibiotika wie Penicillin (zur Hemmung der bakteriellen Zellwand-Synthese) und Streptomycin (zur Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese) eingesetzt. Die fertige, sterile Stammlösung wurde von der Firma Biochrom, Berlin (1000 U/ml) bezogen und bei -20°C aufbewahrt.

Energiequellen

L-Glutamin

Die Aminosäure Glutamin ist eine der wichtigsten Kohlenstoffquellen für kultivierte Zellen. Gleichzeitig dient es als Ausgangsstoff für die weitere Synthese von Biomolekülen und Proteinen. Wegen der hohen Instabilität kann Glutamin durch die im Medium befindlichen Glutaminasen oder auch nicht enzymatisch abgebaut werden. Deshalb wird die fertige, sterile Stammlösung (200 mM, Biochrom KG, Berlin) in Aliquots bei -20°C aufbewahrt und erst vor Gebrauch dem Medium zugesetzt.

Natriumpyruvat

Natriumpyruvat dient kultivierten Zellen als ein weiterer Energielieferant. Zusammen mit Glutamin wird dieser nach Zellaufnahme über den Citratzyklus in den Energiestoffwechsel eingeschleust [Morgan und Darling, 1994]. Die fertige, sterile Stammlösung (100mM, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) wird bei 4°C aufbewahrt.

Fötales Kälberserum (FCS)

Um eine optimale Zellvermehrung zu gewährleisten, ist es erforderlich, dem Grundmedium zusätzlich tierische Seren zuzugeben. Diese Seren liefern in nicht definierten Konzentrationen wichtige wachstumsfördernde Substanzen, u.a. Hormone, Lipide und Spurenelemente. Das FCS wurde vor Gebrauch hitzeinaktiviert (56°C, 60min), um die darin enthaltenen, hitzelabilen Komplementfaktoren zu zerstören, da es bei einer Komplementaktivierung zur Lyse und Abtötung der Zellen kommen kann [Morgan und Darling, 1994].

2.3.5 Zellkulturmedien

Für die Zellkultur wurde RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin) als Basismedium verwendet. Das Medium wurde als fertige, sterile Lösung bezogen und bei 4°C aufbewahrt.

RPMI-Gebrauchsmedium:

RPMI-1640 Grundmedium, pH 7,2 komplementiert mit	
FCS	10% (v/v)
Natriumpyruvat	1% (v/v)
L-Glutamin	1% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml

DMEM-Gebrauchsmedium:

DMEM-Grundmedium, pH 6,9	
FCS	10% (v/v)
Natriumpyruvat	1mM
L-Glutamin	2mM

Für die Kultur der antigen-präsentierenden A20-Zelllinie wurde IMDM als Grundmedium verwendet. Das Medium wurde als fertige, sterile Lösung (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) bezogen und bei 4°C aufbewahrt und wie folgt supplementiert.

Iscove's modified Dulbecco's eagle Medium (IMDM-Gebrauchsmedium):

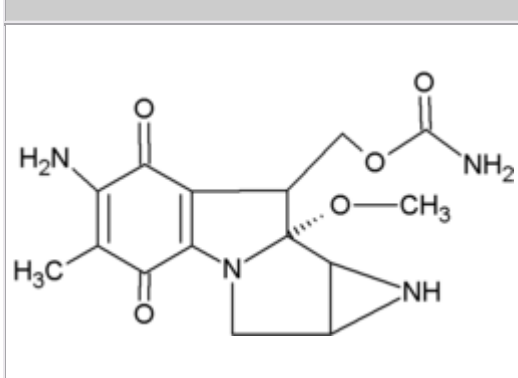
IMDM-Grundmedium, pH	
FCS	5% (v/v)
Natriumpyruvat	1mM
L-Glutamin	2mM
β -Mercaptoethanol	0,05 mM

2.3.6 Zellkultur**2.3.6.1 Passage und Aussaat der Antigen-präsentierenden Zellen**

Die Passage der APCs erfolgte alle 2-3 Tage. Die adhärenenten A20-Zellen wurden zunächst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kulturflasche gelöst und abzentrifugiert (1200rpm, 4°C, 10min, Megafuge 1.0R Heraeus, Heraeus GmbH, Hanau) und einmal mit IMDM-Gebrauchsmedium gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wurde eine bestimmte Zellzahl eingestellt und anschließend 2×10^6 Zellen in 10ml Gebrauchsmedium in eine kleine Kulturflasche (25cm², Renner GmbH, Dannstadt) ausgesät.

2.3.6.2 Mitomycin C-Behandlung

Mitomycin C

**Abb. 12: Strukturformel von Mytomycin C**

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/>

Mitomycin C ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces caesipitorus*, das nach einer enzymatischen Aktivierung zwischen zwei Strängen der DNA interkaliert. Dadurch werden beide DNA-Stränge kovalent gebunden, so dass eine Dissoziation der DNA-Stränge, wie sie zur Replikation bzw. auch zur Transkription benötigt wird, nicht mehr möglich ist. Als Folge dessen wird die DNA-Synthese gehemmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die APC's mit Mitomycin C behandelt, damit diese selbst den Zellzyklus einstellen und den zu proliferierenden Zellen Antigene präsentieren. Zur

Mytomicin C Behandlung wurden 2×10^7 Zellen in 1ml Medium aufgenommen, mit 60µl Mytomicin C (Sigma M4287) versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5x mit Medium (RPMI, FCS (5%), Pen/Strep (1%)) gewaschen, um überschüssiges Mitomycin C auszuwaschen. Die Zellen wurden dann mit Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt (z.B. 1×10^4 /ml).

2.3.6.3 5-und 6- Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFSE)

Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFDA/CFSE) ist ein Farbstoff, der passiv in das Zellinnere eindringt und dort spontan und irreversibel an zelluläre Proteine bindet. Er ist eine Alternative zu BrdU oder zur [3H]-Thymidin-Inkorporation. Das Besondere an CFSE aber ist, dass die Fluoreszenz in ruhenden Zellen über Monate anhält und die Intensität sich bei proliferierenden Zellen bei jeder Teilung halbiert. Der Farbstoff wird dabei in gleicher Menge an die Tochtergeneration weitergegeben. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität ist somit ein Hinweis auf die Vermehrung der Zellen, welche bei einer Wellenlänge von 488 nm und im FL1 Kanal detektiert werden.

Für die CFSE-Färbung wurde die Zellsuspension zuerst in PBS gewaschen, um lösliches *Bovine Serum Albumin* (BSA) aus dem *magnetic activated cell sorting* (MACS) Puffer zu entfernen und in PBS aufgenommen. Während dessen wurde aus der 5mM CFSE (Molecular Probes) Stammlösung und PBS ein 2,5µM konzentrierter Farbmix hergestellt. Das Zellsediment wurde 1:1 mit der CFSE-Lösung gemischt, so dass sich etwa eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml ergab und bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach exakt 4min wurde die Reaktion durch Zugabe von doppelter Menge Medium mit 10% FCS abgestoppt und abzentrifugiert (10min, 4°C, 1200rpm). Anschließend wurde die überschüssige Menge Farbstoff durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden auf 1×10^6 /ml eingestellt und für Proliferationsversuche ausgesät.

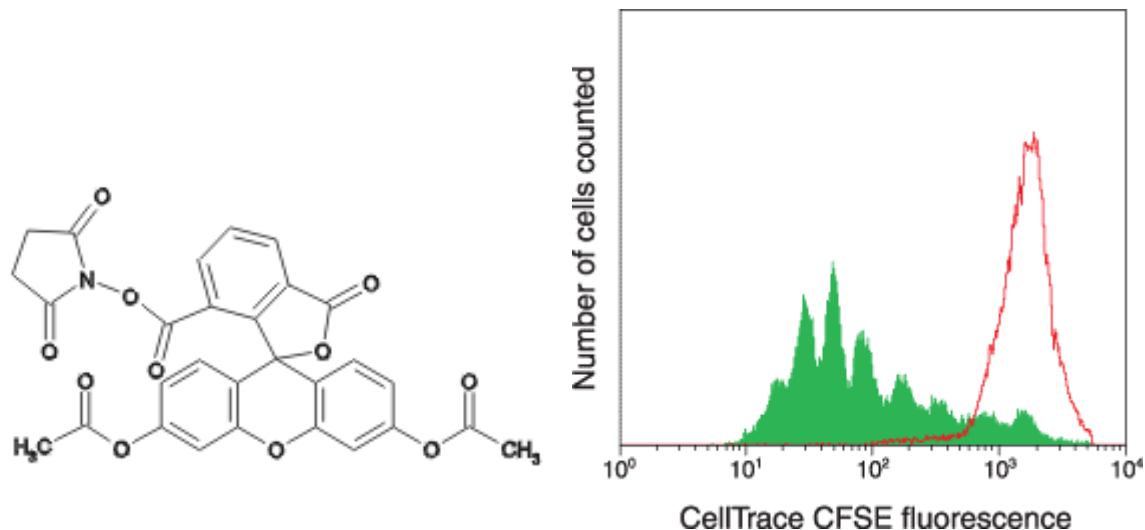


Abb. 13: Proliferation CFSE-markierter Zellen

Quelle: a) www.dojindo.com/.../staining/89gif/cfse.gif (links)

b) probes.invitrogen.com/handbook/images/g002344.gif (rechts)

Dargestellt ist links die Strukturformel von CFSE und rechts die Proliferation CFSE-markierter Zellen. In rot ist der erste Teilungszyklus der CFSE-markierten Zellen nach 20 Stunden gezeigt. Die grünen *peaks* geben weitere Zellteilungen an. Durch die Teilung einer CFSE-markierten Zelle in zwei Tochterzellen wird die mittlere Fluoreszenzintensität halbiert. Somit nimmt nach jeder Zellteilung die Intensität des CFSE um den Faktor zwei ab. Diese Abnahme kann als Proliferation im FACS gemessen werden.

2.3.7 Zellisolation

2.3.7.1 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Milz mit MACS

Zur CD4 Isolierung herangezogene Tiere wurden im Alter von ca. 8 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Direkt im Anschluss wurde das Eingriffsgebiet mit 70% Ethanol desinfiziert und die Milz durch einen Flankenschnitt unter Durchtrennung oberflächlicher Haut- und Gewebeschichten und des Peritoneums mit einer Präparationsschere und Pinzette freigelegt. Dann wurde die Milz an ihrem Gefäßstiel abgetrennt, von verunreinigenden Gewebsresten gelöst und auf ein 50ml Falcon aufgesetztes Sieb (Porengröße $40\mu\text{m}$) überführt. Mit dem Kolben einer 1ml Spritze (Braun, Melsungen) wurde die Milz vorsichtig durch das Sieb passiert und mehrmals mit Medium nachgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit 1500rpm 5 min und bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment zur Lyse der Erythrozyten in 10ml ACK-Lysepuffer resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT mit ACK-Lysepuffer wurden die verbliebenen Zellen abzentrifugiert und 2x in Medium gewaschen.

ACK-Lysepuffer

NH ₄ Cl	8,26 g
KHCO ₃	1,0 g
Na ₂ EDTA	0,367 g
aqua dest.	ad 1l
sterilfiltrieren	

MACS-Puffer (Fa. Miltenyi)

PBS/EDTA	500 ml
BSA	0,5%(w/v)
10-15min. entgasen im	
Ultraschallbad, danach sterilfiltrieren	

Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Zellen in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und ein Aliquot von 10µl 1:10 in MACS-Puffer verdünnt, dann 1:1 mit Trypanblau verdünnt und die Zellzahl durch Auszählen eines 16 kleine Felder umfassenden Quadrates in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl/ml errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Gemittelte Zellzahl} \times 2 \times 10^4 \times 10 \times 10\text{ml}$$

Der Faktor 2 in dieser Formel ergibt sich aus der Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau, der Faktor 10^4 aus dem Fassungsvermögen der Neubauer-Zählkammer und der Faktor 10 aus der Verdünnung des Aliquots. Die 10ml sind die Menge, in der die Zellen vor dem Auszählen in MACS-Puffer aufgenommen wurden. Nach dem Zählen wurden die Zellen bei 300xg 10min. abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Das Sediment wurde pro 10^7 Zellen in 90µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µl/ 10^7 Gesamtzellen gegen CD4 (L3T4) *MicroBeads* von Miltenyi (Bergisch Gladbach) gerichteten Antikörpern 15min bei 4°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Diese *MicroBeads* ermöglichen eine magnetische Markierung der CD4 positiven Zellen, die an der Säulenwand zurückgehalten werden, während die übrigen unmarkierten Zellen diese ungehindert passieren können. In der Zwischenzeit wurde die in den MACS-Magneten eingelegte Säule mit 1ml MACS-Puffer äquilibriert und anschließend mit der vorbereiteten Zellsuspension beschickt. Die Säule wurde nun 3x mit je 1ml MACS-Puffer nachgespült und das Eluat, das die Negativfraktion enthält, aufgefangen. Die die Positivfraktion enthaltende Säule wurde aus dem Magneten entnommen, mit 1ml MACS-Puffer beschickt und durch schnelles und kraftvolles Herunterdrücken des Kolbens das Eluat gewonnen. Nach dem Auszählen der erhaltenen CD4-positiven Zellen wurden diese in Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. In einem *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Gerät (FACS Calibur BD Bioscience, Heidelberg) wurde die Reinheit der

aufgereinigten CD4⁺ Fraktion gemessen und mit einer Reinheit von über 95% wurden die Zellen für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.3.7.2 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Lunge mit MACS

An Tag 28 des Versuchs wurden nach Durchführung der BAL die Lungen entnommen und in einem mit Medium (RPMI, 1% Penicillin/Streptomycin) gefüllten 15ml Falconröhrchen bis zur Präparation aller Lungen auf Eis aufbewahrt. Meist wurden die Lungen von 2 Mäusen vereint, unter der Sterilbank in eine Petrischale überführt und mit einem Skalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Lungengewebe wurde anschließend in 15ml Falcon mit Kollagenase/DNase-Lösung (300U/ml Kollagenase TypII, 0,001% DNase in PBS) überführt und für 1h bei 37°C unter horizontalem Schütteln bei 300rpm inkubiert. Die Kollagenase/DNase Lösung dient zur Verdauung der extrazellulären Matrix im Lungengewebe. Danach wurde die Lösung inklusive noch nicht verdauter Gewebereste durch ein in ein 50ml Falcon eingelegtes 40µm Sieb passiert und mit 5ml Medium nachgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 1500rpm für 5min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment zur Lyse der Erythrozyten für 5min bei Raumtemperatur in 10ml ACK-Lysepuffer resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen in 10ml PBS wurden die Zellen in 10ml MACS-Puffer resuspendiert. Ein 10µl Aliquot wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Isolierung der CD4-positiven Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit gegen murines CD4 (L3T4) gerichteten *MicroBeads* von Miltenyi.

MACS-Puffer

PBS/EDTA	500 ml
FCS	5% (w/v)
Sterilfiltrieren	

2.3.7.3 Isolierung CD4⁺CD25⁺ positiver T-Zellen mit MACS

Zur Isolierung CD4⁺CD25⁺ positiver Zellen wurde ein CD4⁺CD25⁺ Regulatorische T-Zell-Isolations-Kit von Miltenyi nach Angaben des Herstellers benutzt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Isolierung der Zellen in zwei Schritten. Dabei folgt auf eine Depletion von nicht CD4⁺ Zellen eine positiven Selektion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Für die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen, werden nicht CD4⁺ Zellen indirekt mit einem Antikörpercocktail magnetisch markiert. Dieses *Cocktail* besteht aus Biotin konjugierten monoklonalen Antikörpern und anti-Biotin MicroBeads (monoklonale

anti-Biotin Antikörper gegen R-Phycoerythrin (PE); Klon: Bio3-18E7.2; Isotyp: Maus IgG1).

Biotin-Antikörper-Cocktail gegen:

CD8 (Ly-2; Isotyp: Ratte IgG2a)
CD11b (Mac-1; Isotyp: Ratte IgG2b)
CD45R (B220; Isotyp: Ratte IgG2a)
CD49b (DX5; Isotyp: Ratte IgM)
und Ter-119 (Isotyp: Ratte IgG2b)

Parallel dazu werden die Zellen mit CD25-PE markiert und die Zellsuspension auf eine Säule beladen, die einem Magnetfeld ausgesetzt ist. Die magnetisch markierten nicht CD4⁺ Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten, CD4⁺ Zellen die Säule ungehindert passieren. Für die Isolierung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen werden die in der angereicherten CD4⁺ Fraktion mit dem Farbstoff PE markierte CD25⁺ T-Zellen nun mit magnetisch markierten anti-PE MicroBeads gekoppelt. Anschließend wird die Zellsuspension wieder auf eine Säule übertragen und magnetisch aufgetrennt. Die magnetisch markierten CD4⁺CD25⁺ Zellen verbleiben in der Säule während die CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durchlaufen. Anschließend wird die Positivfraktion enthaltende Säule aus dem Magneten entnommen, mit 1ml MACS-Puffer beschickt und durch schnelles und kraftvolles Herunterdrücken des Kolbens das Eluat gewonnen. Um eine höhere Reinheit zu erzielen wird die Positivfraktion nochmals auf eine neue Säule geladen und aufgetrennt.

2.3.7.4 Isolierung CD4-positiver T-Zellen aus der Lunge mit Dynal

Nach der BAL erfolgte die Entnahme der Lungen wie bereits in Abschnitt 2.3.7.2. beschrieben. Für die Isolierung der CD4 positiven T-Zellen wurde gegen murines CD4 gerichtete *Dynabeads* (Dynal, Hamburg) benutzt. Hierzu wurden 25µl *Dynabeads*/10⁷ Zellen in 5ml MACS-Puffer angesetzt und einmal in MACS-Puffer gespült.

MACS-Puffer

PBS/EDTA	500 ml
FCS	3% (w/v)
sterilfiltrieren	

Um die *Beads* vom Waschpuffer zu trennen, wurden die 15ml Falcon für 2min in den DYNAL-Magneten eingesetzt, der Überstand vorsichtig abpipettiert, verworfen und die *Beads* erneut in MACS-Puffer resuspendiert. Die *Beads* wurden in dem Puffer auf die einzelnen Ansätze entsprechend der enthaltenen Zellzahl verteilt und bei 4°C unter kontinuierlichem Rotieren 20min inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 2min in den Dynal-Magneten eingesetzt, bis die an *Beads* gekoppelten CD4-positiven Zellen an die Wand des Falcons adhärirt waren. Die nicht an die *Beads* adhärirten Zellen im Überstand enthalten die Negativfraktion. Diese wurden mit einer Pipette vorsichtig abgehoben, abzentrifugiert und das Pellet bei -80°C eingefroren. Zum *Detachen* der anti-CD4 *Beads* wurde die Positivfraktion anschließend nach Angaben des Herstellers mit 10µl *Detachabeads*/10⁶ Zellen 45min unter ständigem Rotieren bei RT inkubiert, um eine Durchmischung des Inhaltes zu gewährleisten. Nach 3-maligem Waschen wurden die Proben in 300µl Medium (RPMI, 1% Penicillin/Streptomycin, 5% FCS) resuspendiert. Es erfolgte eine Zellzählung und jeweils 5x10⁵ Zellen wurden für die Reinheitsanalyse im FACS entnommen. Für die Kultur der Zellen wurde die Zellzahl auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt und in eine mit 200µl anti-CD3 (3µg/ml) *gecoatete* 48-well Platte (*Cellstar TC-Plate*, Nunc, Wiesbaden) pipettiert.

Coaten der Zellen (für 10 wells einer 48-well -Platte)

αCD3	50µl
NaHCO ₃ (0,1M)	5 ml
pH 8,2	

500µl/well pipettieren und über Nacht bei 4°C oder 1h bei 37°C inkubieren, anschließend Lösung absaugen und 1x mit PBS waschen

Zur Erzielung einer optimalen Aktivierung der T-Zellen wurden diese zusätzlich mit anti-CD28 in Kultur in einer Konzentration von 2,5-3µg/ml stimuliert. Die Antikörper als auch das IgG wurden in einer Konzentration von 10ng/ml eingesetzt. Mit Saline behandelte Tiere dienten als Negativkontrolle, wobei OVA, IL-6 und IgG behandelte Tiere als Positivkontrollen dienten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in gesättigter Wasserdampfatmosphäre über 24 Stunden.

2.3.8 (Fluorescence Activated Cell Sorting) FACS

Die Durchflusszytometrie dient zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen. Das Prinzip besteht darin, dass fluoreszenz-markierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander zwei Laserstrahlen passieren, einen 488nm Argonlaser und einen 635nm Diodenlaser [Diamond und De Maggio,1992]. Dabei werden zum einen geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringeren Winkel gestreute Licht, das vorwiegend mit der Zellgröße korreliert, wird als Vorwärtsstreulicht (FCS), das um 90° reflektierte Licht, das mit der Granulität und Membranfaltung korreliert, als Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen. Außerdem können über die Anregung des Argonlasers das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlänge 530nm (FL1), 585nm (FL2) und 650nm (FL3) und über die Anregung des Diodenlasers zusätzlich die Fluoreszenz der Wellenlänge 661nm (FL4) gemessen werden [Löhning, 2000]. Die Fluoreszenz-Signale wurden in logarithmischer Verstärkung, die Signale der FSC und SSC-Streulichter dagegen linear aufgenommen. Bei der Auswertung wurden die gewünschten Zellpopulationen in elektronischen Analysefenstern, sogenannten *gates* analysiert. Dabei wurden tote Zellen und Zelltrümmer über Vorwärts-Seitwärtsstreulicht und Propidiumiodid ausgeschlossen.

2.3.8.1 Aufbereitung der kultivierten T-Zellen für die FACS-Analyse

Direkt nach der Zellisolierung wurde ein Aliquot von 5×10^5 Zellen in MACS-Puffer für die Färbung von Oberflächenstrukturen entnommen. Die Zellsuspension wurde bei 1500rpm für 5min und 4°C abzentrifugiert und in 100µl PBS aufgenommen. Mit den folgenden Antikörpern wurden die Zellen gefärbt:

Isotyp-Kontrollen:		Antikörper	
Iso-PE	2,5µl	CD4	0,5mg/ml
PE	2,5µl	CD25	0,5mg/ml
Iso-FITC	1µl	CD8	0,5mg/ml
FITC	1µl	NK	0,5mg/ml

Der Färbemix enthielt die gewünschten Antikörperkonjugate in den austritierten Konzentrationen in PBS. Die Inkubation der Proben erfolgte für 30min. bei 4°C unter Lichtausschluß. Anschließend wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt und

abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit 250-500µl 2%igem, frisch angesetztem PFA in PBS fixiert und die Färbungen am FACS-Gerät (FACS Calibur BD Bioscience, Heidelberg) detektiert.

2.3.8.2 Intrazelluläre Foxp3 Färbung

Die Reagenzien und das Protokoll für die intrazelluläre Färbung wurden von eBioscience, San Diego, USA nach Angaben des Herstellers benutzt. Dafür wurden 1×10^6 Zellen in 100µl Fixierungs/Permeabilisierungspuffer in einer 1:3 Verdünnung aufgenommen. Anschließend wurden für die Oberflächenfärbung CD4FITC (eBiosciences, San Diego, USA) und CD25PE-Cy7 (eBiosciences, San Diego, USA) Antikörper in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Die Proben wurden gemischt und über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit zweimal 2ml 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellsediment wurde 1:100 mit Foxp3 (FJK16s) Antikörper in 1x Permeabilisierungspuffer aufgenommen und für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 2ml Permeabilisierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in 200µl MACS-Puffer aufgenommen und in einem FACS-Gerät (BD Pharmingen, Heidelberg) analysiert.

2.3.9 Messung der Cytokine mittels ELISA

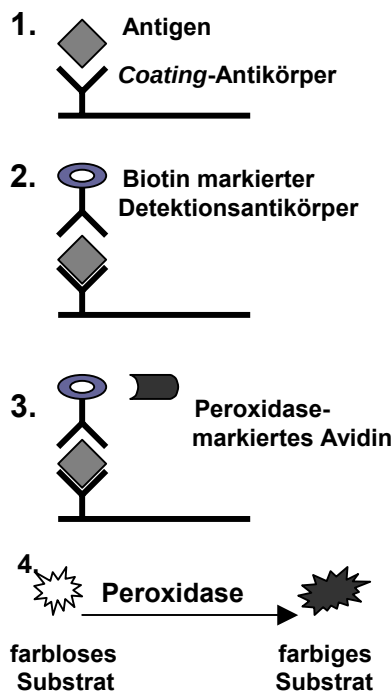


Abb. 14: Prinzip des *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach der *Sandwich-Methode*

Die Erläuterung der schematischen Darstellung ist im Text beschrieben.

Als Nachweis der Cytokinproduktion in den T-Zellüberständen bzw. der BALF erfolgte ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach der *Sandwich-Methode* (Abb.14). Dabei wird ein spezifischer *Coating-Antikörper*, der über Nacht an eine Mikrotiterplatte bindet, mit einer Antigenlösung inkubiert. Der Komplex wird gewaschen und mit einem zweiten, Biotin-markierten Detektions-Antikörper inkubiert, der das Antigen ebenfalls spezifisch erkennt. Nach einem weiteren Waschschrift wird Peroxidase-markiertes Avidin zugegeben, das kovalent an das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet. Das gekoppelte Enzyme bewirkt, dass eine erfolgte Antigen-Antikörper-Bindung indirekt dadurch sichtbar gemacht wird, dass aus einem farblosen Chromogen ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht, das photometrisch bestimmt werden kann.

Für den Nachweis der Zytokinproduktion erfolgte die Stimulierung der Zellen (1×10^6 Zellen) in 1ml einer 24- bzw. 48-*well*-Kulturplatte (Renner GmbH, Dannstadt) für 24 Stunden mit $3\mu\text{g/ml}$ anti CD3. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Zum Nachweis der murinen Cytokine in den Zellkulturüberständen als auch der Lavage wurden ELISA-Kits eingesetzt, die nach Angaben des Herstellers verwendet wurden.

2.3.9.1 *Cytometric Bead Array* (CBA)

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) ist ein Detektions-System, bei dem gleichzeitig bis zu 6 verschiedene Cytokine im Zellkulturüberstand quantitativ am Durchflußzytometer bestimmt werden können. Prinzipiell handelt es sich hierbei um einen Sandwich-ELISA, bei dem der *Capture-Antikörper* jedoch nicht an eine Mikrotiterplatte, sondern an Polymerkügelchen (*Beads*) gekoppelt ist. Diese *Beads*

wiederum tragen Fluoreszenzmoleküle in sich, mit deren Hilfe sie im Durchflußzytometer eindeutig identifiziert werden können. Dabei existiert für jedes zu bestimmende Cytokin eine Population an spezifischen *Capture Beads*, die sich in Farbe und Intensität oder der Größe unterscheiden. In einem zweiten Schritt bindet der spezifische Detektionsantikörper, der in einer anderen Fluoreszenz (FL-2) eingesetzt wird, an den Komplex aus *Capture-Bead* und Cytokin. In dieser Arbeit wurde ein Mouse Inflammation Kit von BD Pharmingen, Heidelberg für die Cytokine IL-6, IL-10, IFN γ , TNF und IL-12p70 und für das Chemokin MCP-1 nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.3.10 Proteine und Verarbeitung

2.3.10.1 Proteinextraktion

Für die Isolierung der Gesamtproteine aus der Lunge wurde zunächst ein Inhibitormix hergestellt und anschließend der rechte lavagierte Lungenflügel in einem Dispergiergerät in dem Mix homogenisiert. Nach jeder Probenaufbereitung wurden die verwendeten Geräte gründlich mit Wasser und 70% Ethanol gesäubert, um eine Verunreinigung der nachfolgenden Probe zu vermeiden.

Inhibitormix

PBS	325µl (v/v)
Aprotinin	25 µl
Trypsininhibitor (5mg/ml)	25µl
10% Nonidet P40	25µl

Aprotinin und Trypsininhibitor verhindern die Wirkung frei gewordener Proteasen. Das Detergenz Nonidet dagegen dient zur Lyse der Zellmembranen. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben anschließend zwecks zusätzlichen Aufbrechens noch intakter Zellmembranen 2min bei RT im Ultraschallbad behandelt. Danach wurden sie für 15 Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss 30min mit 12000rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der das Protein enthält, wurde abgehoben, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.3.10.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der im Zelllysat enthaltenen Proteine wurde dann kolorimetrisch nach der Methode von Bradford wie von Ausubel et al. [1995] beschrieben, bestimmt.

Dazu wurde zunächst eine Leerprobe (Nullwert), eine Standardreihe und eine 1:10 Verdünnung der jeweiligen Proteine wie folgt zusammenpipettiert:

Proteinkonzentration Standardverdünnungsreihe	BSA-Standard 2mg/ml Bradford-Farblösung und PBS
Für Leerwert : 2 µl Inhibitormix 200 µl Farbreagenz 800 µl PBS	
2 µg/ml	1 µl BSA-Standard, 200µl Farblösung, 800 µl PBS
4 µg/ml	2 µl „ „ „ „
8 µg/ml	4 µl „ „ „ „
16 µg/ml	8 µl „ „ „ „
Testproben	2 µl Protein (1:10 verdünnt) „ „

Tabelle 1: Pipettierprotokoll zum Bestimmen der Proteinkonzentration nach Bradford

Zunächst wurden 800µl PBS und 200µl Farblösung in Plastikkuvetten (Halbmikro Einmalküvetten Ratiolab, Dreieich) pipettiert. Zu dieser Lösung wurden die einzelnen Proben zupipettiert und die Küvetten mit Parafilm verschlossen. Durch mehrmaliges Schwenken wurden die Proben mit der Farblösung durchmischt und nach Nullabgleich mit Hilfe der Leerwertprobe die Extinktion der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen (GeneQuant; Biochrom Ltd Cambridge Science Park Milton Road CAMBRIDGE CB4 0FJ, UK). Zur Erzielung exakterer Messergebnisse wurden die Proben doppelt bestimmt. Anschließend erfolgte eine Errechnung des Mittelwertes aus beiden erhaltenen Extinktionswerten. Mit Excel wurde dann anhand der Konzentrationen und der gemittelten Extinktionswerte der Standardverdünnungsreihe eine Regressionsgerade mit zugehöriger Funktionsgleichung erstellt. Zur Errechnung der Proteinkonzentration der jeweiligen Testproben in µg/µl wurde die Funktionsgleichung nach x aufgelöst und der mit 5 multiplizierte Extinktionswert als Variable y eingesetzt. Dabei ergibt sich der Multiplikationsfaktor 5 aus der Probenverdünnung von 1:10 und dem eingesetzten Probenvolumen von 2µl. Für die Western-Analyse wurden jeweils 50µg Protein verwendet.

2.3.10.3 Western Blot

Das Prinzip des *Western Blots* beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Komponenten eines Proteingemisches in einem Natriumdodecylsulfat

(SDS) haltigen Puffer (SDS-PAGE) in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse. Die Elution der Proteine aus dem Gel erfolgt mit Hilfe des an die Proteine direkt gebundenen SDS und durch freies SDS in der Gelmatrix, da SDS aufgrund seiner Größe während des Blotvorgangs schneller wandert als Proteine. Somit werden mit fortschreitender Transferzeit SDS und Proteine zunehmend getrennt. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert und für die darauffolgende Immundetektion immobilisiert. Dabei werden bestimmte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurde in dieser Arbeit ein ECL (*enhanced chemiluminescence of luminol*) Western-Blot-Analysesystem (Amersham Buchler, Braunschweig) eingesetzt. Der eingesetzte Zweitantikörper, der an den Antigen-spezifischen Erstantikörper bindet, ist mit dem Enzym Peroxidase markiert. Unter alkalischen Bedingungen findet eine enzymatisch katalysierte Oxidation des Substrats Luminol statt, wobei Licht freigesetzt wird, das zu einer Filmschwärzung führt.

2.3.10.4 Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen überdeckt. Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lugtenberg et al. [1975]. Die Elektrophorese der Gesamtproteine der Lunge erfolgte unter Verwendung eines SDS-haltigen Puffersystems in einer Gelkammer (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers. Für die Bestimmung der Molekularmasse wurde ein *Kaleidoscope prestained*-Standard (BioRad, München) mitgeführt. Der fertige Proteinstandard wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.3.10.5 Gießen eines Polyacrylamidgels (PAA)

Für die Elektrophorese wurden zwischen 2 Glasplatten ein 0,75mm dickes 15% PAA Gel in einer Gel-Gieß-Kammer von BioRad (München) gegossen. Die Glasplatten wurden vor Gebrauch gründlich mit Aqua dest. und Isopropanol gereinigt und in einer Einspannvorrichtung (BioRad, München) fixiert. In dieser Arbeit wurden 15% Gele hergestellt.

Gelpuffer, pH 8,45

Tris-HCl	3 M
SDS	0,3%
aqua dest.	ad 100 ml

Trenngel (10%) Stammlösung

Gelpuffer	10 ml (w/v)
Polyacrylamid 40%	7,3 ml (w/v)
Glycerin	4g (w/v)
aqua dest.	8,7 ml

Sammelgel (5%) Stammlösung

Gelpuffer	3,1 ml
PAA 40%	1,2 ml
aqua dest.	8,2 ml

Trenngel (10%) Gebrauchslösung

Stammlösung	10 ml
TEMED	10 µl
APS (10%)	100µl

Sammelgel (5%) Gebrauchslösung

Stammlösung	5 ml
TEMED	5 µl
APS	50 µl

Kathodenpuffer, pH 8,5

Tris-HCl	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1%

Anodenpuffer, pH 8,9

Tris-HCl	0,2 M
----------	-------

Das Sammelgel mit einer großen Porenweite enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteine in der Probe. Glycin-Ionen dagegen, die im Elektrophoresepuffer enthalten sind, wandern langsamer als die Proteine. Somit ist den Proteinen durch die so entstehende Spannung die Möglichkeit gegeben, schneller zu wandern und eine scharfe Bande im Gel zu bilden. Das Trenngel dagegen enthält eine geringere Porenweite als das Sammelgel, dafür aber einen höheren pH-Wert und eine höhere Salzkonzentration. Die Proteine werden hier durch das SDS nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Nach Zugabe von APS und TEMED zur Stammlösung des Trenngels wurde das Trenngel zügig und gleichmäßig zwischen die Glasplatten gegossen. Diese wurde anschließend mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Gels während der Polymerisierung zu verhindern und um eine gerade und blasenfreie Grenzfläche zu gewährleisten. Eine Inkubationszeit von 45-60min bei RT führte zum Auspolymerisieren des Gels. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und

das Sammelgel eingefüllt. Zur Formung der Auftragungstaschen wurde ein 10-er bzw. 15-er Kamm eingesetzt und zur Auspolymerisierung 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die *Western Blot* Kammer eingesetzt und die innere Kammer mit Kathodenpuffer gefüllt. Den Stromfluss ermöglichte das Füllen der äußeren Kammer mit Anodenpuffer. Nach vorsichtiger Entfernung des Kammes wurden die Geltaschen von eventuell vorhandenen Gelresten ausgewaschen, indem diese mit einer Pipette belüftet wurden. Das Gel wurde anschließend mit den Proben beladen.

2.3.10.6 Immunpräzipitation zum Nachweis von P-STAT5

Zum Nachweis des phosphorylierten und somit aktivierten STAT5 erfolgte eine Immunpräzipitation mit Gesamtprotein aus der Lunge. Dazu wurde zunächst ein Proteinvolumen von 150µg in ein mit 500µl PBS vorgelegtes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1µg rabbit IgG (der Herkunftsspezies des Erstantikörpers entsprechend) und 20µl Protein A/G plus Agarose für 30min bei 4°C auf dem Überkopftaumler inkubiert. Dieser Schritt diente zum *Prä-Clearing* der Proben. Anschließend wurden die Proben bei 2500rpm, 5min, 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im folgenden Schritt wurden die Proben mit 5µl anti-STAT5 als Erstantikörper bei 4°C auf dem Überkopftaumler inkubiert. Nach einer Stunde wurden weitere 20µl Protein A/G plus Agarose zu den Proben hinzupipettiert und unter kontinuierlicher Durchmischung auf einem Überkopftaumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben 3x mit 1ml kaltem PBS gewaschen und in einem Gesamtvolumen von 50µl PBS resuspendiert. 15µl des Präzipitats wurden zur *Western Blot* Analyse verwendet und mit einem gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichteten Zweitantikörper (1µg/ml) inkubiert.

2.3.10.7 Auftragung der Proben

Vor der Probenauftragung wurde ein Volumen der Proteinextrakte gleichen Proteingehaltes (50µg) mit einem Volumen an vierfach-konzentriertem *Roti-Load-Loading* Puffer versetzt. Diese wurden ad 20µl mit aqua dest. versetzt, für 5min bei 95°C denaturiert und zur Sedimentation ungelöster Bestandteile kurz abzentrifugiert (13000rpm, 10sec, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Durch seine Farbe und sein spezifisches Gewicht erleichtert der *Loading Buffer* die Auftragung der Proben. Außerdem führen die reduzierenden Eigenschaften des enthaltenen β -Mercaptoethanols zur Spaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen.

Nach Auftragung von jeweils 20µl Proteinproben und des Protein-Größenstandard fand die elektrophoretische Auftrennung bei einer Stromstärke von 34mA und einer Spannung von 30V für 30min statt. Nach Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde die Spannung auf 70V erhöht. Die Elektrophorese dauerte ca. 4 Stunden, bis der im Roti-Load enthaltene Blaumarker (Bromphenolblau) vollständig herausgelaufen war.

2.3.10.8 Blotvorgang

Nach vollständiger Auftrennung der Proteine im Gel wurde das PAA-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (BA 85, Porengröße 0,45µm, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde zunächst mit einem trockenen Whatman Filterpapier das an der Glasplatte haftende Gel vorsichtig abgehoben. Auf das Gel wurde eine in der Größe des Gels zugeschnittene und in Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran aufgelegt. Anschließend wurden 2 weitere, mit Transferpuffer getränkte Whatman Filterpapiere auf die Membran gelegt. Eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden mit einer Pipette durch vorsichtiges Hin- und Herrollen sorgfältig entfernt. Beim Einspannen in die Transferkammer wurde die Membran zur Anode hin positioniert, um den durch SDS negativ geladenen Proteinen eine Wanderung von dem Gel auf die Membran zu ermöglichen. Der Transfer wurde bei 13V und 12mA über Nacht bei RT durchgeführt.

Nach erfolgtem Transfer waren die Proteine auf der Membran immobilisiert.

Transferpuffer, pH 8,1

Tris	3,03g (w/v)
Glycin	14,4g (w/v)
Methanol	200 ml
SDS (10%)	3,3 ml
Aqua dest.	ad 1l

2.3.10.9 Proteinnachweis auf der Nitrocellulose-Membran

Nach dem Blot wurde die Membran zunächst kurz in PBS gewaschen und mit 5% Magermilch, ein für die Antikörper nicht erkennbares Protein, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln blockiert.

Blotto

Magermilchpulver	5%
PBS	9,55 g/l (w/v)
Tween 20	0,05%

Waschpuffer

PBS	9,55 g/l (w/v)
Tween 20	0,05%

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Konzentration von 1µg/ml Blotto über Nacht bei 4°C. Dazu wurde die Membran mit dem verdünnten Antikörper in einem Beutel eingeschweißt und auf einem Überkopfschüttler (Heidolph Type:Reax2; Heidolph Instruments-Fachhandel Deutschland) fixiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper erfolgte dreimaliges Waschen der Membran in PBS-Tween 0,05% (3x5min) bei RT. Der auf diese Weise entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch ein gegen die Ursprungsspezies des Erstantikörpers gerichteten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in Blotto zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers eingesetzt. Die Inkubation wurde für 1h bei RT auf dem Überkopftaumler durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschriff kam es zum Einsatz der ECL-Substratlösung (*enhanced chemiluminescence of luminol*). Luminol wird von der Peroxidase gespalten, was zu einer Freisetzung von Licht und Filmschwärzung führt. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:40 gemischt und nach Auftragen auf die Membran 2min im Dunkeln bei RT inkubiert. Für die Entwicklung wurde die Membran zwischen Saran®-Folie in einer Exponierbox verschiedenen Belichtungszeiten zwischen 30sec und 5min ausgesetzt, abhängig von der Stärke des Signals. Anschließend wurde die Membran in *Stripping Buffer* für 1h bei 56°C unter gelegentlichem Schwenken gestrippt und stand somit für einen weiteren Proteinnachweis zur Verfügung.

***Stripping Puffer* pH 2,8**

Glycin	0,1 M
--------	-------

2.3.10.10 Auswertung der *Western-Analyse* Filme

Auf den Filmen des *Western-Blots* sieht man die mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesenen Proteine als schwarze Banden. Dabei war der Anteil des Proteins, das sich im Zelllysate befand und mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesen wurde umso höher, je höher die entsprechende ECL-Belichtung auf dem Film war. Mit Hilfe des *Kaleidoscope prestained*-Standards auf der Membran konnte den Proteinbanden

der verschiedenen Proben annähernde Molekularmassen zugeordnet werden. Die Filme wurden zur densitometrischen Auswertung eingescannt und der Schwärzungsgrad der zu untersuchenden Proteinbanden mit geeigneter Software (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) ermittelt.

2.3.11 RNA

2.3.11.1 RNA-Extraktion mit Qiagen

Um aus den ausgesäten CD4⁺ T-Zellen RNA direkt aus der Platte isolieren zu können, wurde *RNeasy[®] Micro Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen in der Platte (max. 5×10^5 Zellen) mit RLT Puffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen in 2ml Eppis überführt und ca. 30sec mit einem Dispergiergerät (Ultra Turrax, IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Zum Ansatz wurde dieselbe Menge 70% Ethanol zupipettiert und durch langsames Auf und Abziehen mit der Pipette vermischt. Der gesamte Ansatz wurde in eine *Mini Elute Spin* Säule überführt und für 15sec mit 10.000rpm bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurde RW1 Puffer zugegeben und für 15sec mit 10.000rpm bei RT zentrifugiert. Zu jeder Probe wurde anschließend DNaseI, verdünnt in RDD Puffer gegeben, auf die Säule pipettiert und 15min bei RT mit offenem Deckel inkubiert. Daraufhin wurde die Säule mit RW1 Puffer gewaschen und für 15sec mit 10.000rpm bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit RPE Puffer und dann mit 80% Ethanol gewaschen und für 2min mit 10.000rpm zentrifugiert. Um die RNA aus der Säule zu eluieren wurde RNA-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration gemessen und die RNA entweder bei -80°C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

2.3.11.2 Umschreiben in cDNA

Da RNA sehr instabil ist, muss sie in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde ein Kit von MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot nach Angaben des Herstellers benutzt. Hierbei wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

RNA	0,1-5µg
Oligo pdT(18) primer (0,5µg/µl)	2µl
aqua dest.	ad 12µl

Zur Denaturierung der RNA wurde diese Mischung bei 70°C für 5min im Heizblock (Thermomixer Compact, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-

Berzdorf) inkubiert, danach auf Eis gelagert und anschließend folgende Reagenzien hinzupipettiert:

5x Reaktionspuffer	5µl
Ribonukleaseinhibitor (20u/µl)	1µl
DNTP Mix (10mM)	2µl

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben für 5min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte das Zupipetieren von der reversen Transkriptase

M-MuLV reverse Transcriptase	1µl
------------------------------	-----

Die Inkubation erfolgte bei 42°C für 1h im Wasserbad. Anschließend wurde die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen bei 70°C abgestoppt.

2.3.11.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird eingesetzt um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Stranges zu vervielfältigen. Für diesen Prozess werden benötigt:

- Der zu vervielfältigende Abschnitt der Original DNA
- zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wobei der zu amplifizierende Bereich von beiden Seiten flankiert wird
- DNA-Polymerase, um den festgelegten Bereich zu replizieren, der außerdem bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird
- Nukleotide, als Bausteine für den synthetisierten DNA-Strang
- Pufferlösung, um für die DNA-Polymerase eine geeignete chemische Umgebung zu gewährleisten

Nachdem die Proben zusammenpipettiert wurden, erfolgte die Reaktion in einem Thermocycler (peQLab *Primus Advanced*, Erlangen). Dieses Gerät erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstungen zu verhindern, wird ein beheizbarer Deckel benutzt.

In dieser Arbeit kamen die Oligonukleotidprimer für GATA-3, T-bet, Foxp3, mIL-6R und Aktin zur Verwendung (Kapitel 2.2.2).

2.3.11.4 Gelelektrophorese von DNA

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können 0,5-25kb große DNA-Fragmente in 0,2-2%igen (w/v) nativen Agarosegelen einfach voneinander getrennt werden. Dies basiert

darauf, dass die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert ionisiert vorliegen. Dadurch wandern diese Polyanionen im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekulargröße, Konformation und auch Kettenlänge von der Kathode zur Anode [Sambrook et al., 1989]. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente können durch das Mitführen eines DNA-Standards bekannter Größe annähernd Molekülgrößen zugeordnet werden.

Für den Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA wurde in der vorliegenden Arbeit 1,5%ige (w/v) Agarosegele, in Tris/Acetat/EDTA (TAE)-Elektrophoresepuffer verwendet, der ebenfalls als Laufpuffer diente.

Agarosegel, 1,5%

Agarose	1,8g
TAE-Puffer	120ml
Ethidiumbromid	8µl

TAE-Elektrophoresepuffer (50-fach)

Tris	2M
Essigsäure	1M
EDTA	0,1M

Zum Lösen der Agarose wurde diese in dem Puffer aufgekocht, unter Rühren abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt. Die lauwarne Lösung wurde in die Gelkammer gegossen (10x10cm Flachbettkammer, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe). Nach Durchführung der PCR wurden 20µl der Proben direkt auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein DNA-Standard (GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder, *ready to use*, MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100V und 300mA für 1,5 Stunden. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht (254nm) fotografiert. Ethidiumbromid lagert sich an die DNA und fluoresziert unter UV-Licht.

2.3.11.5 Real-Time-PCR (RT-PCR)

Die *Real-Time-PCR* wurde in freundlicher Kooperation von Tobias Bopp, AG Schmitt, durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

Zusammengefasst ist die *Real Time PCR* eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Zusätzlich bietet sie außerdem die Möglichkeit zur Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe von DNA-Farbstoffen wie z.B. SYBR® GreenI. Diese

Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die DNA-Doppelstränge, wodurch die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte von Zyklus zu Zyklus ansteigt. Eine Quantifizierung ermöglicht die Fluoreszenz-Messung während bzw. am Ende eines PCR-Zyklus. Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität berechnet wird. Für die Quantifizierung wird außerdem ein Referenz-Gen mitgemessen (GAPDH oder HGPRT) um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, da die Daten sofort verfügbar sind. Außerdem bietet diese PCR ein geringeres Kontaminationsrisiko.

2.3.12 Immunhistologie

Mit der Immunhistologie lassen sich gezielt bestimmte Proteine oder Zellen oder nur Zelloberflächenmarker wie z.B. CD4 oder CD25 T-Zellen durch Antikörper färberisch darstellen. Dazu wurde zunächst ein apikales Stück Lunge in OCT eingebettet, in einem Gefrierkryostat (Leica CM1900) in 5µm Dicke Stücke geschnitten und auf Polylysin-beschichteten Objektträgern bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurden die jeweiligen Objektträger gegen CD4 nach Angaben des Herstellers gefärbt, indem das Gewebe zuerst in 4% Paraformaldehyd fixiert und in 0.01M PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde es mit dem Erstantikörper (anti-CD4), gelöst in PBS/0,5% BSA, mit einer Konzentration von 5µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und mit einem biotinylierten IgG Zweitantikörper (1:1000) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Streptavidin-konjugiertem Cy2 oder Cy3 (Dianova) (1:500) für 1h bei Raumtemperatur gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert (Olympus).

2.3.13 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden 2-3 mal wiederholt, um aus den erhaltenen Werten Mittelwerte und dazugehörige Standardfehler berechnen zu können [Cavalli-Sforza, 1980]. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen T-Tests. Alle Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Blockade des IL-6R in einem murinen Asthmamodell

3.1.1 Der Einfluß auf T_H2-Zellen

3.1.1.1 Der sIL-6R kontrolliert die T_H2 Funktion bei Mäusen mit experimentellem Asthma nach Allergenexposition

Asthma ist charakterisiert durch eine erhöhte Infiltration der Atemwege mit CD4 positiven Zellen, die Cytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Da zuvor eine positive Korrelation zwischen dem sIL-6R in der BALF und T_H2 Cytokinen bei Asthma in humanen Studien gezeigt werden konnte [Doganci et al., 2005], stellte sich die Frage, inwieweit T_H2 Cytokine in einem murinen *in vivo* Asthmamodell nach lokaler Blockade des sIL-6R durch gp130Fc beeinflusst werden können.

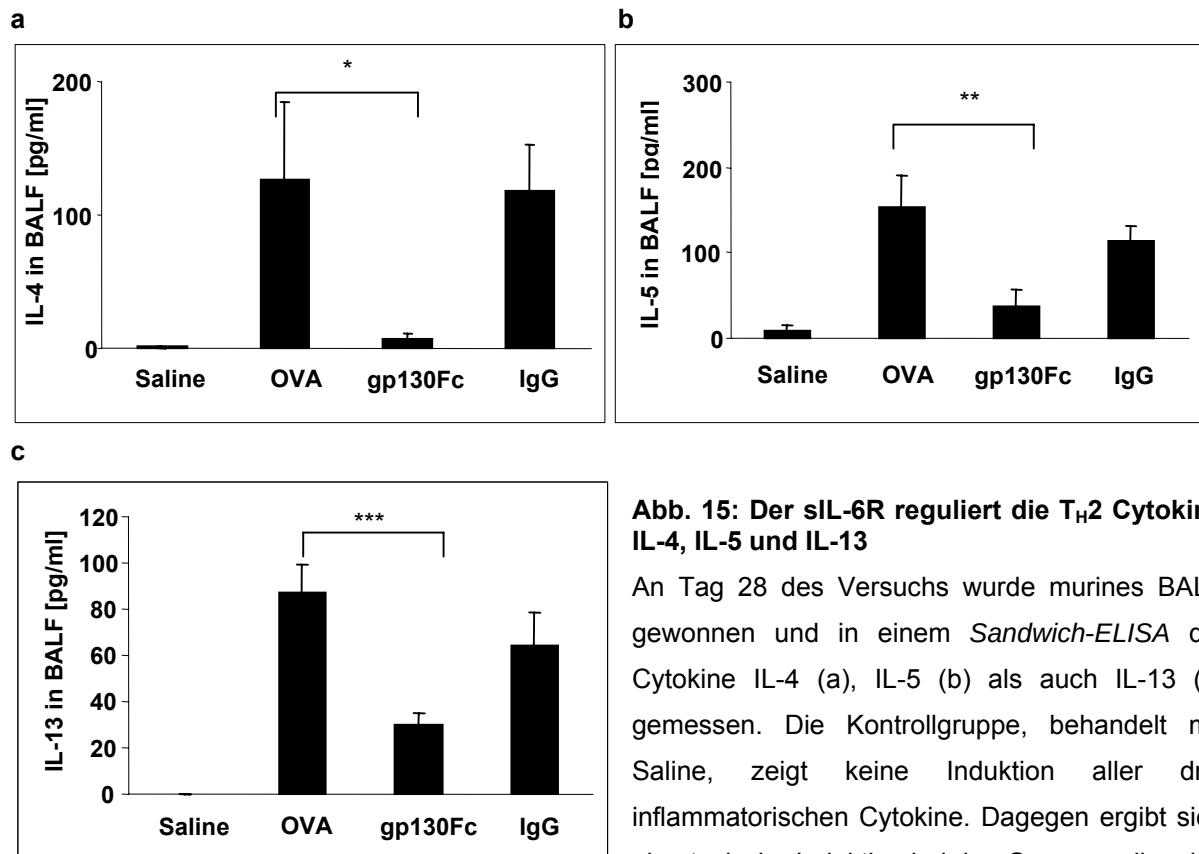


Abb. 15: Der sIL-6R reguliert die T_H2 Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13

An Tag 28 des Versuchs wurde murines BALF gewonnen und in einem *Sandwich-ELISA* die Cytokine IL-4 (a), IL-5 (b) als auch IL-13 (c) gemessen. Die Kontrollgruppe, behandelt mit Saline, zeigt keine Induktion aller drei inflammatorischen Cytokine. Dagegen ergibt sich eine typische Induktion bei den Gruppen, die mit

OVA sensibilisiert und provoziert wurden. Die Blockade des sIL-6R durch gp130Fc führt sowohl zu einer Herunterregulierung der Cytokine IL-4 (* $p < 0,05$)(a), IL-5 (** $p < 0,01$)(b) als auch IL-13 (** $p < 0,001$)(c); (n=5).

Die selektive Blockade des sIL-6R durch das chimäre Protein gp130Fc führt zu einer signifikanten Herunterregulierung von IL-4 (Abb.15a), IL-5 (Abb.15b) und IL-13 (Abb.15c) in der BALF von OVA sensibilisierten Mäusen im Vergleich zu OVA-

sensibilisierten und -provozierten, unbehandelten oder IgG-behandelten Kontrolltieren. In einem *Sandwich-ELISA* zeigt die Messung von IL-4 einen Anstieg nach OVA Behandlung gegenüber der Negativkontrolle mit Saline. In der mit gp130Fc behandelten Versuchsgruppe ist ein signifikanter Abfall dieses Cytokins zu beobachten (* $p=0,049$). Auch die IL-5 Konzentration steigt nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zur Salinekontrolle. Nach lokaler Gabe des gp130Fc wird die IL-5 Konzentration signifikant reduziert (** $p<0,01$).

Die Messung von IL-13 zeigt in der OVA-Gruppe wiederum einen Anstieg verglichen zur Negativkontrolle, die unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die lokale Blockade des löslichen IL-6 Rezeptors reguliert dieses Cytokin herunter (** $p<0,001$). Somit werden die OVA-induzierten Cytokine durch gp130Fc antagonisiert, was wiederum bedeutet, dass über den löslichen IL-6R eine Induktion der genannten Cytokine vermittelt wird.

3.1.1.2 Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3

GATA-3 ist ein wichtiger T_H2 Transkriptionsfaktor, der bei der Expression der T_H2 -Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 involviert ist [Zhang et al.1999; Finotto et al., 2001]. Zuvor wurde gezeigt, dass die lokale Applikation von gp130Fc zu einer Reduktion aller drei Cytokine in der BALF führt. Deshalb wurde im Folgenden das Expressionsniveau dieses Transkriptionsfaktors im Gesamtprotein der Lunge untersucht.

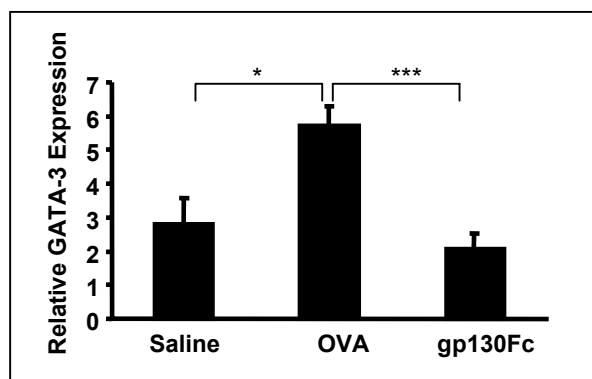


Abb. 16: Die Blockade des löslichen IL-6R führt zur Herunterregulierung von GATA-3 in der Lunge bei experimentellem Asthma

Dargestellt ist die Quantifizierung eines *Western Blots* mit einem gegen GATA-3 gerichteten Antikörper gegen Erk-2 als Beladungskontrolle (n=4-5). Die densitometrische Auswertung des *Western Blots* zeigt eine signifikante Erniedrigung von

GATA3 bei den Mäusen, die mit gp130Fc behandelt wurden (Saline * $p=0,016$; gp130Fc *** $p=0,00056$).

Die Quantifizierung gegen Erk-2 wurde mittels Quantifizierung des *Western Blots* mit geeigneter Software (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen) ermittelt und mit Excel ausgewertet. Es zeigt sich, dass die Sensibilisierung mit OVA zu einer deutlichen Induktion von GATA-3 im Vergleich zur Negativkontrolle mit Saline (* $p=0,016$) führt.

Dieser Effekt wird durch Inhibition des sIL-6R mit gp130Fc antagonisiert (**p=0,00056). Zusammengefasst kontrolliert der sIL-6R Signalweg die Funktion von T_H2 Zellen im experimentellen Asthmamodell.

3.1.1.3 Expression der GATA-3 und T-bet mRNA

Im vorigen Abschnitt wurde der T_H2 Transkriptionsfaktor GATA-3 in einer *Western*-Analyse im Gesamtprotein der Lunge evaluiert und mit einer Hochregulation nach OVA Sensibilisierung und OVA Provokation im vorliegenden Asthmamodell assoziiert. Nachfolgend sollte die Expression von GATA-3 in CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge analysiert werden. Außerdem wurde das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors T-bet in CD4⁺ T-Zellen untersucht. T-bet ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von T_H1-Cytokinen u.a. IFN γ kontrolliert.

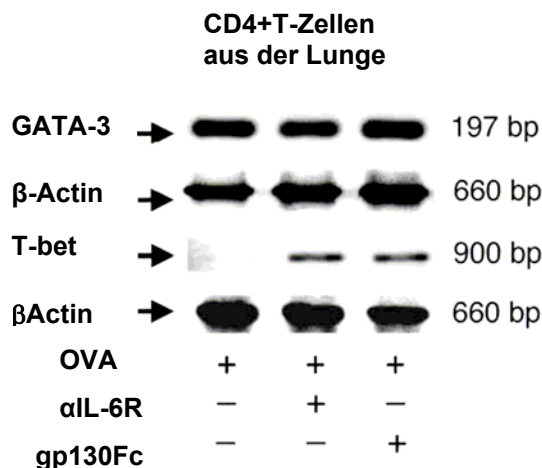


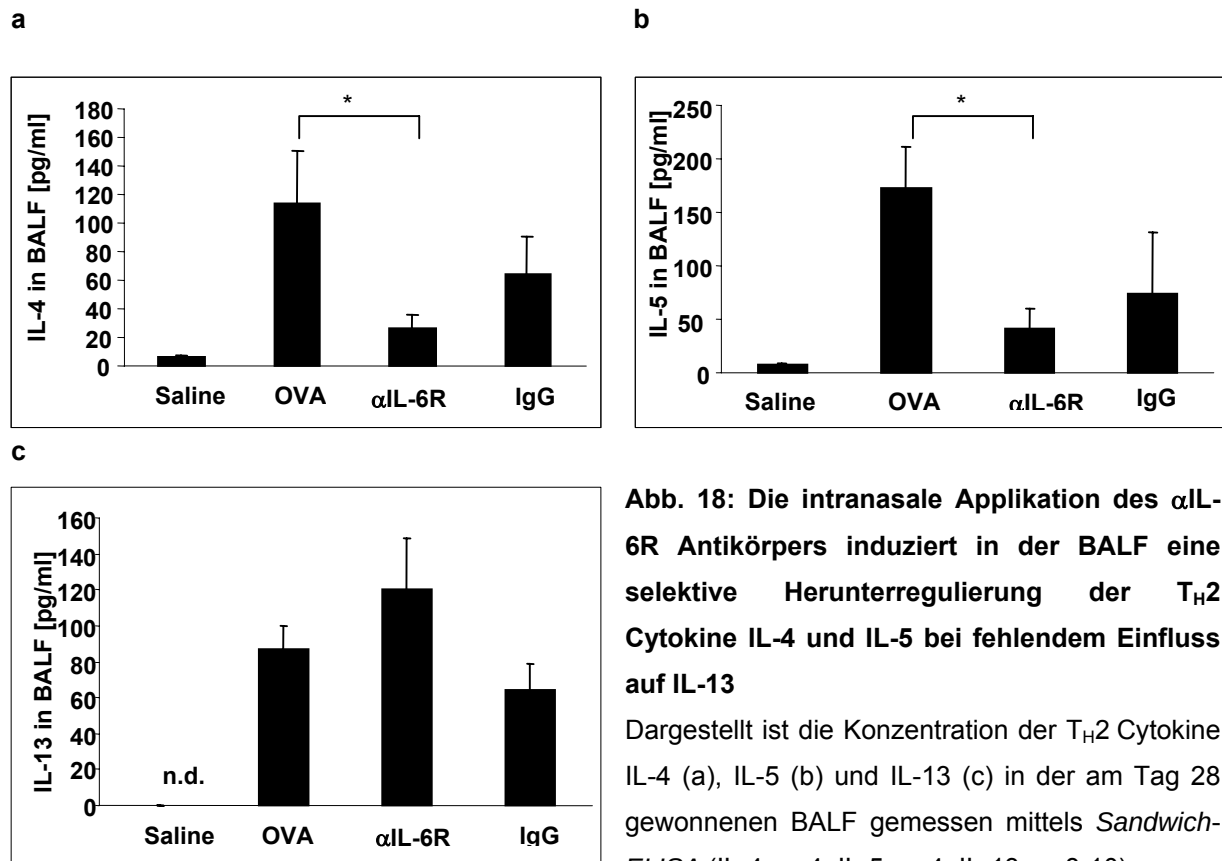
Abb. 17: RT-PCR für GATA-3 und T-bet mRNA aus CD4⁺T-Zellen aus der Lunge

10⁵ CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge wurden für 24h mit 2,5 µg/ml anti-CD3 Antikörper inkubiert. Aus dem Zellsediment wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit entsprechenden *Primern* wurden die GATA-3- und T-bet-Expression detektiert.

Es zeigt sich, dass GATA-3 mRNA nach Behandlung mit OVA induziert und im Agarosegel bei einer molekularen Masse von 197bp detektierbar ist. Nach Behandlung mit dem membrangebundenen als auch dem löslichen IL-6R Antikörper bleibt GATA-3 unbeeinflusst und ist weiterhin mit gleicher Intensität zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GATA-3 nur in den Gesamtproteinen der Lunge eine Rolle spielt, während es in der isolierten CD4⁺ Population unverändert bleibt. Der T_H1 Transkriptionsfaktor T-bet ist nach OVA-Behandlung nicht detektierbar. Die Applikation des Antikörpers gegen den mIL-6R als auch gp130Fc resultieren in einer Expression von T-bet mRNA in den CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge, bei einer Bandenlänge von 900bp. Diese Ergebnisse deuten auf eine Induktion des T_H1 Phänotyps in der Lunge Antikörper-behandelter Tiere. Der Nachweis des gleichmäßigen DNA Einsatzes erfolgte mit β-actin (660bp).

3.1.1.4 Die Blockade des mIL-6R führt zur Reduktion der T_H2-Cytokine IL-4 und IL-5

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass dendritische Zellen (DC's) in der Lunge im Vergleich zur Milz erhöhte Mengen an IL-6 sezernieren. Außerdem führen pulmonale DC's zu einer Polarisierung naiver T-Zellen in Richtung T_H2, so dass diese vermehrt IL-4 ausschütten [Dodge et al. 2003]. Da Asthma durch eine T_H2-abhängige Immunantwort charakterisiert wird, stellte sich die Frage, inwieweit das T_H2-Cytokinprofil durch die lokale Blockade des mIL-6R modifiziert wurde.



Wie in Abbildung 18 zu erkennen, steigt nach OVA-Sensibilisierung die Menge an IL-4 in der BALF, im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit Saline. Dagegen führt die lokale Blockade des mIL-6R zu einem signifikanten Abfall der IL-4 Konzentration (*p=0,05). Auch bei IL-5 ist nach Applikation des αIL-6R ein signifikanter Abfall zu erkennen (*p=0,029), allerdings erst nach höheren Dosen des Antikörpers (100µg/Tag) (Abb. 18b). Diese Behandlung zeigt jedoch keine herunterregulierende Wirkung auf die Produktion von IL-13 (Abb.18c).

3.1.1.5 Quantifizierung der inflammatorischen Zellen in der BALF

Da die lokale Blockade des IL-6R mit einer Reduktion der inflammatorischen T_H2 Cytokine in der BALF assoziiert war, wurde untersucht, ob gleichzeitig eine Veränderung der intrapulmonalen Akkumulation inflammatorischer Zellen zu beobachten war. Hierzu wurden mit Diff Quick gefärbte Cytospin-Objektträger quantitativ ausgewertet.

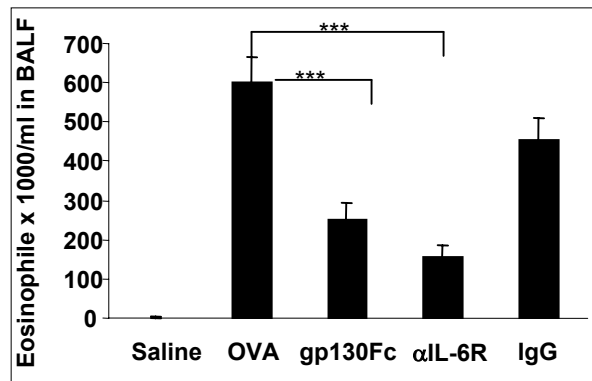


Abb. 19: Die lokale Blockade des löslichen als auch des mIL-6R inhibiert OVA induzierte eosinophile Granulozyten in der BALF

Bestimmt wurde die Anzahl eosinophiler Granulozyten pro ml BALF durch Färbung der Cytospin-Objektträger mit Diff Quick und Auszählung bei 1000-facher Vergrößerung (n=7-8).

In der mit gp130Fc behandelten Gruppe ist ein signifikanter Rückgang der eosinophilen Granulozyten ($^{***}p=0,00014$) zu beobachten. Auch in der mit α IL-6R Antikörper behandelten Gruppe konnte ein dreifach signifikanter Rückgang der eosinophilen Granulozyten beobachtet werden ($^{***}p=0,00026$). Die mit IgG behandelte Versuchsgruppe zeigt wieder einen Anstieg eosinophiler Granulozyten und ist somit mit der OVA-Gruppe vergleichbar.

3.1.2 Antiinflammatorischer Mechanismus durch die pulmonale Blockade des IL-6 Signalings

Es ist bekannt, dass die Entwicklung allergischer Immunantworten bei Asthma durch $CD4^+$ Effektorzellen und durch die Sezernierung von T_H2 Cytokinen vermittelt wird [Robinson et al., 1992 und 1993; Tang et al., 1997]. Mittels immunhistochemischer Färbungen in der Lunge wurden $CD4^+$ Effektorzellen nach OVA Sensibilisierung und Provokation analysiert und der Effekt nach α IL-6R Behandlung ermittelt.

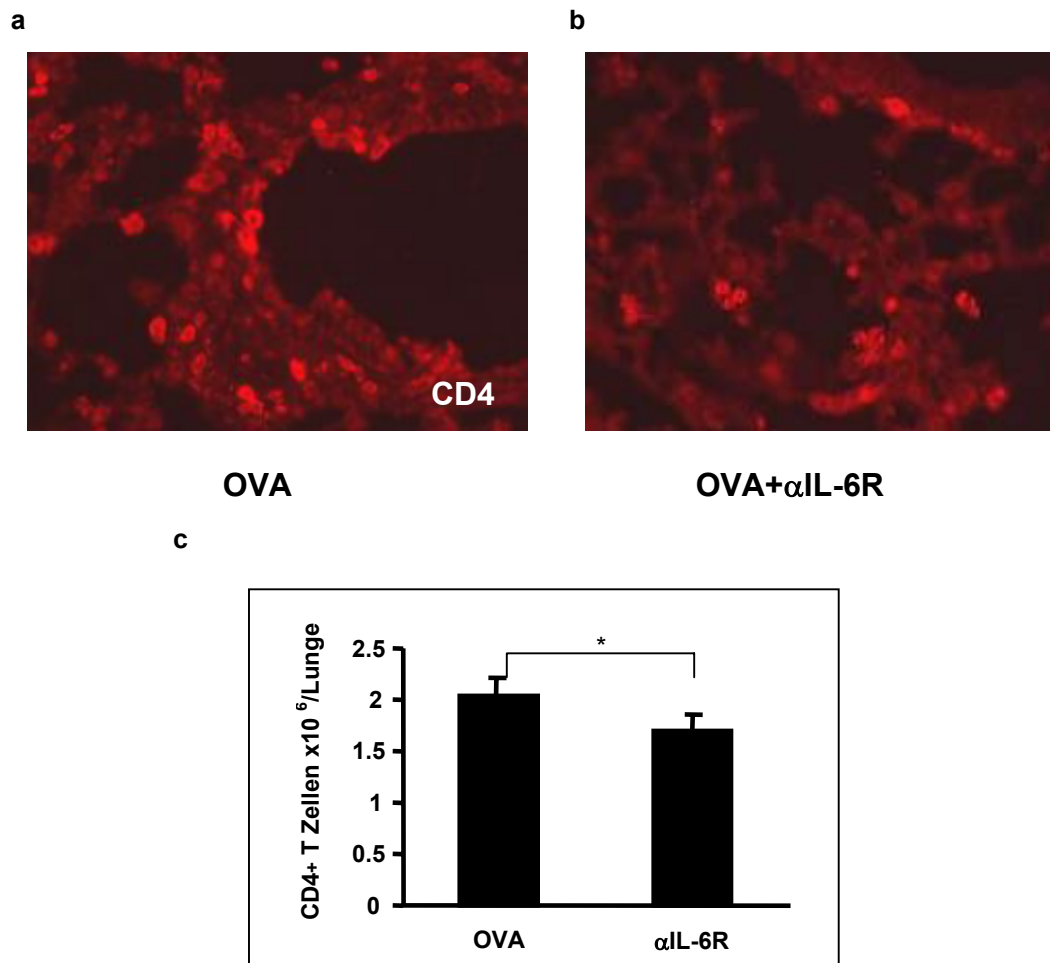


Abb. 20: Die lokale Behandlung mit anti-IL-6R Antikörpern führt zu einem Rückgang inflammatorischer CD4+ T-Zellen in der Lunge

Aus den Lungen OVA bzw. OVA+αIL-6R behandelter Mäuse wurden Gefrierschnitte von 5µm Dicke hergestellt und wie unter Methoden beschrieben, gegen CD4 gefärbt. Die Vergrößerung wurde in 400 facher Auflösung mikroskopiert. Abb. c zeigt die Anzahl CD4 positiver T-Zellen in der Lunge (* $p < 0,05$)($n=3-4$).

In der Lunge einer OVA-behandelten Maus ist ein Anstieg an CD4+ Effektorzellen zu erkennen (Abb.20a). Nach Blockade des IL-6R dagegen, ist die Anzahl der CD4+ T-Zellen in der Lunge signifikant herabgesetzt (b+c).

3.1.3 Anti-IL-6R Antikörper Behandlung induziert IL-10 und IFN γ Produktion in der BALF

Da die Blockade des mIL-6R und nicht des sIL-6R mit einem signifikanten Abfall der AHR assoziiert ist, wurde als nächstes untersucht, ob die eine oder andere Blockade das T_H1 Cytokinprofil modifiziert.

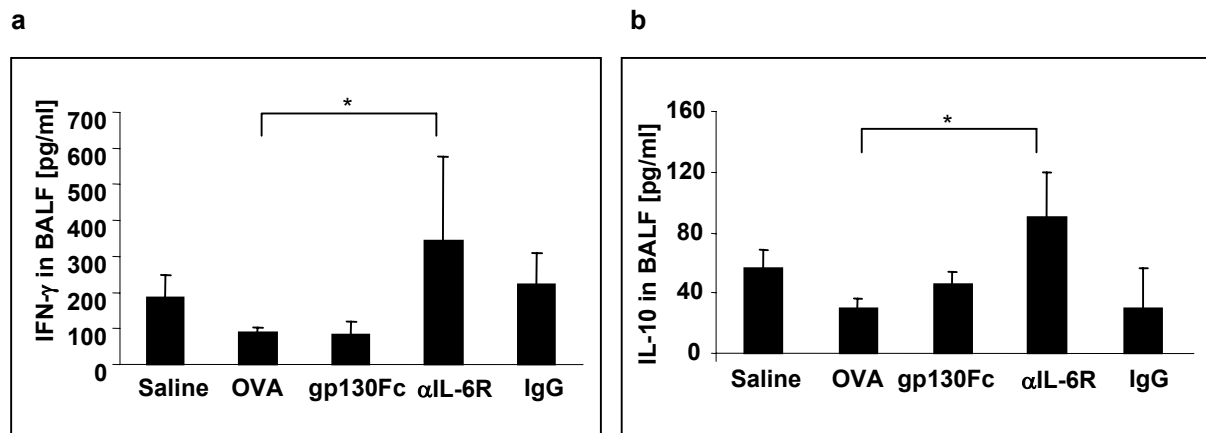


Abb. 21: Die Blockade des mIL-6R durch i.n. Applikation von anti-IL-6R-Antikörpern induziert IFN γ und IL-10 in der BALF bei Mäusen

Dargestellt ist ein *Sandwich-ELISA* der Cytokine IFN γ (a) und IL-10 (b) (n=5-15).

Die Provokation mit OVA, welches mit einem T_H2 Phänotypen assoziiert ist, zeigt weder einen Einfluss auf IL-10 (Abb. 21b) noch auf das T_H1 Cytokin IFN γ . Auch die Blockade des sIL-6R über gp130Fc zeigt keine Induktion weder des einen noch des anderen Cytokins. Die Behandlung mit anti-IL-6R-Antikörper dagegen, resultiert in einer signifikanten Induktion von IFN γ (*p=0,048) (a) und auch IL-10 (*p=0,020) (b) in der BALF von OVA-sensibilisierten Mäusen. Diese Ergebnisse stehen in Verbindung mit früheren Untersuchungen mit pulmonalen DC's, isoliert aus IL-6^{-/-} Mäusen, die einen T_H1 Phänotypen induzieren [Dodge et al., 2003]. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die Blockade des IL-6R zu einer Induktion von T-bet führt, dem T_H1 Transkriptionsfaktor in CD4⁺ T-Zellen der Lunge (vergleiche Abb.17, Kap. 3.1.1.3).

3.1.3.1 Die lokale Blockade des mIL-6R führt zur Induktion von IL-10 und IFN γ -Produktion in CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Blockade des mIL-6R das typische T_H1 Cytokin IFN γ signifikant in der BALF behandelter Mäuse induziert. Auch konnte eine Induktion von IL-10 nach lokaler Applikation des mIL-6R-Antikörpers beobachtet werden. Daraufhin sollte das Cytokinprofil auch in CD4⁺ T-Zellen der Lunge, mithilfe eines *Cytokine Bead Array* (CBA) gemessen werden. Im Gegensatz zu den geläufigen *Sandwich-ELISA*'s ist der Vorteil eines CBA's, dass ein Cytokinprofil aus bis zu 6 verschiedenen Cytokinen auf einmal erstellt werden kann.

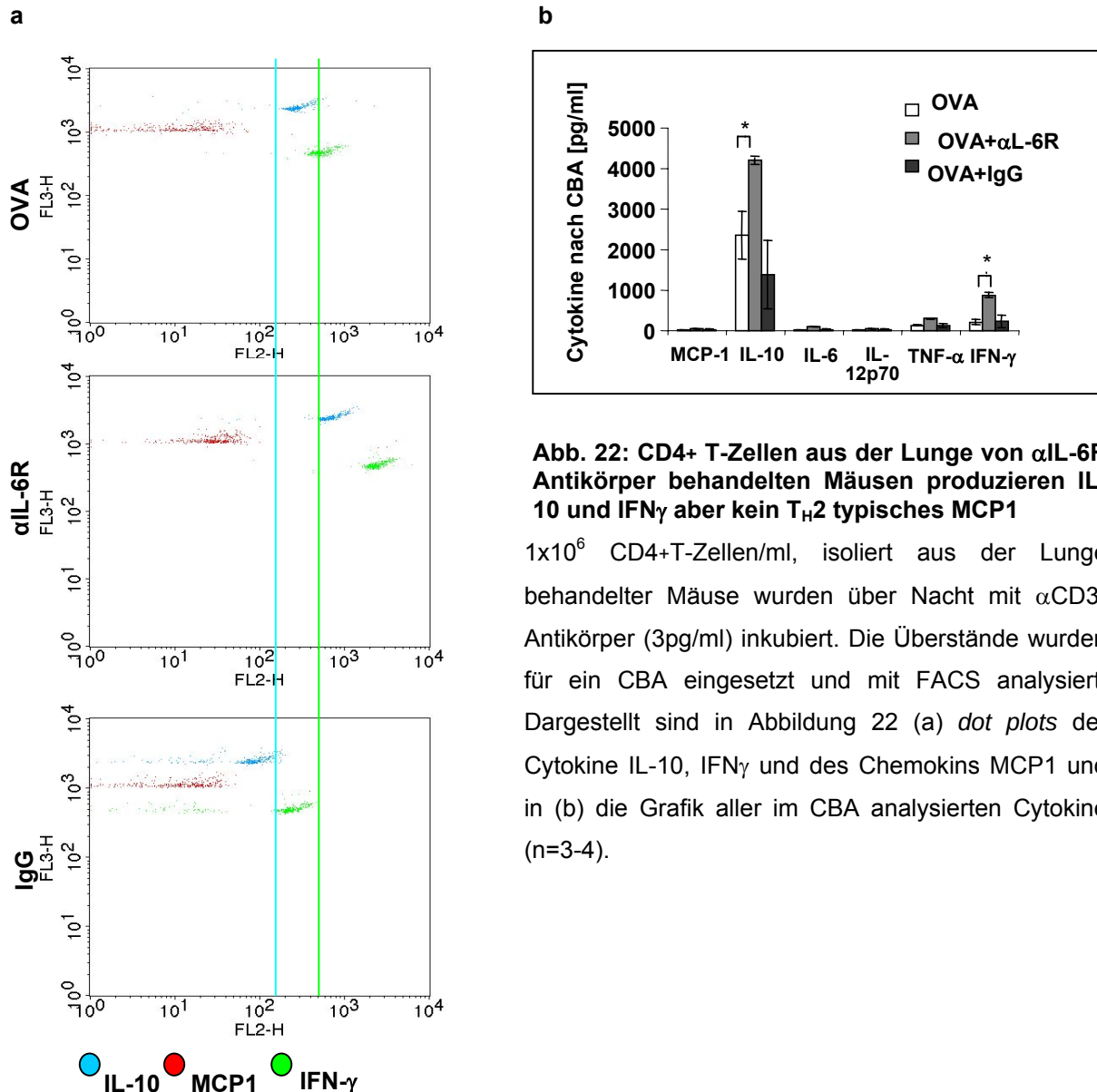


Abb. 22: CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge von α IL-6R Antikörper behandelten Mäusen produzieren IL-10 und IFN γ aber kein T_H2 typisches MCP1

1x10⁶ CD4⁺T-Zellen/ml, isoliert aus der Lunge behandelter Mäuse wurden über Nacht mit α CD3-Antikörper (3pg/ml) inkubiert. Die Überstände wurden für ein CBA eingesetzt und mit FACS analysiert. Dargestellt sind in Abbildung 22 (a) dot plots der Cytokine IL-10, IFN γ und des Chemokins MCP1 und in (b) die Grafik aller im CBA analysierten Cytokine (n=3-4).

Dargestellt ist das Cytokinprofil eines CBA. CD4⁺ T-Zellen, isoliert aus der Lunge von α IL-6R-Antikörper behandelten Mäusen sezernieren signifikant höhere Mengen an IL-10 (*p=0,023) und IFN γ (*p=0,013) verglichen zu OVA oder OVA/IgG behandelten Tieren. Im Gegensatz dazu bleibt das T_H2 typische Chemokin *monocyte-chemoattractant-protein-1* (MCP1) unbeeinflusst. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Blockade des mIL-6R zu einer Induktion der Cytokine IL-10 und IFN γ in CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge führt. Das T_H2 Profil wird wie auch schon in Abbildung 18 demonstriert, unterdrückt.

3.1.3.2 Bestimmung der Cytokine IL-10 und IFN γ nach Applikation des gp130Fc

In Abbildung 21 ist gezeigt, dass im Vergleich zur Blockade des mIL-6R, die selektive Inhibition des *Signalings* durch die lokale Blockade des sIL-6R durch gp130Fc nicht zur Induktion der Cytokine IL-10 und IFN γ in der BALF führt. Im Folgenden wurde dieses Phänomen in den Kulturüberständen von aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge untersucht.

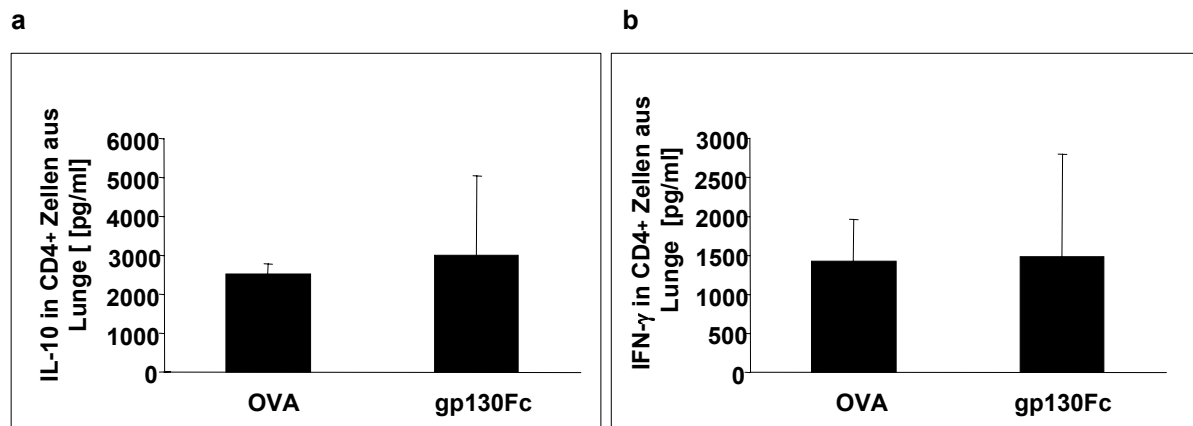


Abb. 23: Die Blockade des sIL-6R durch gp130Fc hat keinen Einfluss auf die Cytokine IL-10 und IFN γ bei isolierten CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge

Dargestellt ist die Konzentration von IL-10 (a) und IFN γ (b) in den am Tag 28 isolierten CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge nach 24 stündiger Stimulierung mit α CD3-Antikörpern mittels *ELISA*. Die *ELISA*'s sind repräsentativ für 3 Experimente mit n=3.

Unter OVA Behandlung ist eine IL-10 Konzentration von etwa 2500 pg/ml zu beobachten. Die IL-10 Produktion bleibt nach Gabe des gp130Fc unverändert. Auch die Konzentration von IFN γ stellt keinen signifikanten Unterschied zwischen der OVA Gruppe und der mit gp130Fc behandelten Gruppe dar. Dies lässt den Rückschluss zu, dass in dem verwendeten Asthmodell ausschließlich die Blockade des mIL-6R zu einer Induktion von IL-10 und IFN γ führt, nicht aber die Blockade des sIL-6R durch gp130Fc.

3.1.4 Der Einfluß der Blockade des IL-6 *Signallings* auf Tregs

3.1.4.1 Vermehrte IL-10 Produktion in Foxp3 produzierenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in der Lunge anti-IL-6R behandelter Mäuse

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass IL-10 u.a. von regulatorischen T-Zellen sezerniert wird und anti-inflammatorische Aktivitäten besitzt [Maloy und Powrie, 2001; Belkaid et al., 2002; Pasare und Medzhitov, 2003]. Vor diesem

Hintergrund wurde untersucht, ob CD4+CD25+ T-Zellen aus der Lunge nach Blockade des IL-6R auch IL-10 produzieren.

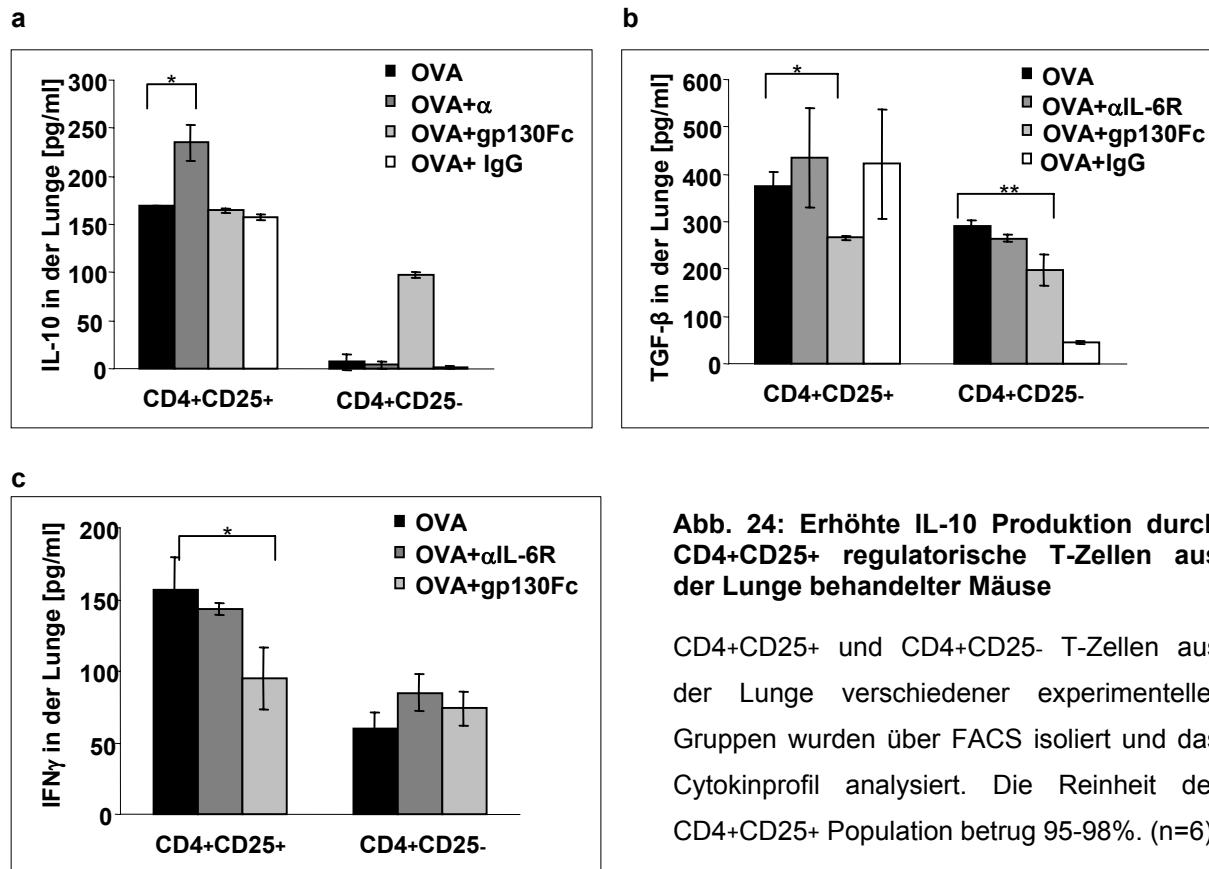


Abb. 24: Erhöhte IL-10 Produktion durch CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen aus der Lunge behandelter Mäuse

CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen aus der Lunge verschiedener experimenteller Gruppen wurden über FACS isoliert und das Cytokinprofil analysiert. Die Reinheit der CD4+CD25+ Population betrug 95-98%. (n=6).

In Abbildung 24a ist das Ergebnis von einem IL-10 *ELISA* dargestellt. CD4+CD25+ T-Zellen sezernieren nach Provokation mit OVA IL-10 (a), welches nach Applikation von αIL-6R-Antikörper signifikant ansteigt (*p=0,034). Unter OVA+gp130Fc Behandlung und auch OVA+IgG Behandlung ist kein Unterschied zur unbehandelten Gruppe mit OVA zu erkennen. Zusätzlich zu IL-10 produzieren CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen auch TGFβ (Abb.24b). CD4+CD25+ T-Zellen produzieren signifikant mehr TGFβ verglichen zu CD25- T-Zellen (*p=0,024). Das ist ein Hinweis auf die potentielle regulatorische Aktivität von TGFβ. Die CD4+CD25- Zellpopulation dagegen produziert kaum oder nur wenig IL-10 obwohl diese TGFβ sezernieren (Abb.24b). Außerdem produziert die CD4+CD25+ (*p=0,05) als auch die CD4+CD25- (**p=0,0035) T-Zellpopulation, isoliert aus gp130Fc behandelten Mäusen signifikant weniger TGFβ verglichen zu unbehandelten OVA-sensibilisierten Tieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass in dem vorliegenden Asthmodell CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen isoliert aus der Lunge gp130Fc behandelter Mäuse in beiden Fällen regulatorische T-Zellen in der Lunge nicht über TGFβ induzieren können. Die Untersuchungen des IFN γ ergibt, dass beide Populationen diese sezernieren. Auch

hier zeigen gp130Fc behandelte Tiere weniger $\text{IFN}\gamma$ in der CD4+CD25^+ T-Zellpopulation als OVA behandelte Tiere (* $p=0,046$) (Abb.24c).

3.1.4.2 Foxp3 Expression in CD4+CD25^+ regulatorischen T-Zellen aus der Lunge

CD4+CD25^+ regulatorische T-Zellen aus der Lunge sind bekannt für ihre Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 aus der *forkhead* Familie [Maloy und Powrie, 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Fontenot et al., 2003; O'Garra und Vieira, 2003]. Im weiteren wurde die Foxp3-Expression in CD4+CD25^+ und auch in CD4+CD25^- T-Zellen aus der Lunge in einer RT-PCR und zur genaueren Quantifizierung in einer *real time* PCR untersucht.

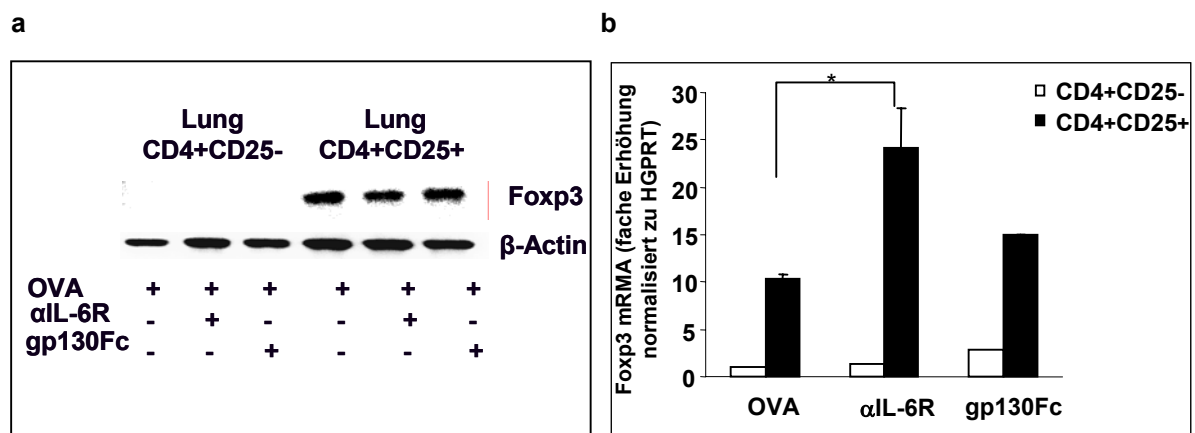


Abb. 25: Foxp3 Expression in der CD4+CD25^+ T-Zellpopulation der Lunge nach $\alpha\text{IL-6R}$ -Antikörper Behandlung

Abb. 25a zeigt die Foxp3 Expression von CD4+CD25^+ und CD4+CD25^- T-Zellen aus der Lunge $\alpha\text{IL-6R}$, gp130Fc behandelter und un behandelter OVA-sensibilisierter Mäuse. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden über Nacht mit αCD3 -Antikörper stimuliert. Die RNA wurde aus Platten isoliert, über RT-PCR amplifiziert und in einem Agarosegel analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Actin. In Abbildung (b) ist eine *real time* PCR für Foxp3 in CD4+CD25^+ und auch CD4+CD25^- T-Zellen im Verhältnis zu HGPRT gezeigt. Die Foxp3 Messung ist repräsentativ für 3 Experimente.

CD4+CD25^+ bzw. CD4+CD25^- T-Zellen, isoliert aus der Lunge der jeweiligen Gruppen, wurden über Nacht mit αCD3 -Antikörper inkubiert. Aus den auf die Plattenoberfläche angehefteten Zellen wurde RNA isoliert und nach Umschreiben in cDNA eine PCR mit Foxp3-Primern durchgeführt. Zur Ladekontrolle diente β -Actin. In Abbildung 25a ist gezeigt, dass die CD4+CD25^+ T-Zellpopulation Foxp3 exprimiert, nicht aber die CD4+CD25^- Population. Zur genauen Quantifizierung wurde eine *real time* PCR durchgeführt (Abb.25b), aus der hervorgeht, dass anti-IL-6R Antikörper Behandlung zu einer signifikanten Induktion von Foxp3 mRNA führt (* $p=0,04$), nicht

aber die Behandlung mit gp130Fc. Das vorliegenden Asthmodell ist durch eine verstärkte Expression des für regulatorische T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 in den CD4+CD25+ T-Zellpopulation bei anti-IL-6R-Antikörper behandelten Mäusen charakterisiert. Außerdem zeigen diese Ergebnisse eine spezifische Aktivierung von Foxp3 exprimierenden CD4+CD25+ T-Zellen aus der Lunge, die IL-10 und auch TGF β sezernieren, vor allem nach Blockade des mIL-6R.

3.1.4.3 Erhöhte Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen in der Lunge von α IL-6R behandelten, OVA-sensibilisierten Mäusen

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Behandlung mit α IL-6R Antikörpern die Expansion CD4+CD25+ T-regulatorischer Zellen aus der Lunge beeinflusst. Zudem wurde die Anzahl CD4+CD25+ FACS-sortierter T-Zellen aus der Lunge bestimmt.

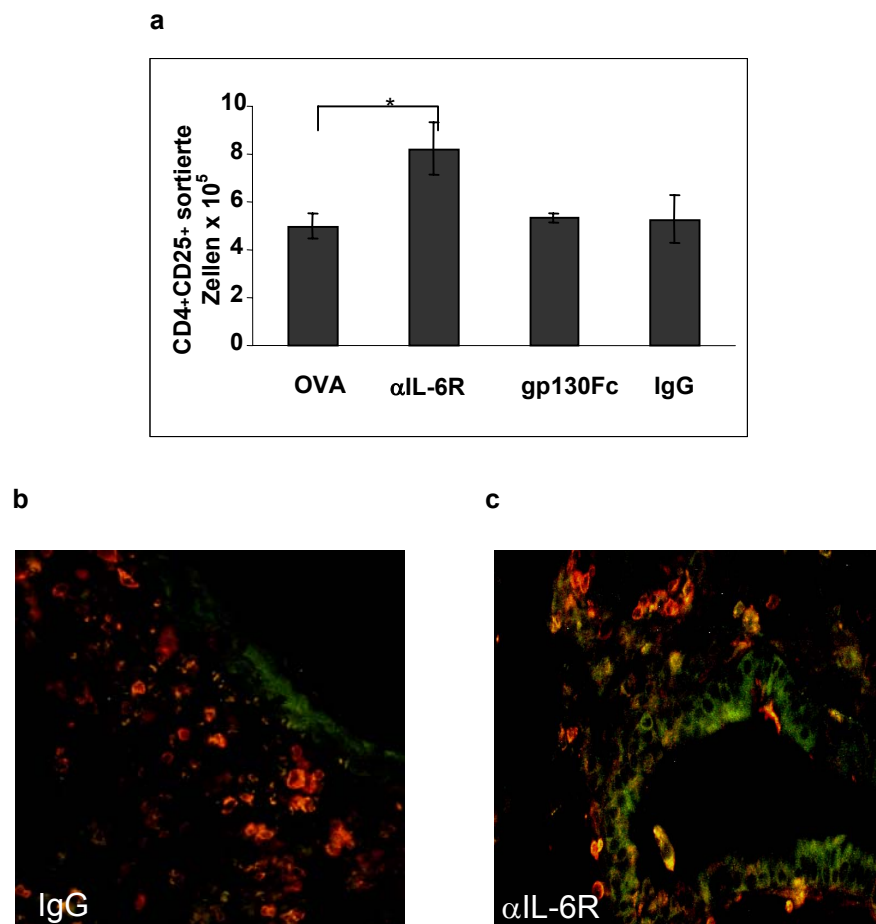


Abb. 26: Erhöhte Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen aus der Lunge nach i.n. Blockade des mIL-6R

CD4+CD25+ T-Zellen aus der Lunge wurden mittels FACS isoliert und dabei die Anzahl der jeweiligen Populationen bestimmt (a) In Abbildung 26 (b+c) wurden Gefrierschnitten aus der Lunge gegen CD4 und CD25 gefärbt (CD4=rot; CD25= grün; CD4+CD25+ = gelb) (n=4-6).

Abbildung 26a stellt die Anzahl der CD4+CD25+ T-Zellen nach der Zellsortierung mit FACS dar. Die i.n. Blockade des mIL-6R, das sowohl *Signaling* als auch *Trans-Signaling* inhibiert, führt zu einer signifikanten Induktion der Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen in der Lunge (*p=0,034). Dagegen zeigt die Blockade des sIL-6R über das chimäre Protein gp130Fc keine Induktion dieser Zellen. Nach Blockade des mIL-6R konnten CD4+CD25+ (gelb) T-Zellen in der Lunge vermehrt nachgewiesen werden (Abb.26c). Dagegen zeigte die IgG-Behandlung kaum doppelt positive Zellen (Abb.26b).

3.1.4.4 Immunsuppressive Funktion CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen in der Lunge

Derzeit existieren wenig Untersuchungen zur Funktion regulatorischer T-Zellen in der Lunge. Wie zuvor demonstriert, führt die Blockade des mIL-6R zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen in der Lunge. Vor diesem Hintergrund wurde das supprimierende Potential dieser Zellen in Kokultorexperimenten mit *target* Zellen aus der Milz untersucht.

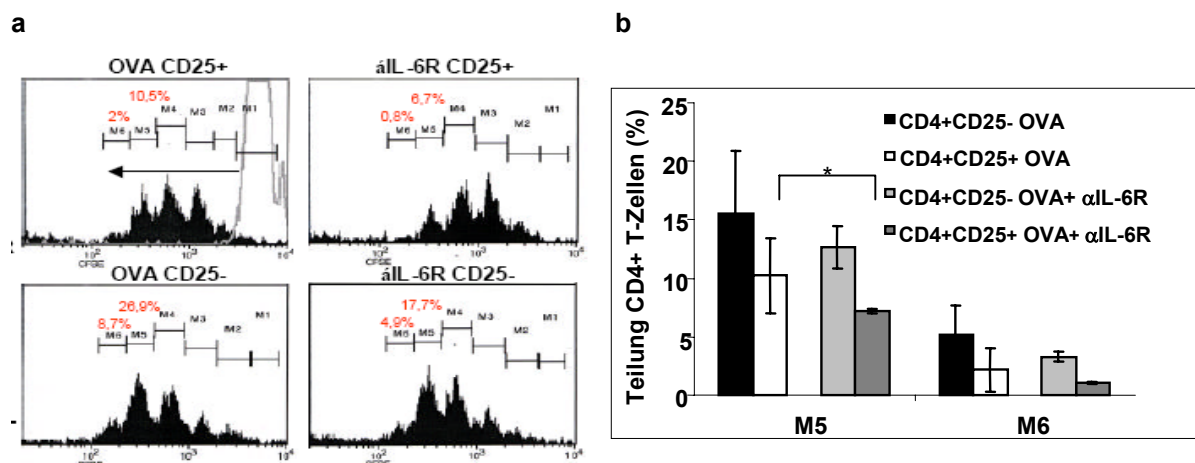


Abb. 27: CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen aus der Lunge anti-IL6R-Antikörper behandelte Tiere zeigen immunsuppressive Funktion auf andere Zellen des Immunsystems

Dargestellt sind in (a) Histogramme einer repräsentativen Zellpopulation CFSE markierter CD4+ T-Zellen aus der Milz, die für 4 Tage entweder mit CD4+CD25+ oder CD4+CD25- T-Zellen aus der Lunge unterschiedlicher Gruppen kokultiert wurden. Die Prozente zeigen die Anzahl CD4+ CFSE markierter Zellen an Tag 4. Abbildung (b) zeigt die Auswertung der Proliferation CFSE positiver Zellen. CD4+CD25+ T-Zellen i.n. anti-IL-6R-Antikörper behandelte Mäuse inhibieren effizienter die Proliferation CFSE-markierter CD4+ T-Zellen aus der Milz verglichen zu CD4+CD25+ T-Zellen aus OVA behandelten Kontrollen. (n=5; *p<0,05).

Das regulatorische Potential CD4+CD25+ T-Zellen wurde in Kokultur mit CD4+ T-Zellen aus der Milz untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden OVA behandelte

CD4⁺ T-Zellen aus der Milz mit CFSE markiert und in Anwesenheit von α CD3 und APC's mit CD4⁺CD25⁺ oder CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Lunge verschiedener Behandlungsgruppen inkubiert. Wie in Abbildung 27 (a) dargestellt, zeigen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen anti-IL6R-Antikörper behandelte Mäusen eine höhere suppressive Kapazität, verglichen zu unbehandelten OVA-sensibilisierten Mäusen (*p=0,033).

3.1.4.5 Selektive mIL-6R-Expression in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus der Lunge

IL-6 ist in der Lage, neben der Bindung an den löslichen IL-6R, auch Zellen zu stimulieren, die den membranständigen IL-6 Rezeptor exprimieren. Zu diesen Zellen gehören u.a. Hepatozyten und hematopoetische Zellen. Zuvor wurde gezeigt, dass die IL-6 Signaltransduktion in CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen aus der Lunge eher über den mIL-6R stattfindet als über den sIL-6R. Nun wurde im Folgenden untersucht, ob der mIL-6R auch auf der Oberfläche von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen exprimiert wird.

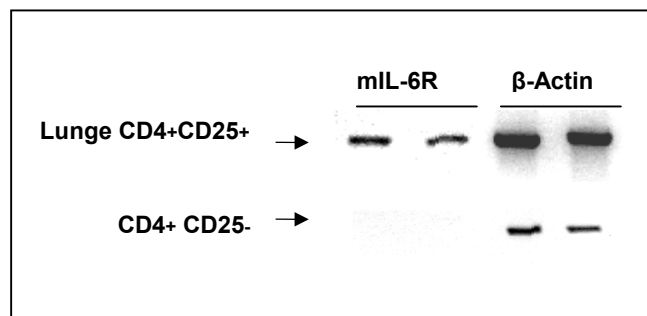


Abb. 28: Die IL-6R α -Kette wird selektiv von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der Lunge exprimiert

1 x 10⁵ Zellen aus der Lunge CD4⁺CD25⁺ oder CD4⁺CD25⁻ T-Zellen α IL-6R behandelte Mäuse wurden in einer 96 well-Platte über Nacht mit α CD3 stimuliert. Nach Isolierung der RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und mit *Primern* gegen die IL-6R α -Kette eine PCR durchgeführt.

Die RT-PCR mit *Primern* gegen die IL-6R α -Kette zeigt eine selektive Expression auf der Oberfläche CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu wird dieser nicht von CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen exprimiert. Dieser Ansatz ist wichtig bei der Frage, ob IL-6 direkt auf die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen über den mIL-6R wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass der IL-6R selektiv auf der Oberfläche von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen exprimiert wird, was auf einen direkten Effekt von IL-6 auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen via mIL-6R hinweist.

3.1.4.6 Anti-IL-6R-Antikörper wirken der IL-6 induzierten Phosphorylierung von STAT-3 entgegen

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Signaltransduktion von IL-6 u.a. über eine Aktivierung von STAT3 erfolgen kann [Nakajima et al., 1996; Watanabe et

al., 2004; Saura et al., 2006]. Die Aktivierung dieses Signalweges geht mit einer Phosphorylierung von STAT3 einher. Daher wurde mithilfe immunhistochemischer Methoden der Aktivierungszustand von STAT3 nach Applikation von α IL-6R-Antikörper im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht

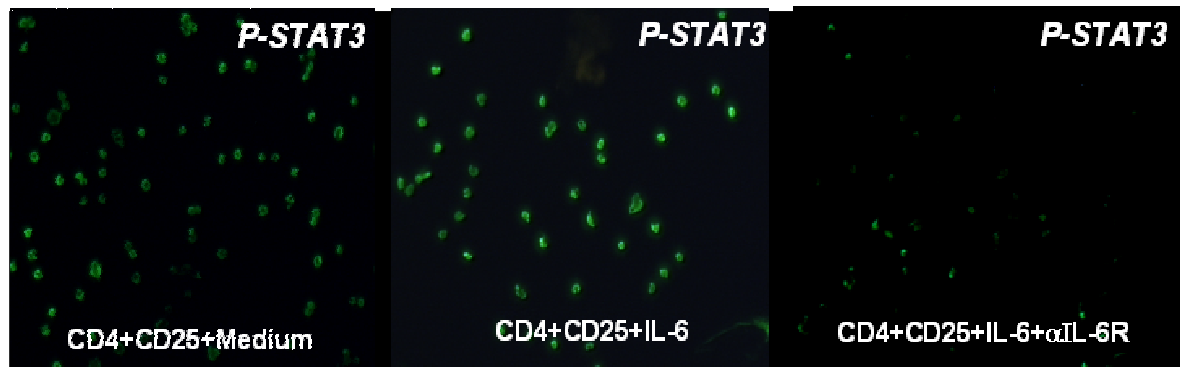


Abb. 29: Die Applikation von α IL-6R-Antikörpern führt zu einer verminderten Aktivierung der STAT3 abhängigen Signaltransduktion bei CD4+CD25+ T-Zellen aus der Milz

5×10^4 CD4+CD25+ T-Zellen aus der Milz wurden für 30min entweder allein (links), mit IL-6 (20ng/ml) (Mitte) oder mit IL-6+anti-IL-6R (10 μ g/ml) (rechts) in Anwesenheit von löslichen anti CD3-Antikörpern (2,5 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gegen p-STAT-3 gefärbt und bei 200 facher Auflösung analysiert.

Um den Einfluss von IL-6 auf die CD4+CD25+ T-Zellfunktion zu untersuchen, wurden diese aus der Milz isoliert und entweder allein (links), in Anwesenheit von IL-6 (Mitte) oder IL-6+anti-IL-6R (rechts) inkubiert. Es konnte demonstriert werden, dass IL-6 die Phosphorylierung und nukleäre Translokation von STAT-3 in CD4+CD25+ T-Zellen induziert (Abb. 29 Mitte). Die mit Phosphorylierung einhergehende Aktivierung des STAT-3 Signalweges wird durch die Koinkubation von α IL-6R-Antikörper antagonisiert, wie anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität ersichtlich ist (rechts). In dem vorliegenden Asthmodell bedeutet dies, dass der STAT-3 abhängigen Signaltransduktion ein wichtiger Stellenwert in der durch IL-6 vermittelte Signaltransduktion zukommt.

3.1.4.7 Der adoptive Transfer von CD4+CD25+ T-Zellen von anti-IL-6R behandelten Mäusen führt zu einer Inhibition der Entzündungen in der Lunge

CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen sind bekannt für ihre suppressive Fähigkeiten auf anderen Zellen des Immunsystems [Maloy und Powrie, 2001, Belkaid et al., 2002, Pasare und Medzhitov, 2003]. Aus diesem Grund sollten die

immunsuppressiven Eigenschaften CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Lymphozyten während einer IL-6R-Antikörper Behandlung *in vivo* charakterisiert werden.

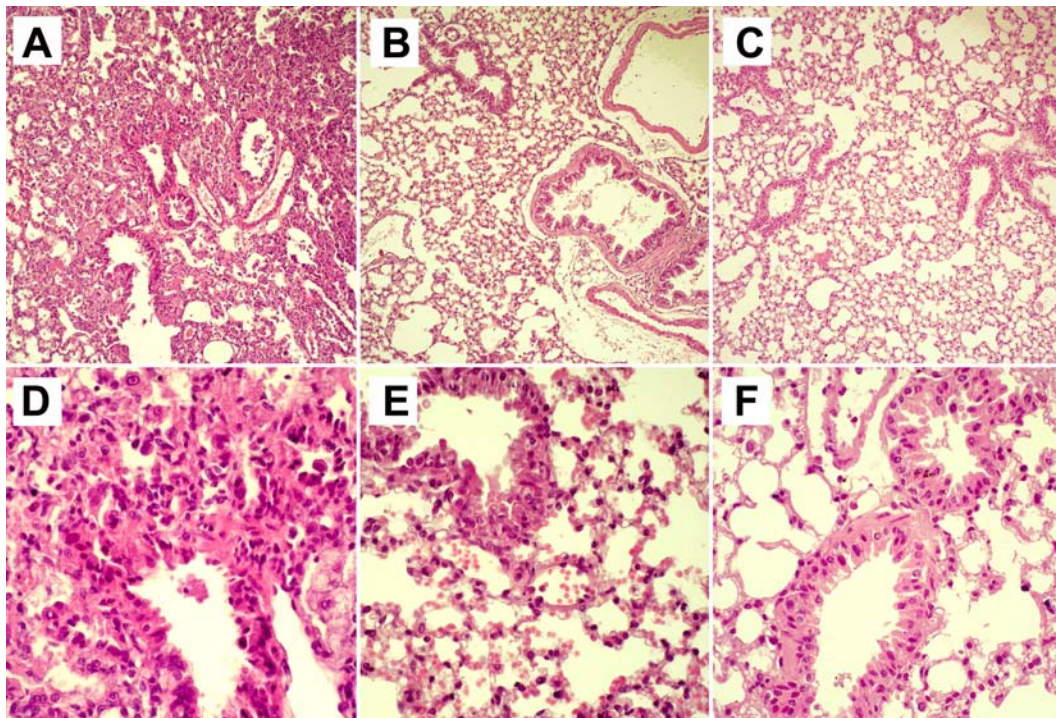


Abb. 30: CD4⁺CD25⁺ T-Zellen OVA-sensibilisierter Mäuse können experimentelles Asthma in Rag1^{-/-} Mäusen, induziert durch CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen, inhibieren

Dargestellt sind Hämatoxylin- und Eosin-gefärbte Schnitte (HE) aus der Lunge von Rag1^{-/-} Mäusen, die adoptiv mit CD4⁺CD25⁺ als auch CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Milz OVA-sensibilisierter, Antikörper-behandelter Mäuse transferiert wurden. 5 x 10⁵ Zellen aus α IL-6R oder IgG behandelten Tieren wurden mit CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen aus der Milz OVA behandelte Tiere in Rag1^{-/-} Mäuse i.p. cotransfiziert. In Abb.30 A und D ist die Rekonstitution von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen dargestellt. In B und E ist die Rekonstitution von CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ mit CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus OVA/IgG behandelten Tieren und in C und F die Rekonstitution mit OVA/ α IL-6R-Antikörper behandelten Tieren dargestellt. Die Bilder A-C wurden bei 100-facher Vergrößerung und Abb. D-F bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Fotos sind repräsentativ für 4-6 Tiere pro behandelter Gruppe.

Ziel dieser Studie war die *in vivo* Charakterisierung immunsuppressiver Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten nach Behandlung mit α IL-6R-Antikörpern. Um die Bedeutung CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in der Pathogenese von Asthma zu veranschaulichen, wurden CD4⁺CD25⁺ als auch CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Milz OVA sensibilisierter Mäuse, die während der Provokationsphase i.n. entweder mit α IL-6R- oder IgG-Kontrollantikörpern behandelt wurden, isoliert und in Rag1 immundefiziente Mäuse intraperitoneal (i.p.) kotransferiert. Der adoptive Transfer CD4⁺CD25⁻ CFSE-markierter T-Zellen mit

CD4⁺CD25⁻ OVA-IgG behandelten Zellen zeigt eine starke Inflammation in der Lunge der Rag1^{-/-} Mäuse (Abb. 30 A+D), wobei die Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus OVA/IgG behandelten Tieren einen Rückgang der allergischen Entzündungen in der Lunge zeigt (Abb. 30 B+E). Nach dem i.p. adoptiven Transfer aus OVA+ α IL-6R-Antikörper behandelten Zellen plus CFSE-markierter CD4⁺CD25⁻ Zellen aus der Milz ist dieser Effekt sogar um einiges stärker ausgeprägt. Die Inflammation ist geringer (Abb. 30 C+F).

3.1.4.8 weniger Effektorzellen in der Lunge nach Kotransfer mit CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Nachdem die suppressiven Eigenschaften regulatorischer T-Zellen in der Lunge durch den Rückgang inflammatorischer Zellen demonstriert werden konnte, sollte außerdem die Inhibition der CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen durch die Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in der Lunge nachgewiesen werden.

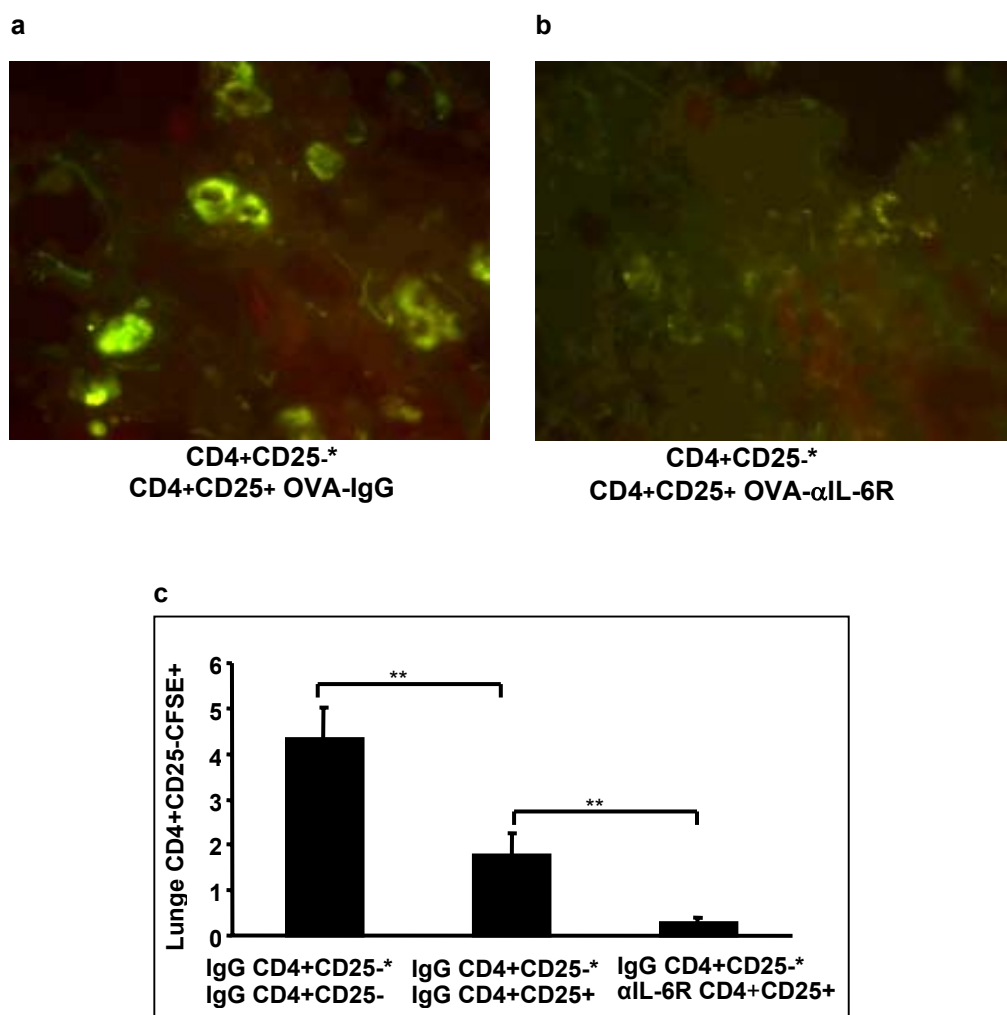


Abb. 31: Nach der Applikation von CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen werden CFSE positive T-Zellen in der Lunge detektiert, ein Hinweis auf das *homing* dieser Population in der Lunge

5×10^5 CD4+CD25⁻ T-Zellen OVA/IgG behandelte Mäuse wurden CFSE markiert und entweder mit 5×10^5 CD4+CD25⁻ T-Zellen OVA/IgG behandelte Tiere, 5×10^5 CD4+CD25⁺ T-Zellen OVA/IgG behandelte Mäuse oder mit 5×10^5 OVA/ α IL-6R-Antikörper behandelte Mäuse in Rag1^{-/-} Mäuse i.p. cotransferiert (n=4-6)

Der Kotransfer von CFSE markierten CD4+CD25⁻ mit CD4+CD25⁻ T-Zellen zeigt CFSE positive Zellen in der Lunge (Abb. 31a+c). Dagegen ist nach Kotransfer von CD4+CD25⁻ mit CD4+CD25⁺ T-Zellen OVA/IgG behandelte Tiere ein signifikanter Rückgang dieser Zellpopulation zu erkennen (Abb. 31b). Zudem zeigt die gleichzeitige Applikation CD4+CD25⁻ T-Zellen mit CD4+CD25⁺ T-Zellen aus α IL-6R-Antikörper behandelten Mäusen einen stärkeren Rückgang CFSE markierter CD4+CD25⁻ T-Effektorzellen (Abb. 31c) verglichen mit dem Kotransfer von IgG behandelten T-Zellen (**p=0,00040). Diese Ergebnisse deuten auf eine Inhibition der Proliferation von Effektorzellen durch CD4+CD25⁺ T-Zellen. Außerdem zeigen die CD4+CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, isoliert aus α IL-6R behandelten Tieren ein höheres suppressives Potential verglichen zu denen, die aus IgG behandelten Mäusen isoliert wurden. Zudem ist die Anzahl CD4+CD25⁺ T-Zellen unter *in vivo* Bedingungen wichtig bei der Induktion der suppressiven Funktion bei allergischer Inflammation in der Lunge.

IL-6 kontrolliert in der Lunge die Balance zwischen der Funktion von Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen über unterschiedliche Wege, dem sIL-6R oder dem mIL-6R. Die Blockade des IL-6 Signalwegs wirkt sich positiv auf experimentelle Asthmastudien aus, wobei die Blockade des sIL-6R zur Unterdrückung der T_H2 Zellentwicklung und die Blockade des mIL-6R zu einer Expansion von CD4+CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in der Lunge führt.

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, ob auch Cytokine wie IL-2 bei der Induktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen beteiligt sind. Zahlreiche Studien belegen eine essentielle Rolle von IL-2 in Funktion und Homeostase CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welchen Effekt die Blockade des IL-2R auf CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen ausübt.

3.2 Ergebnisse zur intranasalen Applikation von Antikörpern gegen die IL-2R α - bzw. β - in einem murinen *in vivo* Asthmodell

3.2.1 Messung der AHR unter Provokation mit dem Bronchokonstriktor Methacholin bei Tieren, die während der OVA-Provokationsphase mit Antikörpern gegen die IL-2R α bzw. - β -Kette behandelt wurden

Durch eine invasive Bodyplethysmographie, bei der die *Resistance* durch den Vergleich des pulmonalen Druckes und des Körperdruckes in Abhängigkeit von der verabreichten Methacholinmenge gemessen wird, wurde der Effekt der Blockade der IL-2R α bzw. β -Kette auf die bronchiale Hyperreagibilität hin untersucht.

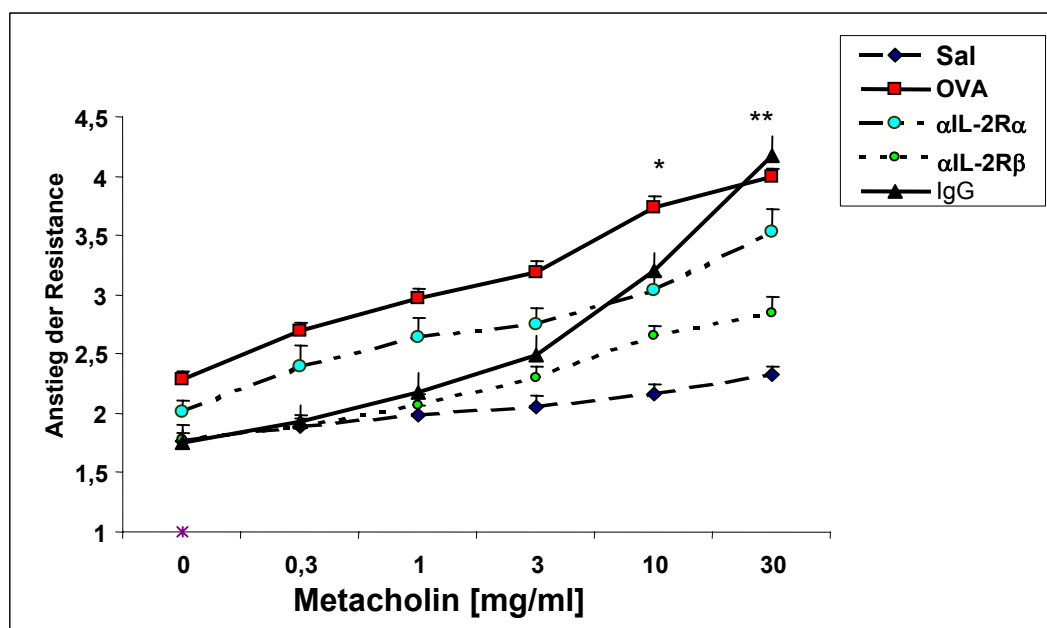


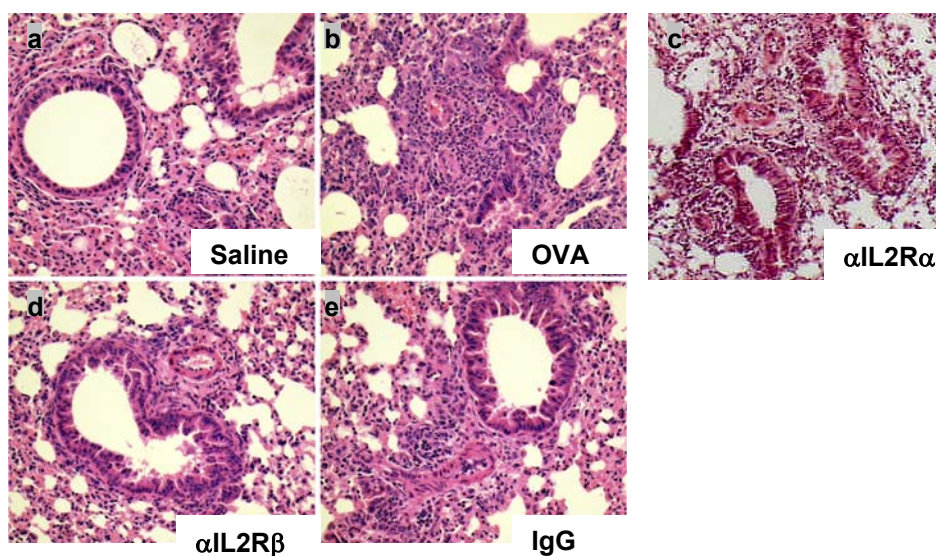
Abb. 32: Die Blockade des IL-2R-Antikörper durch intranasale Applikation der anti-IL-2R β Kette reguliert die AHR und die Entzündung in der Lunge bei OVA sensibilisierten und provozierten Mäusen

Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von fünf, in dem 4-5 Balbc Mäuse pro Gruppe mit OVA sensibilisiert und während der Provokationsphase intranasal mit Antikörpern gegen die IL-2R α bzw. - β -Kette behandelt wurden. Die invasive Messung der AHR in tracheotomierten Mäusen erfolgte nach intratrachealer Verabreichung von ansteigenden Dosen MCh. Die intrapulmonale Resistenz wurde 24h nach der letzten lokalen Applikation der Antikörper gemessen.

In Abbildung 32 ist der MCh-induzierte Anstieg der AHR bei OVA und OVA/IgG behandelten gegenüber Saline oder Antikörper behandelten Tieren demonstriert. Die Induktion einer asthmatischen Reaktion, charakterisiert durch einen Anstieg der AHR, ist somit nach OVA-Behandlung am effektivsten. Bei dieser Gruppe ist ein Anstieg der AHR um das Doppelte gegenüber der Negativkontrolle mit Saline zu erkennen. Die OVA-induzierte AHR wird durch die lokale Applikation des α IL-2R β bei einer MCh-Dosis von 10 und 30 mg/ml signifikant reduziert (**p=0,0014). Bei α IL-2R α behandelten Mäusen verläuft die AHR zwischen der OVA behandelten- und IgG behandelten Kontrollgruppen. In diesem Asthmodell deuten diese Daten darauf hin, dass die bronchiale Hyperreagibilität nur über die Blockade des IL-2R β nicht jedoch über die Blockade des IL-2R α reguliert wird.

3.2.2 Beurteilung der intrapulmonalen inflammatorischen Reaktion durch Analyse HE-gefärbter Lungenpräparate

In Abbildung 32, Kapitel 3.2.1 wurde demonstriert, dass die lokale Blockade der IL-2R β -Kette mit einer Reduktion der AHR assoziiert ist. Um Rückschlüsse auf eine allergische Entzündung der Atemwege zu ziehen, sollte untersucht werden, ob gleichzeitig eine Veränderung der intrapulmonalen Akkumulation inflammatorischer Zellen zu beobachten ist. In Zusammenarbeit mit Prof. Lehr, Lausanne, Schweiz, wurden hierzu Hematoxylin-Eosin gefärbte Lungenpräparate hergestellt und insbesondere auf Eosinophile als Hinweis auf eine allergische Beteiligung hin quantitativ ausgewertet.



f

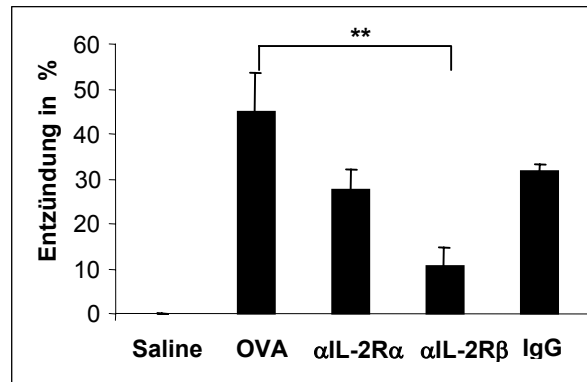


Abb. 33: Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette verbessert die durch eosinophile Granulozyten induzierte Entzündung in der Lunge bei OVA sensibilisierten und provozierten Mäusen

Darstellt sind HE-gefärbte histologische Präparate der Versuchsgruppen a) Saline, b) OVA, c) OVA+ α IL-2R α , d) OVA+ α IL-2R β , e) OVA+IgG bei einem Vergrößerungsfaktor von 400. Nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation manifestiert sich im peribronchialen Gewebe ein deutliches Infiltrat aus eosinophilen Granulozyten und mononukleären Zellen (b) im Vergleich zu der Negativkontrolle mit Saline (a). Die Positivkontrolle mit OVA+IgG bestätigt diese Ergebnisse (e). Unter i.n. Applikation der α IL-2R α -Kette lässt sich keine signifikante Modifikation der zellulären Entzündungsreaktion im Vergleich zur OVA-Gruppe verifizieren (c+f). Die intranasale Applikation von Antikörpern gegen die IL-2R β -Kette (d) führt im Gegensatz zur Blockade der IL-2R α -Kette (c) zur wesentlichen Verbesserung der Entzündung in der Lunge. In Abb. 33f sind die einzelnen Schnitte qualitativ ausgewertet. Hierbei wurden eosinophile Granulozyten unter dem Mikroskop analysiert und quantifiziert als: +/-: kaum Entzündung; + wenig Entzündung; ++ mittlere Entzündung; +++: starke Entzündung (n=3-7)

Am Tag nach der letzten Provokation mit OVA war bei den mit anti-IL2R β (Abb. 33d) behandelten BALB/c-Mäusen im Vergleich zu den OVA und Isotyp-Kontrollen (Abb. 33a+e) die Zahl der in die Atemwege eingewanderten eosinophilen Granulozyten signifikant herabgesetzt (**p=0,0016), während diese nach Behandlung mit einem Antikörper gegen die IL-2R α -Kette unverändert blieben (Abb. 33c).

3.2.3 Verminderte Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 in CD4⁺ T-Zellen, isoliert aus der Lunge anti-IL-2R β -Antikörper behandelte Mäuse

Als Marker einer T_H2 Immunantwort wurden als nächstes die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in CD4⁺ T-Zellen der Lunge gemessen. Es sollte untersucht werden, inwieweit T_H2 Cytokine in einem murinen *in vivo* Asthmodell nach lokaler Blockade des IL-2R beeinflusst werden können.

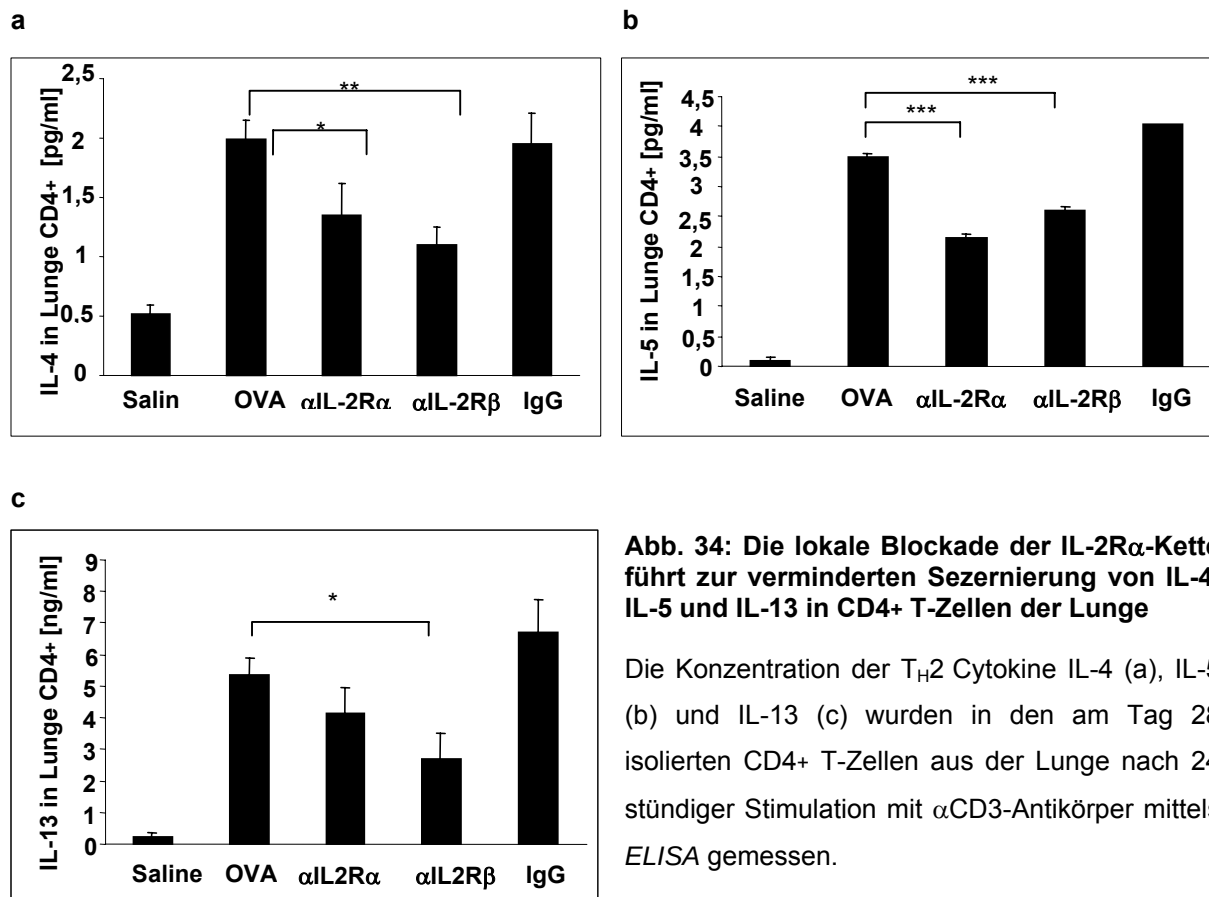


Abb. 34: Die lokale Blockade der IL-2R α -Kette führt zur verminderten Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-13 in CD4 $^{+}$ T-Zellen der Lunge

Die Konzentration der T_H2 Cytokine IL-4 (a), IL-5 (b) und IL-13 (c) wurden in den am Tag 28 isolierten CD4 $^{+}$ T-Zellen aus der Lunge nach 24 stündiger Stimulation mit α CD3-Antikörper mittels ELISA gemessen.

Die selektive Blockade der IL-2R α bzw. β -Kette führt zu einer signifikanten Herunterregulierung von IL-4 (α IL2R α :0,038; α IL-2R β :0,0012) (Abb. 34a) und IL-5 (α IL2R α :1,6245E-06; α IL-2R β :6,78272E-06) (Abb. 34b), aber nur durch die Blockade der IL-2R β -Kette wird eine signifikante Reduktion von IL-13 in CD4 $^{+}$ T-Zellen der Lunge erzielt (p =0,0115) (Abb. 34c).

3.2.4 Konzentration einiger Cytokine in der BALF nach intranasaler Applikation der Antikörper gegen die IL-2R α bzw. β -Kette

Im Weiteren wurde das Cytokinprofil in der BALF von OVA-sensibilisierten und provozierten Mäusen untersucht, die während der Provokationsphase mit Antikörpern gegen die IL-2R α bzw. β -Kette behandelt wurden.

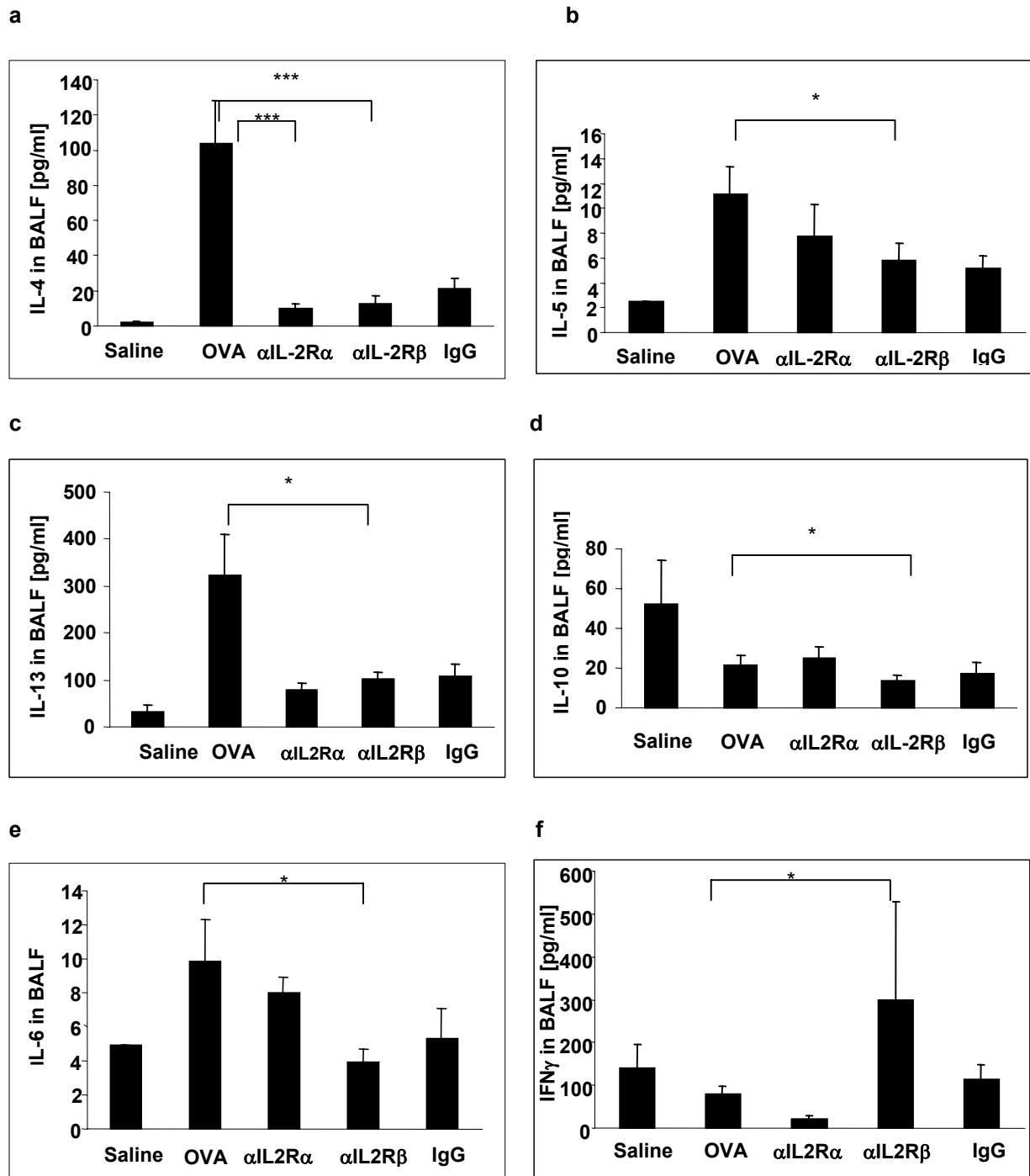


Abb. 35: Die *in vivo* Blockade der IL-2R β -Kette führt zur Reduktion der T_H2 Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Auch die Konzentration der Cytokine IL-10 und IL-6 resultiert in einer Abnahme, wobei IFN γ in der BALF vermehrt sezerniert wird

In Abbildung 35 ist die Quantifizierung der Konzentrationen der Cytokine a) IL-4, b) IL-5, c) IL-13, d) IL-10, e) IL-6 und f) IFN γ in der BAL mittels ELISA dargestellt.

In der OVA-Gruppe zeigt sich durch die Behandlung mit dem anti-IL-2R α -Antikörper eine signifikante Herunterregulierung von IL-4 ($***p=0,00013$ (a)) und IL-13 ($*p=0,031$ (c)). Die Behandlung mit dem Antikörper gegen die IL-2R β -Kette zeigt dagegen eine signifikante Reduktion der Cytokine IL-4 ($***p=0,00021$; Abb. 35a), IL-5 ($*p=0,022$; Abb. 35b), IL-13 ($*p=0,021$; Abb. 35c) und auch IL-10 ($*p=0,0409$; Abb. 35d) in der BAL. Verglichen zur OVA-Behandlung ist nach Blockade des IL-2R β , das proinflammatorische Cytokin IL-6 deutlich erniedrigt ($*p=0,024$) (Abb. 34e). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Abnahme inflammatorischer Zellen in den Atemwegen. IFN γ dagegen ist nach dieser Behandlung deutlich erhöht ($*p=0,041$).

3.2.5 Quantifizierung der inflammatorischen Zellen in der BALf nach i.n. Blockade der IL-2R α bzw. β -Kette in einer Konzentration von 50 μ g/Tag

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Blockade der IL-2R β -Kette die Entzündung in der Lunge signifikant verbessert, sollte evaluiert werden, ob die lokale Blockade des IL-2 *Signaling* zu einer Modifikation der entzündlichen Reaktion, gemessen anhand der Zellzahl in der BAL führt.

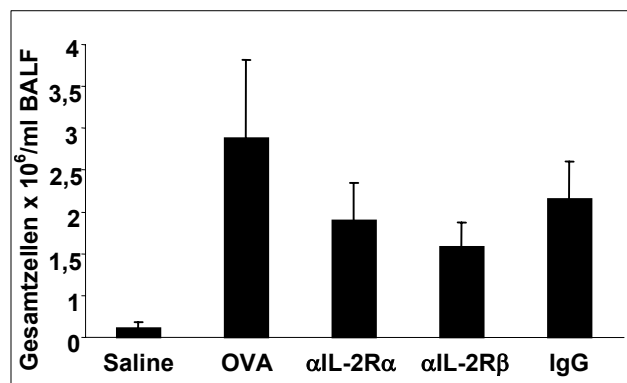


Abb. 36: Die Behandlung mit Antikörpern gegen die IL-2R β -Kette führt zur Abnahme der Gesamtzellzahl und somit zur Abnahme inflammatorischer Zellen in der am Tag 28 gewonnenen Lavage

Bestimmt wurde die Gesamtzellzahl/ml BAL nach i.n. Applikation gegen die IL-2R α - bzw. β -Kette in einer Konzentration von 50 μ g/Tag.

Die Saline-Kontrollgruppe weist eine nur geringe Gesamtzellzahl in der BALF auf, wohingegen nach OVA-Sensibilisierung ein ca. 20 facher Anstieg der Gesamtzellzahl zu erkennen ist. Unter zusätzlicher Behandlung OVA-sensibilisierter Mäuse mit α IL-2R α -Antikörper kann ein Abfall der Zellzahl in der BALF beobachtet werden, welcher nach Blockade der IL-2R β -Kette weiter abnimmt. Jedoch sind diese Daten nicht signifikant.

3.2.6 Phosphorylierung von STAT-5 als Antwort auf die IL-2R Blockade

Aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien ist bekannt, dass IL-2 u.a. eine Aktivierung des JAK/STAT Signalweges induziert, wobei im Hinblick auf die weitere Signaltransduktion insbesondere die Phosphorylierung von STAT-5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) relevant ist. Infolgedessen wurde der Aktivierungszustand dieses Signalweges im pulmonalen Gesamtprotein analysiert.

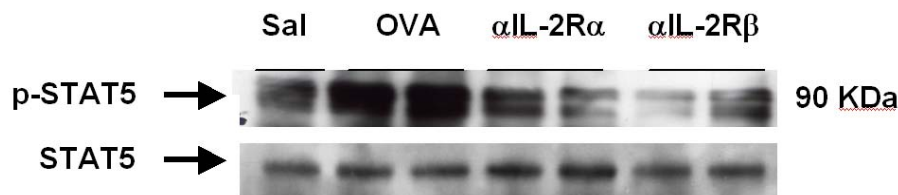


Abb. 37: Die Blockade des IL-2R β führt zur verminderten Phosphorylierung und somit verminderten Aktivierung der STAT-5-abhängigen Signaltransduktion im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe

Dargestellt ist die unter Methoden beschriebene Immunpräzipitation zur Analyse des Aktivierungszustandes des STAT-5-Signalweges im pulmonalen Gesamtprotein (obere Banden). 150 μ g Gesamtprotein wurde mit STAT-5 präzipitiert und in einem *Western Blot* mit α P-Tyr detektiert. In der OVA-Gruppe ist im Vergleich zu der Negativkontrolle eine verstärkte Phosphorylierung von Stat an Tyr 694 nachzuweisen.

Abbildung 37 stellt die Ergebnisse einer Immunpräzipitation für STAT-5 im Gesamtprotein der Lunge dar. Die Detektion der aktivierten Form durch phosphorylierte Tyrosinreste ergibt hingegen eine deutliche Zunahme von p-STAT-5 nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zur Saline behandelten Kontrolle, wie anhand der Bandenstärke ersichtlich ist. Die Blockade des IL-2R β dagegen zeigt auch in dem vorliegenden Asthmodell eine verminderte Phosphorylierung von STAT-5 an Tyr694 und resultiert in einer Reduktion des Aktivierungsgrades dieses Signaltransduktionsweges. Das Expressionsniveau des biologisch inaktiven STAT-5 dagegen zeigt keinen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

3.2.7 Die lokale Blockade der IL-2 Rezeptor α als auch β -Kette führen zu einer reduzierten Expression CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Lunge

Es wurde bereits gezeigt (Abb. 35, Kapitel 3.2.4), dass die proinflammatorischen Cytokine IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 und auch IL-6 in der BALF nach Blockade der IL-2R β -Kette sichtlich reduziert waren. Analog dazu konnte gezeigt werden, dass nach

Blockade der IL-2R β -Kette auch die AHR verbessert wurde (Abb. 32). Es stellte sich nun die Frage, ob nach Blockade des IL-2-Rezeptors regulatorische T-Zellen induziert werden, die einen positiven Effekt auf die AHR zeigen [Doganci, et al. 2005]. Dazu sollten zunächst CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Gesamtzellen aus der Lunge untersucht werden.

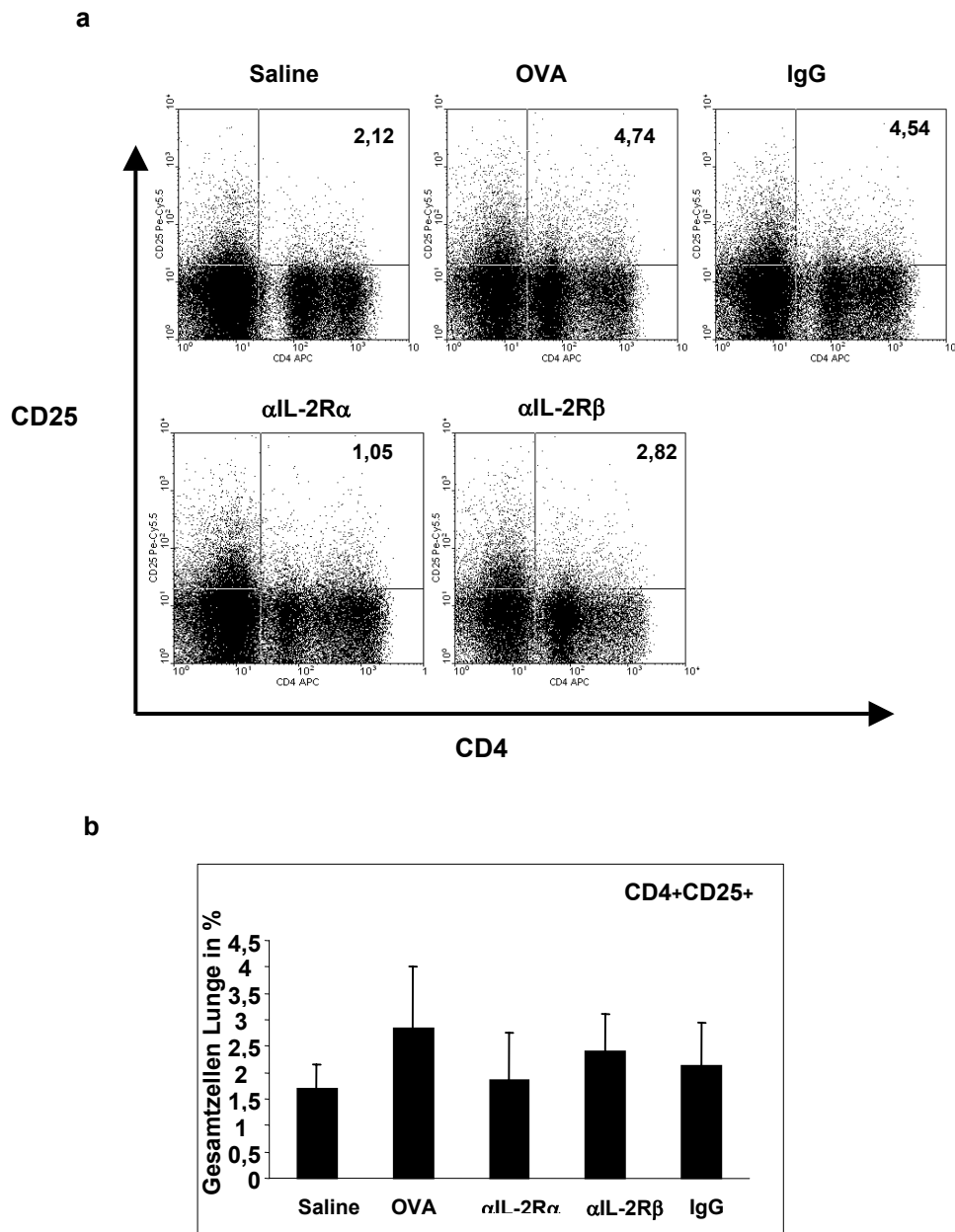


Abb. 38: Die lokale Gabe der IL-2R α bzw. β -Antikörper resultieren in einer verminderten Expression von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Lunge

Dargestellt ist in Abbildung 38a die Oberflächenfärbung für CD4 und CD25 in der Gesamtzellpopulation der Lunge. 5×10^5 Gesamtzellen aus der Lunge wurden im FACS analysiert (a). Die Zahlen in den *dot plots* zeigen die Prozentzahl der CD4⁺CD25⁺ doppelt positiven T-Zellen in der Gesamtlunge an. Jedes *dot plot* repräsentiert eine Lunge. In (b) ist eine Quantifizierung mehrerer gleich behandelter Lungen als Mittelwert dargestellt. Die Behandlung mit den Antikörpern hat keinen signifikanten Einfluss auf die CD4⁺CD25⁺ T-Zellentwicklung.

Nach Aktivierung der Zellen durch OVA und der Positivkontrolle mit OVA+IgG werden vermehrt CD4CD25 doppelt positive Zellen auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert. Nach Blockade der IL-2R α -Kette (anti-CD25) dagegen nimmt die CD25 Expression ab. Durch die Blockade der IL-2R β -Kette wird die CD4CD25 Expression nicht signifikant induziert.

3.2.8 Analyse CD4+CD25+ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten

Da keine Induktion CD4+CD25+ T-Zellen in der Lunge durch die Blockade der IL-2R α oder auch β -Kette nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob durch diese Behandlung CD4+CD25+ T-Zellen in den Lymphknoten beeinflusst werden.

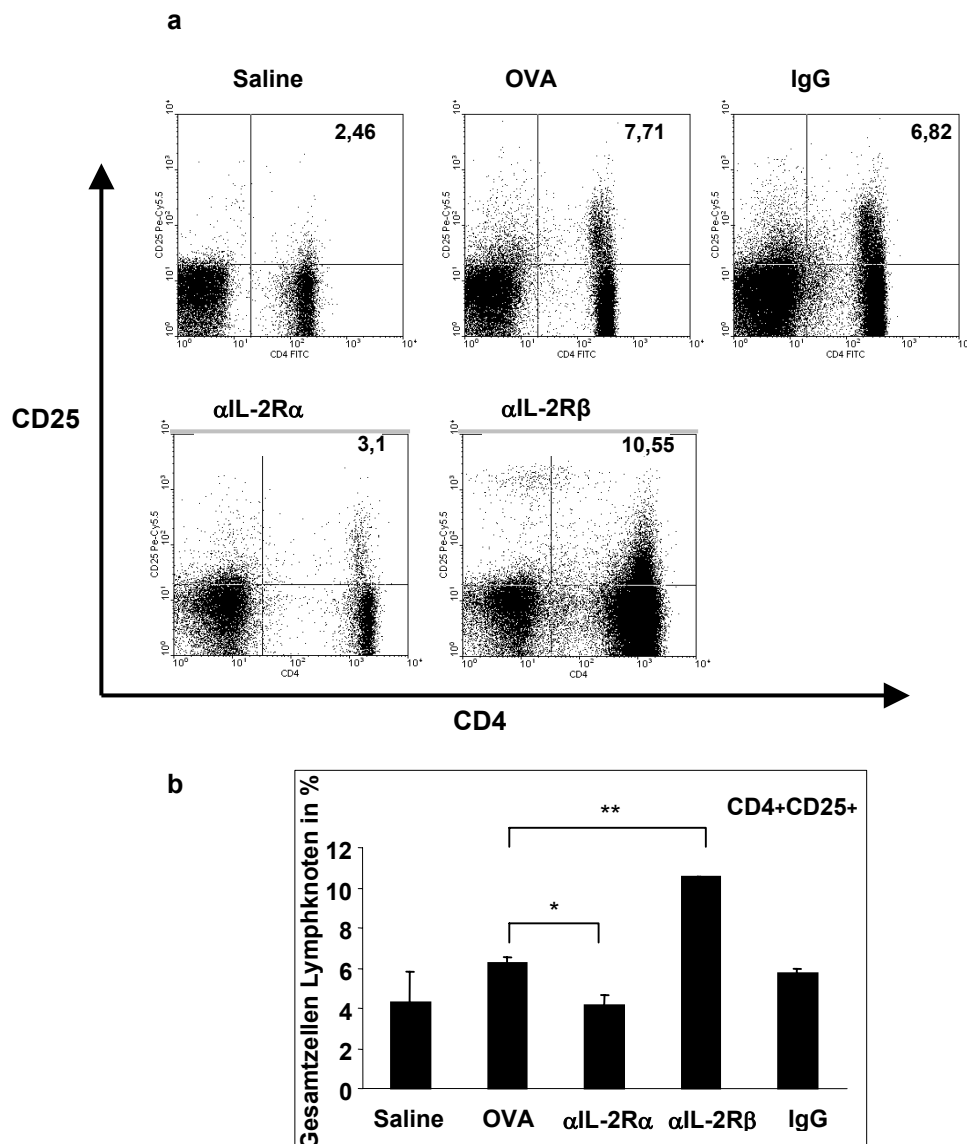


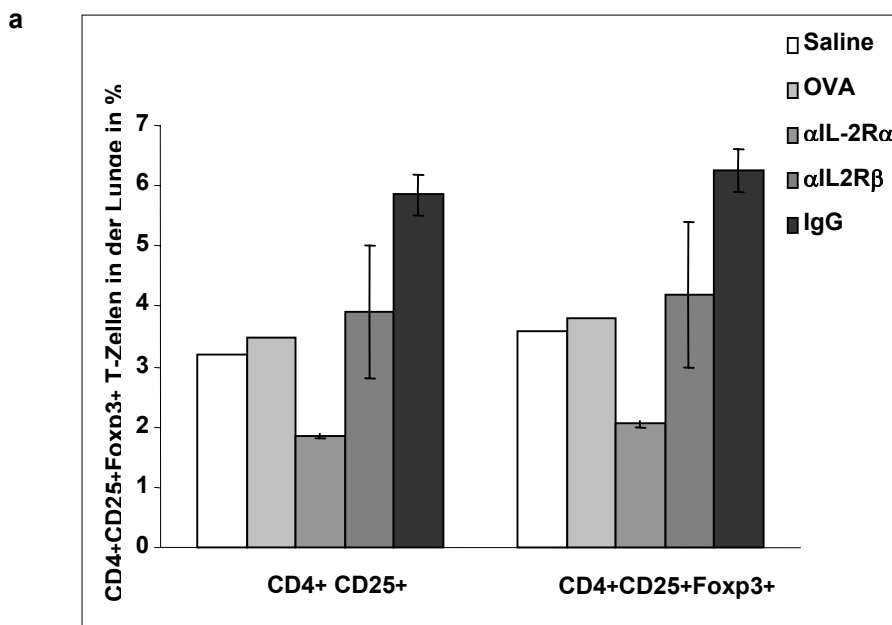
Abb. 39: Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette induziert eine verstärkte Expression CD4+CD25+ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten

5×10^5 Gesamtzellen aus der Lymphknoten jeder Gruppe wurden für die Oberflächenfärbung eingesetzt (a). In b ist die Quantifizierung der *dot plots* gezeigt. Mäuse, die i.n. mit Antikörpern gegen die IL-2R α Kette behandelt wurden, zeigen eine verminderte Expression doppelt positiver T-Zellen (* $p=0,023$). Nach Behandlung mit Antikörpern gegen die IL-2R β -Kette werden CD4+CD25+ T-Zellen signifikant induziert (** $p=0,0025$).

Nach Antigenkontakt steigt die Expression von CD25 (IL-2R α) von 2,46% (Saline) auf 7,71% (OVA) und auf 6,82% (OVA+IgG) in den Gesamtzellen der Lymphknoten an. Nach lokaler Blockade mit α IL-2R α ist ein Rückgang der CD4+CD25+ T-Zellpopulation zu erkennen (3,1%, * $p=0,023$). Die Blockade der IL-2R α -Kette stellt eine positive Kontrolle dar, das den Erfolg einer i.n. Behandlung zeigt. Die Blockade des IL-2R β dagegen führt zu einer signifikanten Induktion der CD4+CD25+ T-Zellpopulation mit 10,5% der Gesamtzellen (** $p=0,0025$).

3.2.9 CD4+CD25+Foxp3+ Expression in Lunge und Lymphknoten Antikörper-behandelter Mäuse

Es ist nicht möglich, regulatorische T-Zellen nur aufgrund der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 zu charakterisieren, da CD25 kein spezifischer Treg Marker ist. Auch konventionelle CD4+ T-Zellen exprimieren nach Antigenkontakt in der Peripherie CD25 auf ihrer Oberfläche. Um eine Aussage über regulatorische T-Zellen machen zu können, wurde anhand einer intrazellulären Färbung Foxp3 in den Zellen untersucht, welcher nach wie vor als der einzig anerkannte endogene Marker humaner und muriner CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen akzeptiert ist [Roncador, et al., 2005].



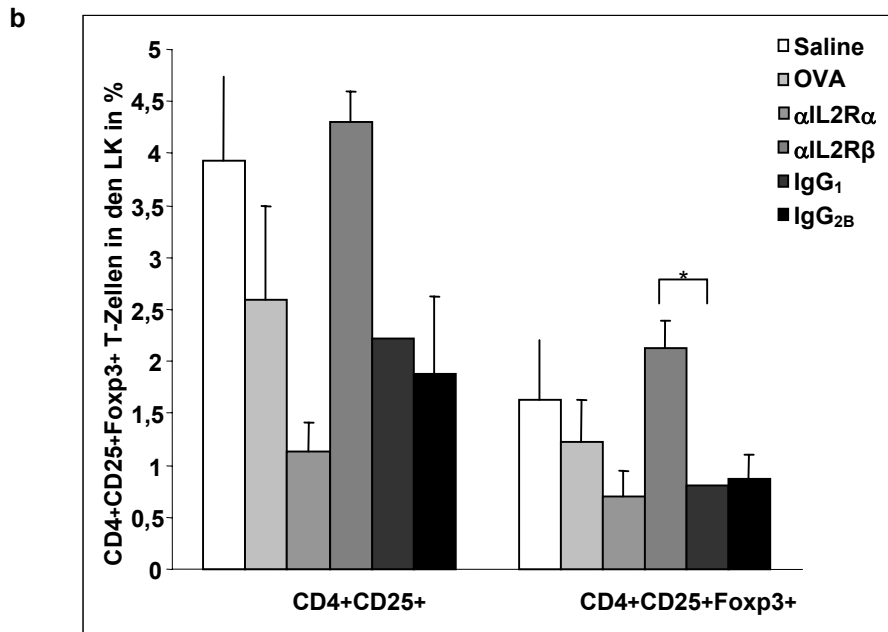


Abb. 40: Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette führt zu einer Induktion CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischer T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten

1×10^6 Gesamtzellen aus der Lunge (a) und den Lymphknoten (b) wurden, wie in Methoden beschrieben, für die intrazelluläre Foxp3 Färbung eingesetzt. Zur Auswertung dreifach positiver Zellen, wurde die CD4+ T-Zellpopulation benutzt und aufgrund dieser CD25+ und Foxp3+ Zellen ausgewertet. Die Prozentzahlen auf den Balkendiagrammen beziehen sich somit auf die CD4 positive T-Zellpopulation. Sowohl in Lunge als auch den Lymphknoten ist nach Blockade der IL-2R α Kette (CD25), eine Reduktion der CD4+CD25+ und auch Foxp3+ T-Zellen zu erkennen.

Regulatorische T-Zellen exprimieren konstitutiv die IL-2R α -Kette (CD25) und machen etwa 5-10% aller peripheren CD4+ T-Zellen aus. Hier wurde untersucht, ob durch die *in vivo* Blockade mit Antikörpern gegen den IL-2R regulatorische T-Zellen induziert werden können. In der Lunge (Abb. 40a) konnte durch die Blockade des IL-2R β keine Induktion dieser Population gezeigt werden. In den Lymphknoten aber, ist nach Blockade der IL-2R β -Kette eine Induktion CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischer T-Zellen zu erkennen. Dieser Effekt ist sogar verglichen mit IgG₁ signifikant (*p=0,026).

3.2.10 Proliferation CD4 positiver T-Zellen in der Lunge und Lymphknoten

Die intrazelluläre Foxp3-Analyse deutet darauf hin, dass sich die CD4+CD25+ Tregs in den drainierenden Lymphknoten befinden, wo sie pathogene T-Zellantworten supprimieren und Autoimmunkrankheiten verhindern. Um diese Hypothese zu analysieren, wurde die Proliferation CD4+ T-Zellen in den Lymphknoten untersucht und der in der Lunge gegenübergestellt.

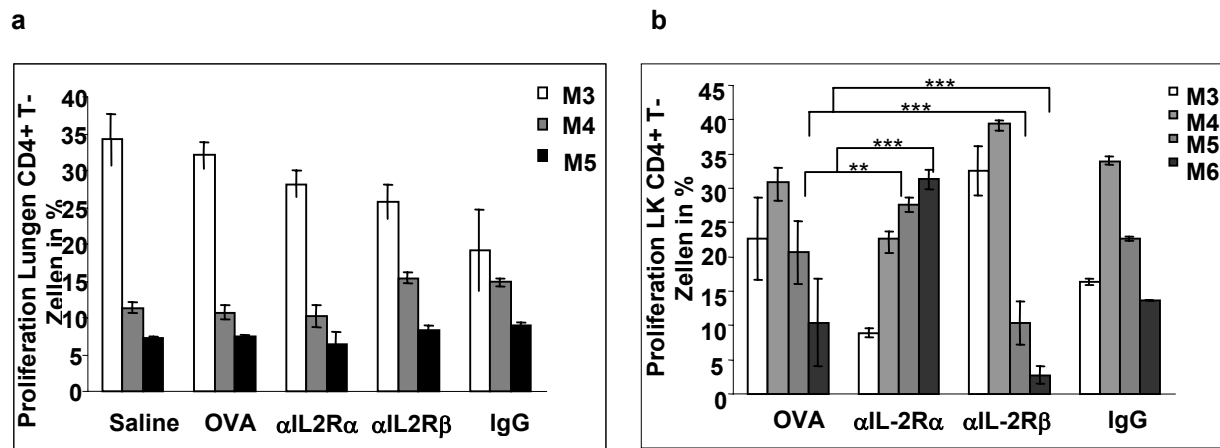


Abb. 41: Verminderte CD4⁺ T-Zellproliferation in den drainierenden Lymphknoten nach i.n. Applikation von α IL-2R β Antikörpern

1×10^5 CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge (a) oder den Lymphknoten (b) behandelter Mäuse wurden mit CFSE markiert und mit 1×10^4 APC's in Anwesenheit von α CD3-Antikörper über 4 Tage stimuliert. In der Lunge (a) sind keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen. In den Lymphknoten aber ist nach Blockade der IL-2R β -Kette die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen inhibiert.

In der Lunge (Abb.41a) ist kein Unterschied in der Proliferation der CD4⁺ T-Zellen in den unterschiedlichen Gruppen zu erkennen. In den Lymphknoten dagegen (Abb. 41b) proliferieren diejenigen CD4⁺ T-Zellen weniger, bei denen die IL-2R β -Kette blockiert wurde (M5:***p=0,00055; M6:***p=0,00015). Nach Blockade der IL-2R α -Kette ist sogar eine erhöhte Proliferation gegenüber der unbehandelten, OVA-sensibilisierten Gruppe zu erkennen (M5:**p=0,0014; M6:p=1,096E-6).

3.2.11 Die systemische Gabe von IL-2 bewirkt keine Induktion regulatorischer T-Zellen

IL-2 spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Homeostase regulatorischer T-Zellen, sondern auch bei der Aktivierung ihrer Funktion. Diese produzieren IL-2 nicht selbst und sind somit auf die Produktion anderer T-Zellen angewiesen. Das zeigt, dass die suppressive Aktivität regulatorischer T-Zellen durch die Interaktion mit aktivierten *target* Zellen via dem löslichen IL-2 stattfindet [Scheffold et al. 2005]. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass IL-2-Rezeptor Defekte, wie z.B. IL-2R α (-/-) oder IL-2R β (-/-) Mäuse zu einer verminderten Anzahl regulatorischer T-Zellen führen [Burchill et al., 2007]. Unter diesem Aspekt galt die Frage zu klären, ob die i.p. Gabe von IL-2 während der Sensibilisierungsphase mit OVA eine Induktion regulatorischer T-Zellen fördert.

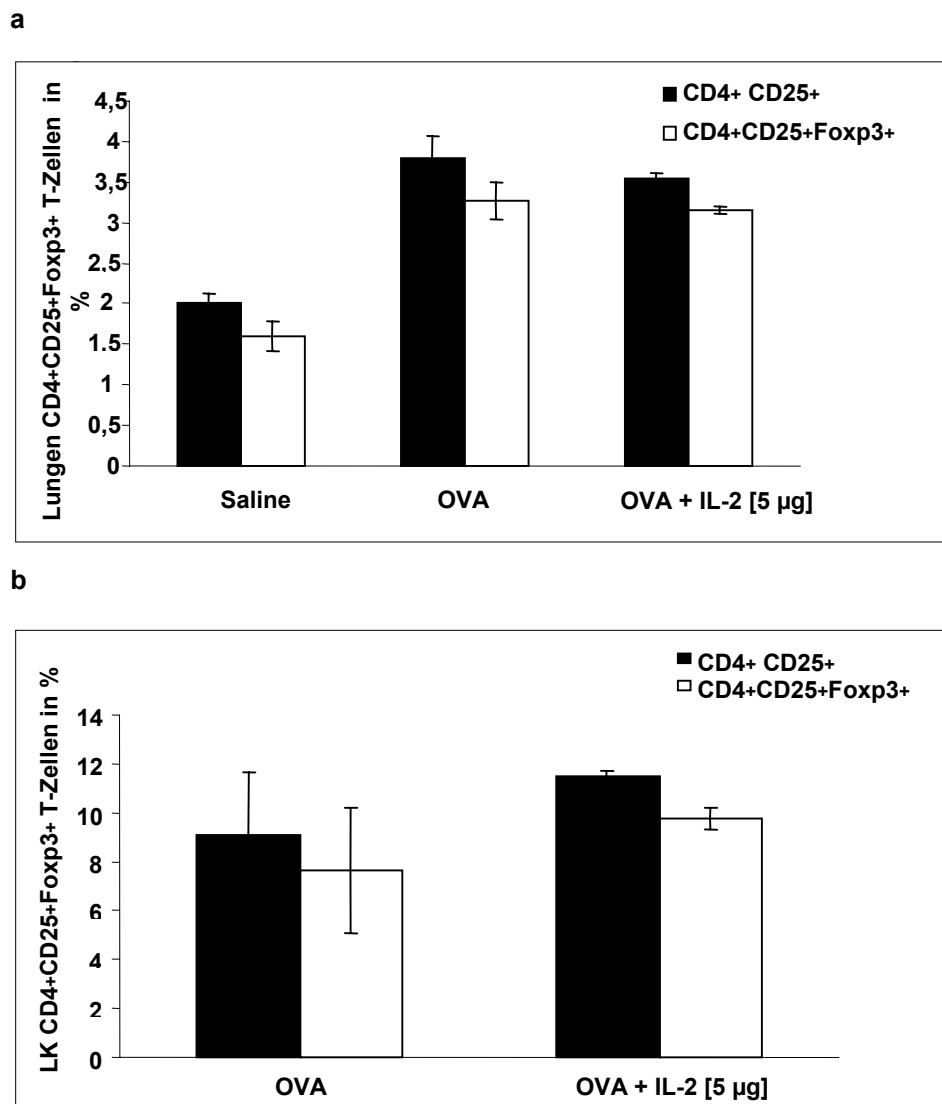


Abb. 42: Die i.p. Applikation von IL-2 während der Sensibilisierungsphase zeigt weder eine Induktion regulatorischer T-Zellen in der Lunge noch in den Lymphknoten

Während der Sensibilisierungsphase mit OVA an den Tagen 0 und 14 wurden die Mäuse zusätzlich i.p. mit 5µg IL-2 gespritzt. Am Tag 28 des Protokolls wurden die Lungen entnommen und mit 1×10^6 Gesamtzellen aus der Lunge eine intrazelluläre FACS-Färbung für Foxp3 vorgenommen. Die Behandlung mit IL-2 führte weder in der Lunge (a) noch in den Lymphknoten (b) zu einer signifikanten Induktion regulatorischer T-Zellen. In den Lymphknoten war lediglich der prozentuale Anteil an CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen höher als in der Lunge.

Obwohl regulatorische T-Zellen laut Literatur IL-2 abhängig sind, konnte die intraperitoneale IL-2 Applikation während der Sensibilisierungsphase an den Tagen 0 und 14 nicht zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen beitragen. In den Lymphknoten war zwar eine Erhöhung von 8 auf 10% CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen in den Gesamtzellen zu erkennen, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

3.2.12 Die i.p. Applikation von IL-2 während der Sensibilisierungsphase führt zur Phosphorylierung von STAT-5

In Abbildung 37 wurde bereits gezeigt, dass durch die lokale Blockade der IL-2R β -Kette die Phosphorylierung von STAT-5 abnimmt. Nun sollte untersucht werden, ob nach systemischer Gabe von IL-2 im Hinblick auf die weitere Signaltransduktion die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges und somit die Phosphorylierung von STAT-5 induziert wird.

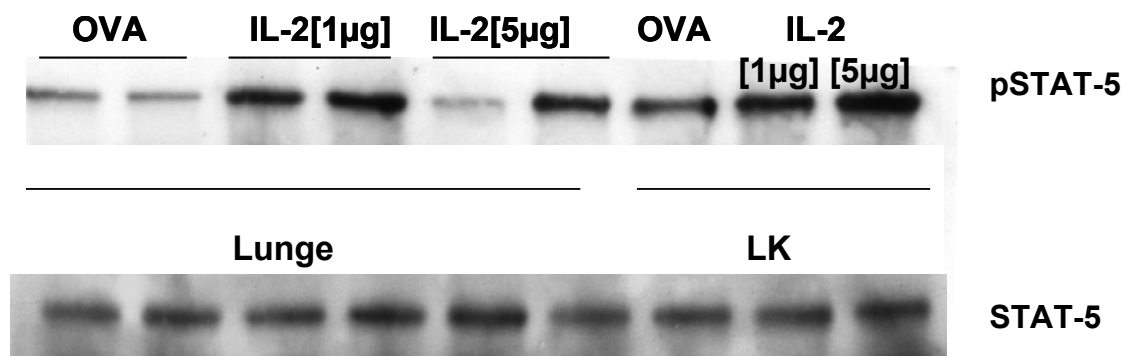


Abb. 43: Die systemische Gabe von IL-2 führt zur vermehrten Phosphorylierung von STAT-5 in Lunge sowie Lymphknoten

Dargestellt ist eine Immunopräzipitation zur Analyse des Aktivierungszustandes des STAT-5-Signalweges im Gesamtprotein der Lunge und Lymphknoten, wobei 150µg Gesamtprotein mit STAT-5 präzipitiert und in einem *Western Blot* mit α P-Tyr detektiert wurden. In der Lunge ist nach i.p. Applikation von IL-2 eine stärkere Phosphorylierung von STAT-5 im Vergleich OVA-behandelten Tieren zu erkennen. Dieser Effekt ist in der Lunge jedoch durch höhere Dosis von IL-2 [5µg] nicht induzierbar. In den Lymphknoten dagegen steigt die Phosphorylierung dosisabhängig an, wie anhand der Bandenstärke ersichtlich ist.

Abb. 43 zeigt nach i.p. IL-2 Applikation eine vermehrte Phosphorylierung von STAT-5 in der Lunge als auch Lymphknoten. Dieser Effekt scheint in der Lunge jedoch nicht dosisabhängig zu sein. Im Gegensatz dazu ist eine dosisabhängige Induktion der STAT-5-Phosphorylierung in den Lymphknoten zu erkennen. Die Phosphorylierung von STAT-5 bedeutet die Initiation der weiteren Signaltransduktion in der Zelle. Das bedeutet wiederum, dass Gene angeschaltet werden, die in der Pathogenese von Asthma eine Rolle spielen. Da die Induktion regulatorischer T-Zellen mit der Inhibition der Phosphorylierung von STAT-5 zusammenzuhängen scheint, konnte mit diesem *Western-Blot* demonstriert werden, dass die Behandlung mit IL-2 die Induktion von Tregs unbeeinflusst lässt.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Die intranasale (i.n.) Gabe von Saline, OVA oder den jeweiligen Antikörperlösungen erfolgte mit einer den anästhesierten Mäusen direkt über der Nase aufgesetzten Eppendorfpipette, so dass die Mäuse die Flüssigkeit einatmen konnten. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass Verluste durch Verschlucken z.B. bei einer nicht unzureichenden Narkosetiefe oder die Beseitigung durch Alveolarmakrophagen nicht kontrolliert werden können. Wie viel von der eingeatmeten Flüssigkeit tatsächlich in die Lunge gelangt, kann daher nicht genau bestimmt werden. Folglich ist mit einer gewissen Streubreite der applizierten Antikörperlösungen zu rechnen. Solche Fehlerquellen könnten z.B. durch intratracheale Applikation der Antikörper behoben werden, da hier zumindest die Narkosetiefe als Störfaktor entfallen würde. Da für solche Anwendungen aber größere Volumina der Antikörperlösungen benötigt werden, kam diese Applikationsweise nicht in Frage, um das Immunsystem der Tiere nicht unnötig zu belasten.

Zur differenzierteren Einsicht in die funktionelle Bedeutung der Cytokine IL-6 und IL-2 wurde im Rahmen der Dissertation ein murines Asthmamodell auf Balb/c Hintergrund verwendet. Dabei wurden keine *Knock-out* Modelle verwendet, weil bei diesen Modellen das ganze Gen ausgeschaltet wird und somit der systemische Einfluss des Cytokins gehemmt wird. Es kann daher keine lokale Blockade auf pulmonaler Ebene erzielt werden. Bei einem transgenen Tiermodell ist die Begrenzung auf lokaler Ebene zwar gegeben, der methodische Schwachpunkt liegt hier aber darin, dass eine Differenzierung zwischen den vermittelten Effekten des löslichen oder mIL-6R nicht möglich ist. Sowohl bei *Knock-out* Tieren als auch bei Transgenen werden zudem mögliche Funktionen beeinflusst, die während der Embryonalzeit oder in der Sensibilisierungsphase des Asthmaprotokolls vorkommen. Zudem konnte eine i.p. Applikationsweise ausgeschlossen werden, da durch die systemische Gabe von α IL-6R-Antikörpern ein *Feedback*-Mechanismus ausgelöst wurde, der die Entzündungsparameter verschlimmerte (siehe Abb. 46, Kapitel 4.2.5. und Abb. 47b, Kapitel 4.2.6).

Infolgedessen erfolgte die Blockade mit gp130Fc und anti-IL-6R Antikörpern oder im zweiten Teil der Arbeit mit α IL-2R α und α IL-2R β Antikörpern intranasal, während der Provokationsphase mit OVA. Gleichzeitig kann durch diese Behandlung auch eine zeitliche Einsparung erreicht werden.



Teil 1:
gp130Fc
oder
 α IL-6R oder
IgG

Teil 2:
 α IL-2R α oder
 α IL-2R β oder
IgG

Abb. 44 Die intranale Behandlung einer Balb/c Maus mit entsprechenden Antikörpern

Dargestellt ist in Abbildung 44 die i.n. Behandlung mit Antikörpern während der Provokationsphase mit OVA. Dazu werden den Tieren unter Anästhesie 50 μ g Antikörper gelöst in 50 μ l PBS an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Für das genaue Protokoll siehe Methoden (Kapitel 2.3.2.3.)

4.2 Diskussion der Ergebnisse IL-6R

IL-6, ein pleiotropes Cytokin, das u.a. von aktivierten dendritischen Zellen sezerniert wird, zeigt proinflammatorische Effekte in der Pathogenese von Asthma, indem es naive CD4 T-Zellen in Richtung T_H2 polarisiert [Dodge et al. 2003]. Dieser Effekt kann durch die Gabe von gp130Fc, welches das *Trans-Signaling* blockiert oder aber auch Antikörper gegen den mIL-6R, der beide Wege blockiert, antagonisiert werden. Zusätzlich kann der suppressive Effekt von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf andere Zellen des Immunsystems durch IL-6 inhibiert werden. In der vorliegenden Dissertation konnte zum ersten Mal in einem murinen Asthmodell demonstriert werden, dass die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen den mIL-6R eine Induktion regulatorischer T-Zellen in der Lunge bewirkt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren und auch funktionell aktiv sind (Abb. 28, Kapitel 3.1.4.5. und Abb. 30, Kapitel 3.1.4.7). Der spezifische Mechanismus aber, durch den diese Zellen reguliert werden und funktionieren sind bisher unvollständig geklärt.

4.2.1 Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung des über den sIL-6R vermittelten *Trans-Signalings* durch Untersuchungen humaner BALF

Yokojama et al. [1995 und 1997] haben neben einer erhöhten IL-6 Sekretion im Serum asthmatischer Patienten auch eine steigende Konzentration des sIL-6R im Vergleich zu gesunden Patienten festgestellt. Nach einer spontanen Asthmaattacke oder auch nach Allergenprovokation konnte ein weiterer Anstieg im Serum dieser Patienten beobachtet werden. In einer humanen Studie konnte gezeigt werden, dass bei asthmatischen Patienten im Gegensatz zu Nicht-Asthmatikern in der BALF auch ein Anstieg der sIL-6R zu beobachten war [Doganci et al., 2005]. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen der BAL-Konzentration des sIL-6R einerseits und IL-5 ($r=0,90$) und IL-13 ($0,90$) andererseits gezeigt werden (Abb. 45).

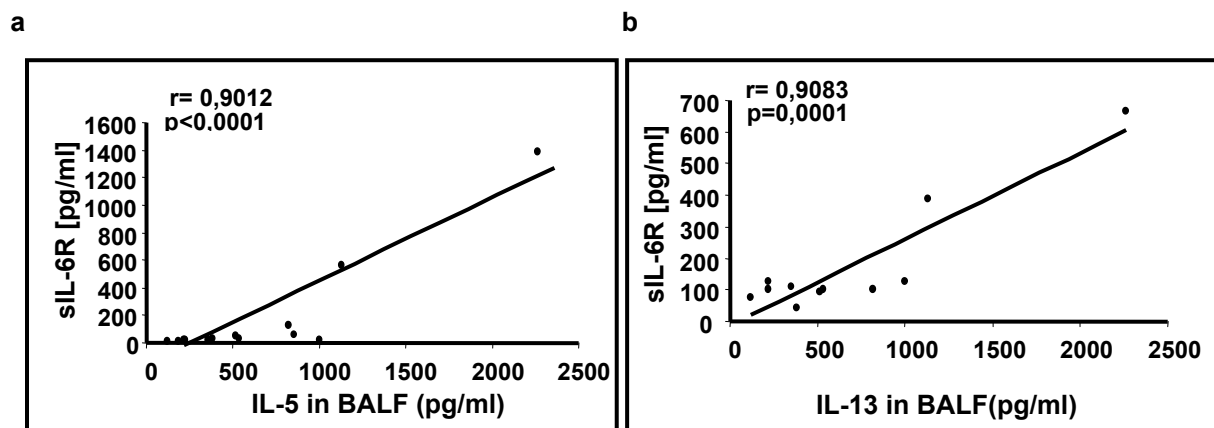


Abb. 45: Konzentration des sIL-6R korreliert positiv mit den Cytokinen IL-5 und IL-13 in der humanen BALF

Dargestellt ist in (a) die Korrelation zwischen dem sIL-6R und IL-5, sowie in (b) dem sIL-6R und IL-13 in der humanen BALF. Bei asthmatischen Patienten konnte eine positive Korrelation zwischen dem sIL-6R und den proinflammatorischen Cytokinen (a) IL-5 ($r=0,90$; $p<0,0001$) und (b) IL-13 ($r=0,91$; $p<0,0001$) nach einer Allergenexposition in der bronchoalveolären Lavage gezeigt werden.

IL-5 und IL-13 sind spezifische T_H2 Cytokine, die in der Pathophysiologie von Asthma involviert sind. Scott Greenfelder und Kollegen [2001] berichten, dass IL-5 positiv auf die eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen wirkt. Sie demonstrieren, dass blockierende Antikörper gegen IL-5 sowohl die eosinophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen als auch die AHR in verschiedenen Spezies reduzieren. Diese Assoziation zwischen IL-5 und eosinophilen Granulozyten werden auch von Studien von Lee et al. [1997], Foster et al. [1996 und 2000] und Karras et al. [2000] bestätigt. Darüber hinaus sind auch dissoziative Funktionen über IL-5 und der AHR beschrieben. In humanen Studien wurde asthmatischen Patienten ein humanisierter

anti-IL-5 monoklonaler Antikörper (Mepomizulab) verabreicht, welcher die eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen reduzierte, die AHR aber unbeeinflusst ließ [Leckie et al., 2000]. Hogan et al [1998] zeigten, dass bei IL-5(-/-) Mäusen die Hyperreagibilität unabhängig von IL-5 entsteht.

Das proinflammatorische Cytokin IL-13, das an die α -Kette des IL-4R bindet und somit seinen Signalweg mit IL-4 teilt, zeigt ähnliche Effekte wie die des IL-4, wie z.B. die Regulation der IgE Produktion [de Waal Malefyt et al., 1993]. Im Unterschied zu IL-4 reguliert IL-13 nicht direkt die T-Zelldifferenzierung zu T_H2 Zellen und auch T-Lymphozyten antworten nicht direkt auf IL-13. Wills-Karp et al [1998] berichten, dass IL-13, unabhängig von anderen T_H2 Cytokinen, ein notwendiges und hinreichendes Kriterium für die Entwicklung von Asthma ist. IL-13 induziert die pathophysiologischen Eigenschaften von Asthma, unabhängig von IgE und eosinophile Granulozyten. Daneben postulieren Naseer und Kollegen [1997], dass IL-13 über die IL-12 vermittelte Inhibition der T_H1 Zellen zur Asthma spezifischen T_H2 Differenzierung führt. Das erklärt auch die Erhöhung von IL-13 in der Atemwegsmukosa von Asthmatikern und die Korrelation zur Eosinophilie in der BALF nach segmentaler Allergenprovokation [Kroegel et al., 1996]. Die erhobenen Daten zeigen deutlich eine potentielle Funktion des sIL-6R in der Pathogenese von Asthma. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der Dissertation die funktionelle Bedeutung des *Trans-Signalings* über den sIL-6R in einem murinen Asthmodell analysiert. Hierfür wurde in einem *in vivo Setting* gp130Fc, ein selektiv den löslichen IL-6 Rezeptor blockierender Antikörper verwendet.

4.2.2 Die Blockade des sIL-6R reguliert T_H2 Cytokine in der BALF und GATA-3 in der Lunge

In Übereinstimmung mit den humanen BAL-Daten konnte in einem murinen Asthmodell gezeigt werden, dass die Blockade des sIL-6R durch gp130Fc in einer Herunterregulierung der T_H2 Cytokine IL-4, IL-5 und auch IL-13 resultiert [Abb.15 Kapitel 3.1.1.1]. Der T_H2 -Transkriptionsfaktor GATA-3 ist durch die Blockade des *Trans-Signalings* in der Lunge, gemessen am Gesamtprotein, ebenfalls herunterreguliert [Doganci et al.2005]. GATA-3 nimmt bei der Regulation der T_H2 -Cytokine IL-4, IL-5 und auch IL-13 eine zentrale Stellung ein [Ting et al., 1996; Zheng und Flavell, 1997; Ray und Cohn, 1999; Ouyang et al., 2000; Zhou und Ouyang, 2003]. Bei $CD4^+$ T-Zellen bleibt die GATA-3 Expression aber unbeeinflusst (Abb. 17; Kapitel 3.1.1.3). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass GATA-3 nur in den

Gesamtproteinen der Lunge eine Rolle spielt, während es in der isolierten CD4⁺ T-Zellpopulation unverändert bleibt. Daraus kann abgeleitet werden, dass der sIL-6R auf die T_H2 Differenzierung selbst keinen Einfluss hat, sondern erst nach Ausdifferenzierung in T_H2-Zellen von Bedeutung ist.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der T_H1 spezifische Transkriptionsfaktor T-bet, sowohl nach α IL-6R- als auch nach gp130Fc-Behandlung exprimiert wird (Abb. 17, Kapitel 3.1.1.3). Die T-bet (*T-box expressed in T cells*) Expression korreliert mit der IFN γ Expression in T_H1 und NK-Zellen [Szabo et al., 2000]. Analog zu diesen Ergebnissen berichten Dodge et al [2003] über eine DC Population in der Lunge, die vermehrt IL-6 produziert und dadurch die Produktion von T_H1 polarisierenden Cytokinen inhibiert. In einem IL-6(-/-) Mausmodell zeigen die Autoren, dass eine Differenzierung von naiven CD4 Zellen in Richtung T_H1 induziert wird. Außerdem demonstrieren sie, dass neutralisierende Antikörper gegen IL-6 zur T_H1-Zelldifferenzierung führt.

4.2.3 Geringer Einfluss der α IL-6R-Antikörper auf T_H2-Cytokine in der BALF

Im Gegensatz zur lokalen Applikation des gp130Fc, der die Fähigkeit besitzt die T_H2-Cytokine IL-4, IL-5 und auch IL-13 zu blockieren, resultierte die lokale Applikation der α IL-6R-Antikörper in einer selektiven *Down*-Regulation von IL-4 und bei höheren Dosen auch IL-5 (100 μ g/Tag). Jedoch konnte durch diese Behandlung kein Einfluss auf die Produktion von IL-13 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Diese Ergebnisse könnten einerseits durch die Arbeit von La Flamme und Pearce [1999] erklärt werden. Die Autoren berichten, dass IL-6 *in vitro* die Produktion von IL-4 in der frühen T-Zellentwicklung zu einem T_H2 Phänotyp fördert. Zudem demonstrieren Rincon et al. [1997], dass die *in vitro* Zugabe von IL-6 zu naiven T-Zellen die Produktion von geringen Mengen IL-4 fördert, welches auf eine autokrine Weise die T_H2 Differenzierung initiiert. Als Quelle der frühen IL-4-Sekretion nennen Sabin et al. [1996] eosinophile Granulozyten, in Abhängigkeit von IL-5. Diehl und Rincon sowie Diehl et al. [2002] beschreiben neben NK-Zellen auch APCs, die IL-6 sezernieren und die Transkription von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktivieren. NFAT führt dann zur Produktion von IL-4 in naiven T-Zellen, die dadurch in T_H2 Effektorzellen differenzieren. Die Induktion der T_H2 Differenzierung über IL-6 ist dabei abhängig von endogenem IL-4. Dass IL-4 bei Asthma die allergische Inflammation reguliert, indem es die T_H2 Differenzierung und IgE-Synthese fördert, erörtern auch Steinke und Borish [2001].

Betrachtet man die i.n. Gabe von 50µl Antikörper/Tag, welches keinen Einfluss auf die IL-5 Produktion hat, wären die Ergebnisse analog zu Hogan et al [1998] Die Autoren demonstrieren, das bei IL-5(-/-) Mäusen die Hyperreagibilität unabhängig von IL-5 entsteht. Andererseits wurden diese Cytokine in der bronchoalvelären Lavage gemessen, und sind somit kein direkter Hinweis darauf, das diese Cytokine von CD4⁺T-Zellen produziert wurden. Hogan et al [1997] und Cohn et al. [1998] konnten außerdem zeigen, das die in der BAL vorkommende Eosinophilie nicht unbedingt die Situation in der Lunge widerspiegelt. In der Lunge konnte zudem demonstriert werden, dass die Zahl der CD4⁺ T-Zellen unter α IL-6R-Antikörper Behandlung vermindert war (

Abb. 20; Kapitel 3.1.2.2), was in Einklang mit der verbesserten AHR [Doganci et al., 2005] und auch verminderten Eosinophilie (Abb. 19; Kapitel 3.1.2.1) steht.

4.2.4 Die lokale Behandlung mit anti-IL-6R-Antikörper zeigt einen Rückgang inflammatorischer CD4⁺ T-Zellen in der Lunge

Allergien und Asthma sind in den letzten Jahren in der westlichen Welt stark angestiegen [von Mutius, 1994; Ring, 1997]. Eine zentrale Rolle in diesen entzündlichen, atopischen Reaktionen nehmen neben den Cytokinen die CD4⁺ T-Zellen ein [Kon und Kay, 1999; Romagnani, 2000b].

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Lunge demonstriert werden, dass die Zahl der CD4⁺ T-Zellen unter α IL-6R-Antikörper-Behandlung vermindert war (Abb. 20), was in Einklang mit der verbesserten AHR [Doganci et al., 2005] und auch verminderten Eosinophilie (Abb.19) steht. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch die Arbeit von La Flamme und Pearce [1999], die zeigen, dass IL-6 -/- Tiere *in vivo* eine erniedrigte Anzahl CD4⁺ T-Zellen aufweisen. Andererseits diskutieren Perkins et al. [2006], dass IL-4 eine IL-13 unabhängige allergische Atemwegsentszündung und IL-13 unabhängige AHR induziert, was in Einklang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten steht.

4.2.5 Die Blockade des *Signalings* bzw. *Trans-Signalings* reguliert die AHR unabhängig von der IL-5 Produktion

Die asthmatische Reaktion ist gekennzeichnet durch eine Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen wie eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten ins Bronchialgewebe [Bousquet et al., 2000]. Dabei fördern die von den T_H2-Zellen sezernierten Cytokine wie IL-4 und IL-5 oder aber auch die von Mastzellen oder Monozyten sezernierten Cytokine und Entzündungsmediatoren die

Ausreifung, Differenzierung und Migration von eosinophilen Granulozyten in das Gewebe [Oddera et. al., 1998; Busse und Lemanske, 2001].

Wie bereits gezeigt werden konnte, verbessert die Blockade des α IL-6R, welches sowohl *Signaling* als auch *Trans-Signaling* inhibiert, die AHR wesentlich (* $p=0,049$), da die lokale Antikörper-vermittelte Antagonisierung des IL-6 *Signalings* mit einer Reduktion der AHR verbunden war [Doganci et al., 2005]. Die lokale Applikation des gp130Fc führt dagegen zu keiner signifikanten Reduktion der AHR.

Darüber hinaus konnte auch eine Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der BALF nachgewiesen werden (Abb. 19; Kapitel 3.1.2.1). Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Foster et al. [1996] und Shardonofsky et al. [1999], die eine enge Assoziation zwischen eosinophilen Granulozyten und der AHR demonstrieren konnten. Dass wiederum die Anzahl eosinophiler Granulozyten nicht mit der IL-5 Produktion korrelieren muss, demonstrieren Hogan et al. [1998]. Die Autoren zeigen an einem IL-5(-/-) Tiermodell, dass die Hyperreagibilität unabhängig von IL-5 entsteht. Andererseits sagen hohe IL-5 Konzentrationen die Entstehung der AHR nicht voraus, so dass IL-5 und Eosinophile weder ein notwendiges noch ein hinreichendes Kriterium für die Entwicklung der AHR darstellen [Lilly et al., 1996]. Diese Daten stimmen mit den hier erhobenen Daten insofern überein, dass sich bei einer i.n. Applikation von 50 μ g α IL-6R-Antikörper trotz verminderter AHR eine unveränderte IL-5 Produktion in der BALF ergab. Erst bei höheren Dosen der α IL-6R-Antikörper (100 μ g/Tag) konnte eine signifikante Herunterregulierung von IL-5 in der BALF beobachtet werden (Abb. 46 und Abb. 18b; Kapitel 3.1.2). Diese Ergebnisse stehen in Kongruenz mit den Arbeiten von Tang et al. [1998]. Die Autoren berichten hier, dass die Co-Kultivierung von CD4⁺ T-Zellen mit Makrophagen bei asthmatischen Patienten in einer verstärkten IL-5 Produktion resultierte, die durch die Applikation eines α -IL-6R Antikörpers antagonisiert werden konnte. Auch Heijink et al. [2002] konnten eine IL-6 abhängige Produktion der Cytokine IL-4 und IL-5 durch T-Zellen zeigen.

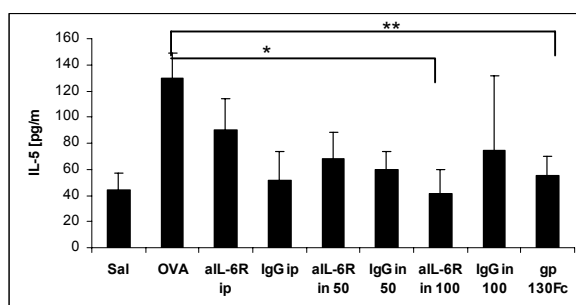


Abb. 46: Die i.n. Applikation von 100 μ g α IL-6R/Tag resultierte in einer *Down-Regulation* von IL-5 in der BALF bei OVA sensibilisierten und OVA provozierten Tieren (n=8-14)

Dargestellt ist die IL-5 Konzentration in der am Tag 28 gewonnenen BALF. Unter OVA-Behandlung ist eine typische Induktion von IL-5 zu beobachten. Im Vergleich zur OVA-Gruppe resultiert die Gabe von 100µg α IL-6R/Tag in einer selektiven Herunterregulierung von IL-5 (* $p=0,026$) (siehe auch Abb. 18b; Kapitel 3.1.2) bei unveränderter Produktion von IL-5 bei 50µg Antikörper/Tag. Die Blockade des *Trans-Signalings* mit gp130Fc führt auch zu einer verminderten Produktion von IL-5 (** $p=0,0057$), wobei die i.p. Applikation des mIL-6R keinen signifikanten Effekt auf den Rückgang der Cytokinproduktion zeigt.

Auch hier konnte gezeigt werden, dass die i.p. Applikation des α IL-6R keinen Einfluss auf die Reduktion von IL-5 hat.

4.2.6 Die i.n. Applikation der α IL-6R-Antikörper führt im Gegensatz zur systemischen Gabe zu einer Induktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in der Lunge

Nach i.n. Behandlung OVA-sensibilisierter Versuchstiere mit α IL-6R-Antikörper konnte im Gegensatz zur intraperitonealen Darreichungsform der Antikörper eine Induktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in der Lunge beobachtet werden (Abb. 47a). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die systemische Gabe von α IL-6R-Antikörpern eine eher inflammatorische Wirkung erzielte, da die Konzentration von IL-6 im Vergleich zur OVA-behandelten, Antikörper-unbehandelten Kontrollgruppe in der BALF signifikant erhöht ist (Abb. 47b), was darauf hinweist, dass durch die systemische Cytokinblockade ein positiver *Feedback*-Mechanismus ausgelöst wird.

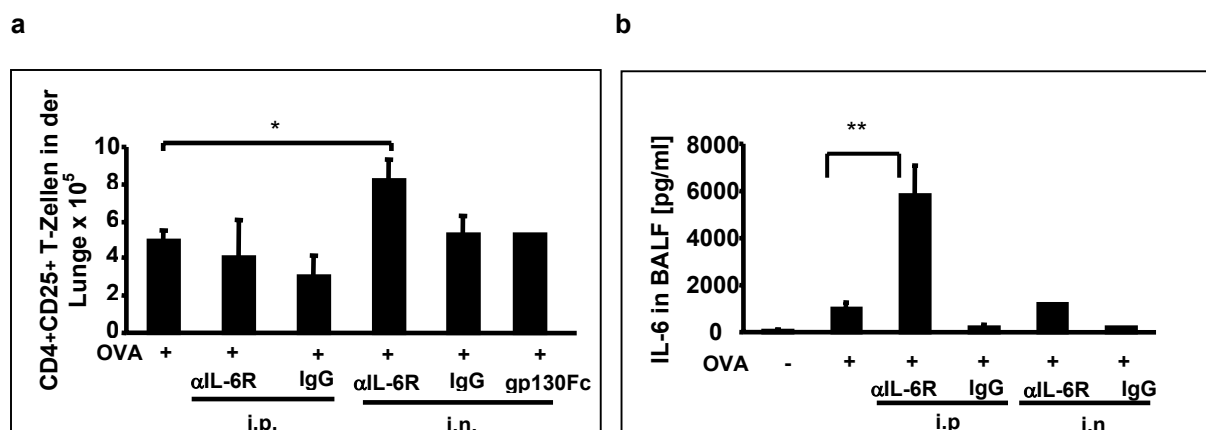


Abb. 47: Die i.p. Applikation des IL-6R hat keinen Einfluss auf die Induktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen, aber beeinflusst die Produktion von IL-6 in der BALF positiv

Dargestellt ist in (a) CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus der Lunge, die mit FACS sortiert wurden und eine Reinheit von >98% zeigen. Die i.n. Behandlung mit α IL-6R-

Antikörper während der Sensibilisierungsphase mit OVA zeigt im Gegensatz zur i.p. Behandlung eine Induktion der Anzahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Lunge (*p=0,034; n= 4-5). Abbildung (b) stellt die Ergebnisse eines *Sandwich*-ELISA zur Bestimmung von IL-6 in der BALF dar. Unter systemischer Gabe der α IL-6R-Antikörper konnte ein deutlicher Anstieg von IL-6 in der BAL im Vergleich zu der OVA-Kontrollgruppe nachgewiesen werden (**p=0,039; n=4).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichten Henderson et al. [1997] von einer geringeren Effektivität der i.p. Applikation der von ihnen verwendeten Antikörper im Vergleich zur i.n. Gabe des Antikörpers. Die Autoren nehmen an, dass die Ursache hierfür auf eine unzureichende Translokation und Akkumulation des Antikörpers in der Lunge als primärem Ort des entzündlichen Geschehens zurückzuführen werden könnte (Henderson et al., 1997 und 2000). Aufgrund der erzielten Daten scheint die i.p. Behandlung als α IL-6R Therapie nicht erfolgsversprechend zu sein. Für die vorliegende Arbeit wurde daher der Schwerpunkt auf die lokale Applikation der α IL-6R-Antikörper gelegt.

4.2.7 Die lokale Anti-IL-6R-Antikörper Behandlung induziert IFN γ und IL-10 in BALF und CD4⁺ T-Zellen der Lunge

In Abschnitt 4.2.2. wurde bereits die T-bet Expression in CD4⁺ T-Zellen diskutiert. Szabo et al. [2000] demonstrieren, dass die T-bet Expression mit der IFN γ Expression in T_H1 und NK-Zellen korreliert. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass nach Blockade des α IL-6R sowohl in der BALF als auch in CD4⁺ T-Zellen der Lunge signifikant erhöhte Mengen an IFN γ produziert wird (Abb. 21a; Kapitel 3.1.3 und Abb. 22; Kapitel 3.1.3.1). Die erhobenen Daten unterstützen die proinflammatorische Funktion von IL-6 [DiCosmo et al. 1995], sezerniert von einer DC Population in der Lunge, die vermehrt IL-6 produziert und über neutralisierende Antikörper gegen IL-6 zur T_H1-Zelldifferenzierung führt [Dodge et al., 2003]. Auch Kawano et al. [1994] berichten über eine antagonistische Wirkung von IFN γ und IL-6 in der Induktion von humanem IgG₁. McLoughlin et al. [2003] demonstrieren zudem, dass IFN γ die IL-6-Signaltransduktion über seinen löslichen Rezeptor moduliert. Im Gegensatz dazu führte in der vorliegenden Studie die Blockade des sIL-6R über gp130Fc zu keiner Induktion von IFN γ , weder in der BALF (Abb. 21a; Kapitel 3.1.3) noch in CD4⁺ T-Zellen der Lunge (Abb. 23b; Kapitel 3.1.3.2). Ausschließlich die Blockade des mIL-6R, welcher sowohl *Signaling* als auch

Trans-Signaling inhibiert, führte zu einer signifikant erhöhten Produktion von $\text{IFN}\gamma$, verglichen zu OVA sensibilisierten und OVA provozierten Mäusen (Abb. 21a, Kapitel 3.1.3).

Beim allergischen Asthma kommt es zur Differenzierung von CD4 Lymphozyten zum $\text{T}_\text{H}2$ Phänotyp, wobei neben IL-4, IL-5 und IL-13 auch IL-10 sezerniert wird, welches einen wesentlichen Einfluss auf die IgE Synthese in B-Lymphozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen hat und somit die allergische Reaktion verlängert [Robinson et al., 1992; Virchow et al., 1995]. Als ein $\text{T}_\text{H}2$ Cytokin inhibiert IL-10 die $\text{T}_\text{H}1$ Funktion, unterdrückt Entzündungsmediatoren und fördert $\text{T}_\text{H}2$ Reaktionen [Mosmann und Moore, 1991]. Daneben inhibiert IL-10 die Funktion von Monocyten, T-Zellen und NK-Zellen [De Waal Malefyt et al., 1991; Wang et al., 1994; Berkman et al., 1995; Borish et al., 1996]. Auf transkriptioneller Ebene hemmt IL-10 die Produktion der Cytokine IL-5, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF [Armstrong et al., 1996, Borish et al., 1996]. Interessanterweise zeigt eine weitere Studie, dass rekombinantes murines IL-10 u.a. die Produktion von IL-6 in Mastzellen inhibiert [Marshall et al., 1996]. Analog dazu konnte durch die Blockade des IL-6R eine signifikante Erhöhung von IL-10 sowohl in der BALF (Abb. 21b; Kapitel 3.1.3) als auch in CD4⁺ T-Zellen demonstriert werden (Abb. 22; Kapitel 3.1.3.1). Dagegen zeigte die i.n. Blockade des sIL-6R durch gp130Fc in CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die IL-10 Produktion (Abb. 23a, Kapitel 3.1.3.2).

4.2.8 CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen aus $\alpha\text{IL-6R}$ -Antikörper behandelten Mäusen sezernieren vermehrt IL-10 und $\text{TGF}\beta$, verglichen zu OVA-sensibilisierten und -provozierten Tieren

In zahlreichen Studien wurde belegt, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen das anti-inflammatorische Cytokin IL-10 sezernieren und dieses auch für ihre suppressive Funktion benötigen [Maloy und Powrie, 2001; Belkaid et al., 2002; Pasare und Medzhitov, 2003]. Neben IL-10 spielt auch der transformierende Wachstumsfaktor ($\text{TGF-}\beta$) bei der regulatorischen Effektorfunktion der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle [Asseman et al., 1999; Roncarolo et al., 2001; Levings et al., 2002], ebenso wie der Transkriptionsfaktor Foxp3 [Hori et al., 2003]. Zudem konnten Joetham et al. [2007] demonstrieren, dass natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus der Lunge IL-10 und $\text{TGF}\beta$ abhängig sind. Die intratracheale Gabe von naiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen vor der Allergenprovokation führte, ähnlich wie die Applikation von rekombinantem IL-10 oder $\text{TGF}\beta$ zu einer Verminderung der AHR

und der Entzündung in der Lunge, weniger T_H2 Cytokin Produktion, sowie mehr IL-10 und TGFβ Produktion. In einem IL-10(-/-) Mausmodell konnten die Autoren zeigen, dass aus der Lunge isolierte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen weder einen Effekt auf die AHR oder die Atemwegsentzündung ausüben, aber vor dem Transfer mit rekombinanten IL-10 inkubiert, die AHR und auch Entzündungen in den Atemwegen supprimieren können. Dieser Effekt ist assoziiert mit TGFβ in der BALF. Analog dazu reduzierte anti-TGFβ die Treg Aktivität. Auch Annaker et al. [2001] berichten über eine IL-10 abhängige Regulierung peripherer CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs. Suri-Payer und Cantor [2001] bestätigen in ihrer Arbeit, dass der supprimierende Effekt teilweise IL-10 abhängig ist. Dass TGFβ₁ eine wichtige Rolle in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen einnimmt und zusätzlich ein kostimulatorischer Faktor zur Foxp3 Expression ist, zeigen Fantini et al. [2006]. Sie postulieren, dass die Inkubation CD4⁺CD25⁻ peripherer T-Zellen mit TGFβ zu einer Differenzierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen mit immunsuppressiven Fähigkeiten führt. Darüber hinaus ist IL-10 für die Expansion TGFβ-produzierender regulatorischer T-Zellen wichtig, d.h. eine verminderte IL-10-Produktion hat eine verminderte Ausbreitung von regulatorischen T-Zellen und somit eine verminderte TGFβ-Produktion zur Folge [Fuss et al., 2002].

Insgesamt unterstützen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten die der Literatur. Daneben konnte gezeigt werden, dass aus der Lunge isolierte CD4⁺CD25⁺ Tregs αIL-6R oder gp130Fc behandelte Tiere im Gegensatz zu der aus der Milz isolierten Population zusätzlich zu IL-10 und TGFβ das Cytokin IFNγ sezernieren (Abb.24; Kapitel 3.1.4.1). Für eine Erörterung dieser Aussage bedarf es jedoch weiterer Experimente. Ein Ansatz zur Klärung könnte in der Untersuchung zweier verschiedener Treg Population liegen.

4.2.9 Foxp3 Expression in CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen aus der Lunge

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*Forkhead box of protein 3*) ist derzeit der einzige anerkannte molekularbiologische Marker für regulatorische T-Zellen und wird spezifisch im Thymus und der Peripherie exprimiert [Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003; Maloy und Powrie, 2003; O'Garra und Vieira, 2003].

Das vorliegende Asthmodell ist durch eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 in der CD4⁺CD25⁺ T-Zellpopulation bei anti-IL-6R behandelten Mäusen charakterisiert (Abb. 25; Kapitel 3.1.4.2). Außerdem zeigen

diese Ergebnisse eine spezifische Aktivierung von Foxp3 exprimierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus der Lunge, die IL-10 und auch TGF β sezernieren, vor allem nach Blockade des mIL-6R (Abb. 24a+b Kapitel 3.1.4.1). Im auffälligen Kontrast hierzu zeigt die Blockade des sIL-6R über gp130Fc keinerlei Effekt auf eine Induktion dieser Tregs. Diese Daten bestätigen nochmals, dass das *Trans-Signaling* über den sIL-6R die T_H2 Cytokinproduktion steuert, wobei über den mIL-6R, das Gleichgewicht zwischen Effektor T-Zellen und regulatorischen T-Zellen kontrolliert wird. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte im Rahmen dieser Arbeit die suppressive Fähigkeit CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen auf OVA-behandelte Milz-CD4⁺ Zellen *in vitro* gezeigt werden (Abb. 27; Kapitel 3.1.4.4).

4.2.10 Selektive mIL-6R-Expression auf der Oberfläche CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der Lunge, die in der Lage sind immunsuppressive Aktivitäten auszuüben

In zahlreichen Studien wurde bereits dargestellt, dass IL-6 in der Lage ist sowohl über *Signaling* als auch *Trans-Signaling* eine Zelle zu stimulieren [Rose-John et al., 1994, 1998; Jostock et al., 2001; Kallen, 2002; Jones, 2005]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Blockade des mIL-6R zu einer Induktion CD4⁺CD25⁺ Tregs führt [Doganci et al., 2005]. Der Nachweis für die Induktion regulatorischer T-Zellen liegt einerseits in der Expression des mIL-6R auf der Oberfläche dieser Zellen (Abb. 28, Kapitel 3.1.4.5), wobei IL-6 einen direkten Effekt auf die Suppression dieser Zellen ausübt [Pasare und Medzhitov, 2003; Liang et al., 2006; Wan et al., 2007]. Andererseits führt die Anwesenheit von IL-6 zur Phosphorylierung von STAT-3, welches die weitere Signaltransduktion in der Zelle aktiviert. Die Blockade des IL-6R führt, trotz Anwesenheit von IL-6, zu einer verminderten Phosphorylierung von STAT-3 (Abb. 29, Kapitel 3.1.4.6). Somit bestätigen diese Daten die funktionelle Aktivität des IL-6R auf der Oberfläche CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen.

Auch die regulatorische bzw. die Fähigkeit zur Suppression anderer Immunzellen wurde übereinstimmend zu den Arbeiten von Maloy und Powrie [2000], Belkaid et al. [2002] sowie Pasare und Medzhitov [2003] veranschaulicht (Abb. 30, Kapitel 3.1.4.7). Der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Tregs zusammen mit CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen aus der Milz α IL-6R-Antikörper behandelte Mäuse (Abb. 30 C+F Kapitel 3.1.4.7) zeigt eine verringerte Infiltration eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen von Rag1(-/-) Mäusen, denen sowohl T- als auch B-Zellen fehlen. Dagegen zeigte der Transfer von nur CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen ohne Treg Population (Abb. 30 A+D Kapitel 3.1.4.7) aus OVA/IgG behandelten Tieren eine

Verschlimmerung der Entzündung in der Lunge. Zudem konnte eine reduzierte CFSE-markierte Effektorzellpopulation nach Behandlung mit α IL-6R-Antikörper in der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 31, Kapitel 3.1.4.8). Diese Ergebnisse deuten auf eine Inhibition der Proliferation von Effektorzellen durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen hin.

Trotz der Erwartungen scheint IgG einen reduzierenden Effekt auf inflammatorische Zellen in den Atemwegen zu haben, wenn auch nicht so stark wie unter α IL-6R-Behandlung (Abb. 30 B+E verglichen zu A+D). Ein Zusammenhang dieser Befunde könnte mit den erst kürzlich in der Literatur beschriebenen antiinflammatorischen Effekten von IgG bestehen [Nimmerjahn und Ravetch, 2007]. Die Autoren behaupten einerseits, dass hohe Dosen IgG Autoimmunerkrankungen supprimieren und andererseits dass IgG's Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bindestellen ausbilden können, zum einen der Antigenbindestelle und zum anderen über die Fc Domäne. Damit sind IgG's in der Lage Wechselwirkungen zwischen proinflammatorischen Liganden und Rezeptor zu blockieren oder proinflammatorische Antworten zu neutralisieren. Dimitrov und Kollegen [2007] berichten zudem über die N-Acetylneuraminsäure haltigen Glykanstrukturen, über die IgG's eine reduzierte Affinität zu den Fc γ R entwickeln und somit reduzierte cytotoxische Funktionen ausüben.

Insgesamt unterstützen die im vorliegenden Asthmodell erhobenen Daten die von Maloy und Powrie [2001], Belkaid et al. [2002] und Pasare und Medzhitov [2003] postulierte immunologische Kontrollfunktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse IL-2R

4.3.1 Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette verringert die AHR und die Inflammation in den Atemwegen

Die *in vivo* in einem etablierten murinen Tiermodell zur Atemwegsentzündung erhobenen experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit belegen einen signifikant potenzierenden Einfluss von α IL-2R β auf pathogene Komponenten des allergischen Asthma bronchiale wie die AHR (Abb. 32), die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge (Abb. 33d), und die Verminderung der T_H2 Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb. 34). Im Gegensatz dazu scheint die Blockade der IL-2R α -Kette eher ein Verstärker der allergischen Atemwegsentzündung zu sein, indem bei gleichbleibendem Einfluss auf die AHR, die Rekrutierung von Eosinophilen in die Lunge erheblich induziert wird, obwohl die lokale Produktion der proinflammatorischen T_H2-Cytokine IL-4 und IL-5 nach Allergenprovokation reduziert werden (Abb. 34a und b). Die Entstehung der AHR beruht auf verschiedenen Faktoren wie *Remodeling*, eosinophilen Granulozyten, CD4⁺ T-Zellen und proinflammatorischen Cytokinen wie IL-5 und IL-13. Das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren jedoch, die bei der Entstehung der AHR eine Rolle spielen, wird bisher kontrovers diskutiert [Mishima et al., 1998, Bousquet et al., 2000, Solway, 2000]. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Blockade der IL-2R β -Kette mit einer Verbesserung der AHR assoziiert ist, wobei die Blockade der IL-2R α -Kette die AHR nicht wesentlich verbessert (Abb. 32). Kontrovers dazu berichten Mark und Kollegen [1998], dass die Blockade der IL-2R α -Kette wesentlich zur Verbesserung der AHR führt. Außerdem konnte demonstriert werden, dass nach OVA-Behandlung eosinophile Granulozyten die Atemwege vermehrt infiltrieren. Die Blockade der IL-2R α -Kette konnte diese Infiltration aber nicht wesentlich verhindern (Abb. 33c), wohl aber die Blockade der IL-2R β -Kette (Abb. 33d). Ein plausibler Zusammenhang dieser Befunde könnte durch Einbeziehung einer Funktion der IL-2R α -Kette (CD25) gelingen, die in letzter Zeit zunehmend in das Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt ist. Aktivierte T-Zellen und vor allem regulatorische T-Zellen exprimieren CD25 auf ihrer Oberfläche. Durch die lokale Blockade der IL-2R α -Kette werden möglicherweise adaptive regulatorische T-Zellen in der Lunge depletiert. Analog dazu berichten Almeida et al. [2002], dass IL-2R α (-/-) und IL-2(-/-) Tieren CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen fehlen, die für die CD4⁺ T-Zell-Homeostase von

Bedeutung sind. Sie demonstrieren, dass die Rekonstitution von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen diese Tiere vor Autoimmunerkrankungen und anschließendem Tod bewahrt. Zudem bleibt ihnen die funktionelle Treg Population erhalten. Unerwarteterweise berichten Fontenot et al. [2005], dass IL-2(-/-) und auch IL-2R α (-/-) Tregs in der Lage sind, die T-Zellproliferation *in vitro* zu inhibieren.

4.3.2 Die Blockade der IL-2 β -Kette führt zur Inhibition der T_H2 Cytokine in der BALF

In der BALF konnte gezeigt werden, dass nach Blockade der IL-2R β -Kette die typischen T_H2 Cytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 reduziert werden (Abb. 35 a-d, Kapitel 3.2.4). Zudem war auch die Gesamtzellzahl in der BALF nach intranasaler Blockade der IL-2R β -Kette vermindert (Abb. 36). Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur insofern überein, dass die IL-2R β -Kette für die weitere Signaltransduktion in der Zelle von großer Bedeutung ist. Tanaka et al. [1991] berichten, dass ein monoklonaler Antikörper gegen die IL-2R β -Kette (TM- β_1) die Bildung eines hochaffinen IL-2R-Komplexes verhindert, indem es die Bindung des Liganden an die IL-2R β -Kette verhindert. So ist für die Differenzierung peripherer T-Zellen in den T_H2 Phänotyp die weitere Signaltransduktion von essentieller Bedeutung. Zudem konnte nach IgG-Behandlung die Erniedrigung einiger Cytokine in der BALF beobachtet werden (Abb. 35, Kapitel 3.2.4). Diese Daten könnten, wie zuvor diskutiert, auf einen antiinflammatorischen Effekt von IgG zurückzuführen sein [Nimmerjahn und Ravetch, 2007].

Daneben konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass auch das proinflammatorische Cytokin IL-6 in der BALF nach Blockade der IL-2R β -Kette signifikant reduziert ist (Abb. 35e, Kapitel 3.2.4). In Kongruenz mit diesen Befunden postulieren La Flamme und Pearce [1999], dass der proliferative Defekt bei IL-6(-/-) Mäusen mit einer verminderten IL-2 Expression zusammenhängt. Durch die Zugabe von exogenem IL-6 konnten sie erhöhte IL-2R-Expression und Proliferation bei IL-6(-/-) Mäusen demonstrieren. Diese Studien zeigen, dass die T_H2 Differenzierung unabhängig von IL-6 ist und wie wichtig IL-6 für die Lymphoproliferation durch die Induktion des IL-2R zu sein scheint.

4.3.3 Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette führt zur Induktion von IFN γ in der BALF OVA-sensibilisierter und -provozierter Mäuse

Zudem konnte in dieser Arbeit ein markanter Anstieg von IFN γ nach lokaler Blockade der IL-2R β -Kette in der BALF demonstriert werden (Abb.35f, Kapitel 3.2.4). IFN γ ist ein Cytokin von zentraler Bedeutung für die Immunantwort. Dennoch besteht Unklarheit über die Zellpopulationen, die wesentlich an der Produktion von IFN γ beteiligt sind. Auch die Regulationsmechanismen der frühen IFN γ Produktion sind bisher nur unvollständig geklärt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Wie in Abschnitt 4.2.7. bereits beschrieben, könnte die Induktion von IFN γ in der BALF darauf zurückgeführt werden, dass IFN γ die IL-6-Signaltransduktion modulieren kann. [McLoughlin et al., 2003]. Neben T-Zellen bilden auch aktivierte NK-Zellen eine Quelle für IFN γ [Rajagopalan, et al., 2001]. Granucci et al. [2004] und Foti et al. [2004] schließen aus *in vitro* Beobachtungen, dass endogenes IL-2, produziert von DCs essentiell für die Aktivierung von NK-Zellen ist. Durch welchen Mechanismus inhibitorische Signale die Aktivierung von NK-Zellen verhindern, ist bisher nicht genau bekannt. Neben T-Zellen hat die IL-2R β -Kette auch einen Einfluss auf NK-Zellen, da dieser Rezeptor auch auf NK-Zellen exprimiert ist [Grabstein et al., 1994]. Auch Suzuki et al. [1997] beschreiben einen Effekt des IL2R β -Signalings auf die NK-Zell-Entwicklung.

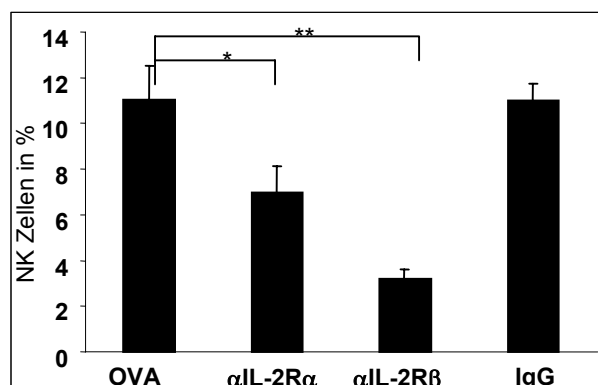


Abb. 48: Nach Blockade der IL-2R α als auch der β -Kette werden NK-Zellen in der Lunge depletiert

Dargestellt ist eine FACS-Analyse aus Gesamtzellen der Lunge, wobei die Blockade mit IL-2R-Antikörpern während der Provokationsphase zur Depletion von NK-Zellen in der Lunge führt (α IL-2R α : *p=0,046; α IL-2R β :**p=0,0032).

Die i.n. Blockade der IL-2R α - und auch der β -Kette führt zu einer Depletion NK-positiver T-Zellen in der Lunge. Etwa 10% der NK Zellen exprimieren neben CD122 (IL-2R β -Kette) auch CD25 (IL-2R α -Kette) [Shirakawa et al., 1986], wodurch die Herunterregulierung der NK-Zellen nach Blockade beider IL-2R-Ketten erklärt werden kann. Die Depletion der NK-Zellen in der Lunge schließt aber die Herkunft des IFN γ von NK-Zellen aus. Kontrovers dazu berichten Kundig et al. [1993], dass die Entwicklung der NK-Zellen bei IL-2 defizienten Mäusen normal verläuft. Dies zeigt,

dass IL-2 für die NK-Zell-Entwicklung *in vivo* keine Rolle spielt, was wiederum den hier erhaltenen Daten widerspricht. IFN γ wird zudem von Makrophagen [Gessani, und Belardelli, 1989] und APCs produziert [Frucht et al., 2001]. Diese Zellpopulationen müssten daher zur weiteren Untersuchung nach der Herkunft des IFN γ herangezogen werden.

4.3.4 Signaltransduktion

Aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien ist bekannt, dass unter anderem IL-2 die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges induziert, wobei im Hinblick auf die weitere Signaltransduktion insbesondere die Beteiligung von STAT5 relevant ist. Hierbei ist die Phosphorylierung der Tyr694 essentiell für die Aktivierung von STAT5 [Gouilleux et al., 1994; Wakao et al., 1994]. Stat5 α und β werden unabhängig voneinander reguliert und sind in verschiedenen Zelltypen aktiviert. Zum Beispiel sind beide Isoformen aktiviert als Antwort auf IFN α in B-Zellen, aber nur Stat5 α wird phosphoryliert in Erwiderung auf IFN α in HeLa-Zellen [Meinke, et al. 1996]. Infolgedessen wurde der Aktivierungszustand dieses Signalweges im pulmonalen Gesamtprotein analysiert. Tatsächlich zeigte sich nach OVA-Sensibilisierung eine verstärkte Aktivierung des STAT5-Signalweges und es konnte belegt werden, dass die Blockade der IL-2R β -Kette auch in dem vorliegenden Asthmodell in einer verminderten Phosphorylierung von STAT5 α und STAT5 β an Tyr694 und somit in einer Inhibition des STAT5 vermittelten *Signalings* resultiert (Abb. 37, Kapitel 3.2.6).

4.3.5 Die lokale Blockade der IL-2 Rezeptor β -Kette führt zu einer reduzierten Expression von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Lunge, aber zu einer Induktion dieser Zellen in den Lymphknoten

Nachdem in einem experimentellen Asthmodell gezeigt werden konnte, dass die Blockade der IL-2R β -Kette zur Verbesserung der AHR und zur Inhibition der T_H2-Cytokine führt (Kapitel 3.2.), stellte sich vor diesem Hintergrund die Frage, ob regulatorische T-Zellen an der Antagonisierung des asthmatischen Phänotyps beteiligt sind. In Abbildung 38 (Kapitel 3.2.7) konnte aufgrund der Oberflächenfärbung für CD4 und CD25 zunächst einmal demonstriert werden, dass diese nach Blockade der IL-2R β -Kette nicht induziert sind. Abbildung 39 (Kapitel 3.2.8) dagegen zeigt, dass die Blockade desselben Rezeptors in den Lymphknoten zu einer Induktion CD4CD25 doppelt positiver T-Zellen führt. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Arbeiten von Burchill et al. [2007]. Die Autoren berichten in

ihrer Arbeit, dass regulatorische T-Zellen IL-2 abhängig sind und durch IL-2 Rezeptor Defekte, wie z.B. IL-2R α (-/-) oder IL-2R β (-/-) Mäuse eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen aufweisen. Außerdem behaupten sie, dass STAT-5 wichtig zur Treg Induktion ist, da eine STAT-5 Deletion zu einer Inhibition der Treg Entwicklung führt. Aufgrund der in Kapitel 4.3.4. diskutierten Ergebnisse, dass STAT-5 nach Blockade der IL-2R β -Kette inhibiert ist, müsste laut Literatur auch eine Unterdrückung der Treg Entwicklung vorhanden sein. In der Lunge scheinen diese Ergebnisse die der Literatur zu bestätigen (Abb. 38; Kapitel 2.3.7). Nach Blockade sowohl der IL-2R α als auch der β -Kette des IL-2R ist eine Reduktion CD4CD25 doppelt positiver T-Zellen zu erkennen, die jedoch nicht signifikant ist. Dagegen konnte aber demonstriert werden, dass die Blockade der IL-2R β -Kette zu einer Induktion dieser Zellpopulation in den Lymphknoten führt, welches ein Hinweis auf regulatorische T-Zellen sein könnte.

Da die IL-2R α -Kette (CD25) nach Aktivierung auch auf herkömmlichen T-Zellen exprimiert wird, wurde als nächstes eine intrazelluläre Färbung gegen Foxp3, der für regulatorische T-Zellen einzig anerkannte Marker, durchgeführt [Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003]. Hierbei konnte demonstriert werden, dass im Gegensatz zur Lunge das *homing* der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen die Lymphknoten zu sein scheinen (Abb. 40 Kapitel 3.2.9). Eine ähnliche Ambivalenz manifestiert sich ebenfalls bezüglich der Arbeit von Bluestone und Tang [2005], dass IL-2 defiziente Mäuse eine reduzierte Anzahl an Foxp3-exprimierenden Tregs in der Peripherie aber normale Anzahl im Thymus aufweisen.

Zudem konnte hier demonstriert werden, dass nach Blockade der IL-2R β -Kette CD4⁺ T-Zellen in ihrer Proliferation in den Lymphknoten, nicht aber in der Lunge inhibiert sind (Abb. 41, Kapitel 3.2.10). Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur insofern überein, dass CD4⁺ T-Zellen als Schlüsselfiguren bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, somit nach OVA Behandlung bzw. nach Blockade der IL-2R α -Kette vermehrt proliferieren [Kon und Kay, 1999]. Regulatorische T-Zellen sind bekannt dafür, dass sie selbst nicht proliferieren, sondern andere Zellen in ihrer Proliferation inhibieren (Abb. 41, Kapitel 3.2.10).

4.3.6 Die systemische Gabe von IL-2 bewirkt keine Induktion regulatorischer T-Zellen

Es wurde bereits beschrieben, dass regulatorische T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 überleben und bei Asthma herunterreguliert sind [Finotto und Glimcher, 2004,

Sakaguchi, 2005]. Die konstitutive Expression des hochaffinen IL-2R spiegelt die Rolle von IL-2 für die Homeostase und Aktivierung der Funktion von regulatorischen T-Zellen wieder [Scheffold et al., 2005]. Auch Fontenot [2005] beschreibt in der Peripherie eine essentielle Rolle von IL-2 für die Homeostase von Tregs. Diese produzieren IL-2 zwar nicht selbst, sind aber in ihrer Funktion und Anzahl von diesem abhängig [Murawski et al. 2006]. Vor diesem Hintergrund wurde daher untersucht, ob eine systemische IL-2 Gabe die Anzahl regulatorischer T-Zellen in Lunge und Lymphknoten induzieren kann. Es konnte weder in Lunge (Abb. 42a., Kapitel 3.2.11) noch Lymphknoten (Abb. 42b, Kapitel 3.2.11) eine Induktion CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden. Auch konnten gezeigt werden, dass die systemische IL-2 Gabe die AHR eher erhöht als verbessert.

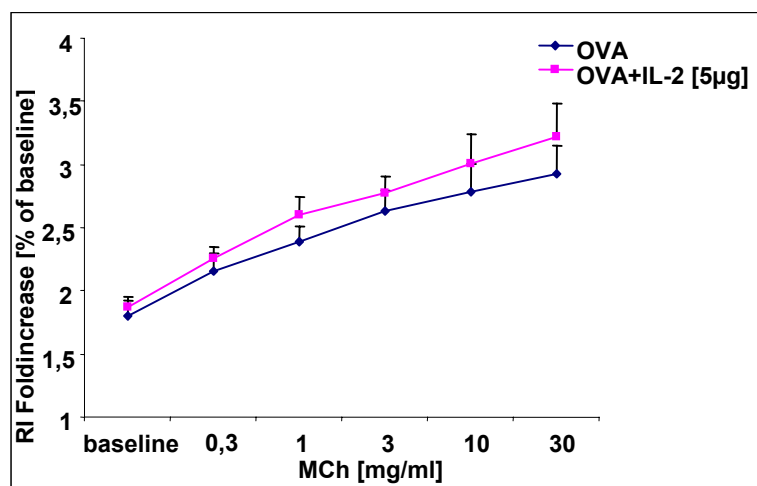
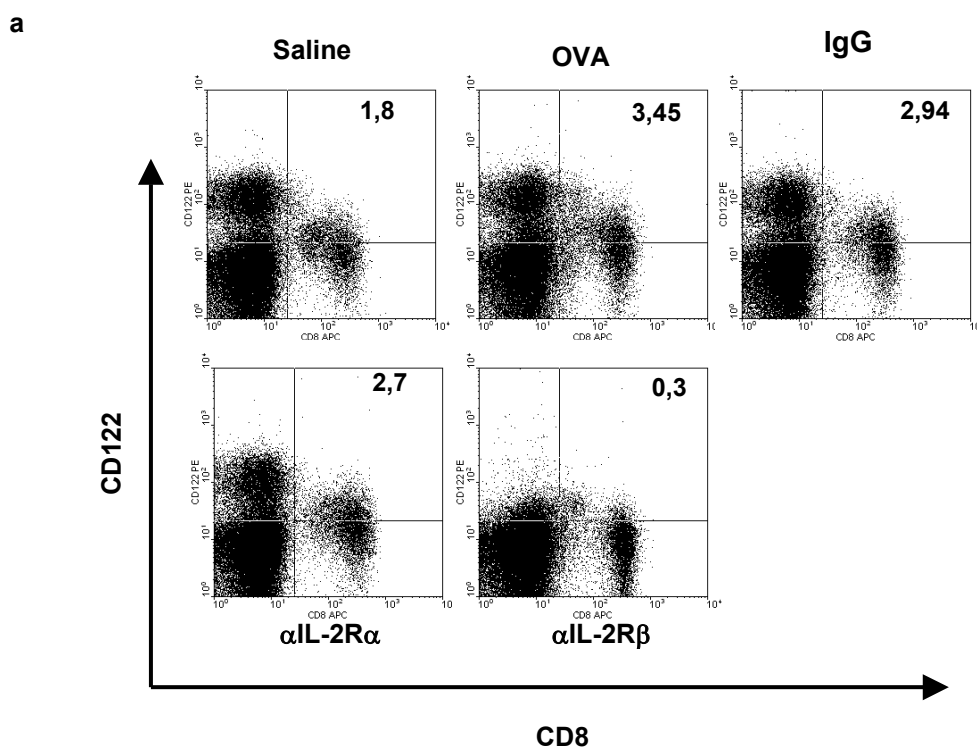


Abb. 49: Die i.p. Applikation von IL-2 während der Sensibilisierungsphase zeigt eine erhöhte AHR in der Lunge

Diese Ergebnisse decken sich mit der in Kapitel 4.2.5. und 4.2.6. nachgewiesenen und diskutierten Bedeutung der i.p. Applikationsweise, sowie den Beobachtungen von Henderson et al. [1997], dass die i.p. Applikationsweise zu einem geringeren Erfolg führt, verglichen zur intranasalen Applikationsweise. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach systemischer IL-2 Gabe sowohl in der Lunge als auch Lymphknoten STAT-5 phosphoryliert wird, das mit einer Aktivierung der Signaltransduktionskaskade einhergeht (Abb. 43, Kapitel 3.2.12). Folglich wird vermehrt IL-2 transkribiert, das andererseits positiv auf regulatorische Zellen wirken sollte, in diesem Modell aber nicht demonstriert werden konnte.

4.3.7 Die Blockade der IL-2R β -Kette reduziert CD8+CD122⁺ regulatorische T-Zellen in Lunge und Lymphknoten

Aufgrund der Tatsache, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch die Blockade der IL-2R β -Kette nicht induziert werden konnten (Abb. 38, Kapitel 3.2.7), diese Tiere aber trotzdem eine verbesserte AHR (Abb. 32, Kapitel 3.2.1), weniger Infiltration von Entzündungszellen in der Lunge (Abb. 33, Kapitel 3.2.2) und verminderte T_H2 Cytokine (Abb. 34; Kapitel 3.2.3) aufweisen, stellte sich die Frage, ob eventuell eine andere Population für die Verbesserung des experimentellen Asthma verantwortlich ist. Es konnte demonstriert werden, dass der asthmatische Phänotyp nicht nur auf einer T_H2-Zellentwicklung beruht, sondern auch auf ein Mitwirken CD8⁺CD122⁺ regulatorischer T-Zellen zurückzuführen ist [Karwot et al., *submitted*]. Analog dazu berichten Endharti et al. [2005] sowie Rifa'i et al. [2004], dass CD8⁺CD122⁺ Tregs die Expansion von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen kontrollieren und in der Lage sind die Proliferation von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen IL-10 abhängig zu supprimieren. Erstaunlicherweise konnte in IFN γ (-/-) Tieren eine erhöhte Expression dieser CD8⁺CD122⁺ Treg-Population nachgewiesen werden, wobei die AHR signifikant erhöht war [Karwot et al., *submitted*]. Aufgrund dieser Daten scheint die CD8⁺CD122⁺ Treg-Population in der Lunge eher einen asthmatischen Phänotyp zu begünstigen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit nach lokaler Blockade des IL-2 Rezeptors die Expression der CD8⁺CD122⁺ Treg-Population in der Lunge untersucht.



b

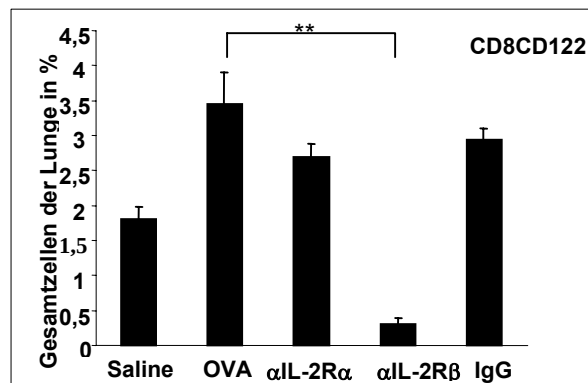
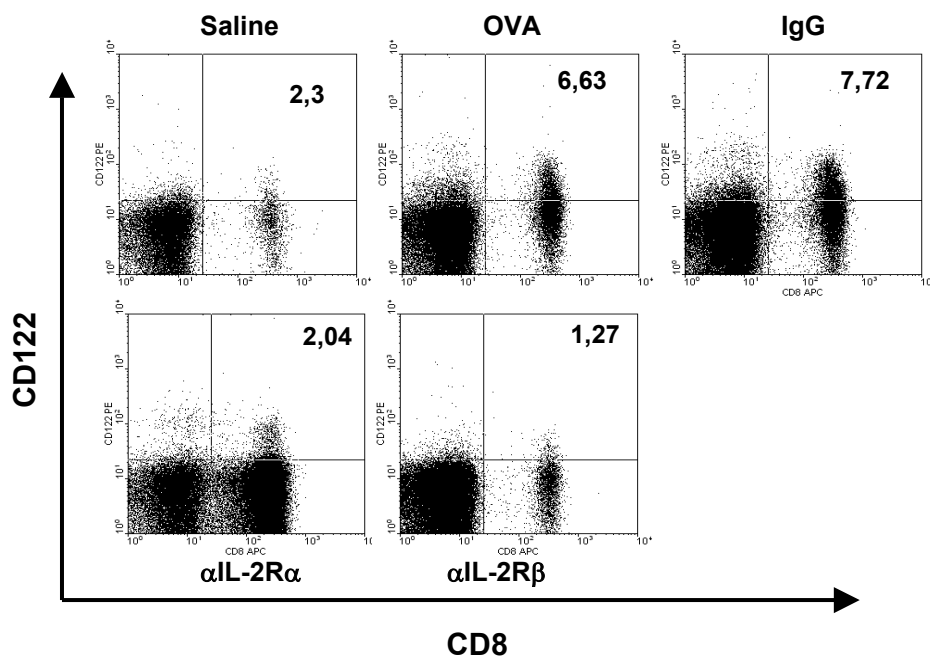


Abb. 50: Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette führt zur Depletion CD8CD122 doppelt positiver T-Zellen in der Lunge

Dargestellt ist die Oberflächenfärbung für CD8CD122 doppelt positiver T-Zellen in der Gesamtlunge. Die i.n. Blockade der IL-2R β -Kette führt zu einer signifikanten Reduktion dieser Zellpopulation (**p=0,0047).

In der Lunge konnte nach lokaler Blockade der IL-2R β -Kette eine signifikante Reduktion CD8+CD122+ regulatorischer T-Zellen demonstriert werden. Auch in den Lymphknoten konnte nach lokaler Blockade der IL-2R β -Kette eine Reduktion dieser Treg Population erzielt werden.

a



b

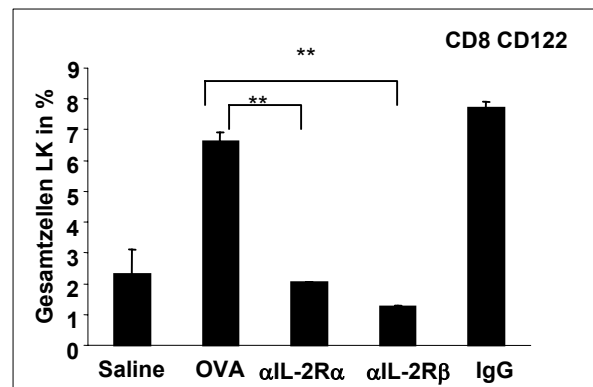


Abb. 51: Sowohl die Blockade der IL-2R α als auch der - β -Kette führen zu einer verminderten Expression CD8CD122 positiver T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten

Abbildung 51 zeigt die Depletion CD8+CD122+ Tregs in den Lymphknoten nach i.n. Blockade der IL-2R α (**p=0,0014) und IL-2R β -Kette (**p=0,0013). In den Lymphknoten konnte im Gegensatz zur Lunge auch eine Reduktion der CD8+CD122+ Treg Population nach IL-2R α Blockade erzielt werden. Die AHR dagegen ist nach IL-2R α -Blockade nicht signifikant reduziert, aber dafür sind T_H2 Cytokine wie IL-4 und IL-5 in der Lunge reduziert (Abb. 34 a+b, Kapitel 3.2.3). Es wurde bereits demonstriert, dass CD8+CD122+ T-Zellen die IFN γ Produktion der CD8+CD122- T-Zellen IL-10 abhängig inhibieren und auch, dass IFN γ die IL-10-Produktion inhibiert [Karwot et al., *submitted*]. Übereinstimmend dazu führt die lokale Blockade der IL-2R β -Kette zu einer vermehrten IFN γ -Produktion (Abb. 35f, Kapitel 3.2.4) und einer verminderten IL-10-Produktion (Abb. 35d, Kapitel 3.2.4) in der BALF OVA-behandelter Mäuse. Somit konnte hier gezeigt werden, dass die lokale Blockade der IL-2R β -Kette zu einer vermehrten IFN γ -Produktion, einer Herunterregulierung der T_H2 Cytokine und der Verbesserung der AHR führt, das mit der Depletion der CD8+CD122+ T-Zellpopulation in Lunge und Lymphknoten zusammenhängen könnte.

4.4 Gemeinsame Diskussion über IL-6 und IL-2 für Lungen Tregs

4.4.1 Die Cytokine IL-6 und IL-2 üben eine differenzierte Regulation auf CD4+CD25+ Tregs in der Lunge aus

Es ist bereits bekannt, dass das pleiotrope Cytokin IL6 proinflammatorische Effekte in der Pathogenese von Asthma zeigt, indem es naive CD4 T-Zellen in eine T_H2 Richtung polarisiert [Dodge et al. 2003]. In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Blockade des mIL-6R, welches die Signaltransduktion über IL-6 verhindert zu einer Induktion CD4+CD25+ Tregs in der Lunge führt. Diese Daten

werden unterstützt durch zahlreiche Studien, indem die Anwesenheit von IL-6 zu einer Suppression CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen führt [Romagnani, 2006; Yao et al., 2007; Wan et al., 2007].

Desweiteren konnte demonstriert werden, dass IL-6 in der BALF nach Blockade der IL-2R β -Kette signifikant herunterreguliert ist (Abb.35e, Kapitel 3.4.2). Auch konnte nach Blockade der IL-2R β -Kette eine Antagonisierung des asthmatischen Phänotyps in der Lunge erzielt werden. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen auch auf eine Induktion regulatorsicher T-Zellen zurückzuführen sei. Jedoch konnte diese Hypothese in der Lunge α IL-2R β -Antikörper behandelte Mäuse nicht bestätigt werden. Somit scheint die Blockade der IL-2R β -Kette in der Lunge keinen Einfluss auf CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen zu haben. Im Gegensatz dazu belegen zahlreiche Studien, dass IL-2R(-/-) Tiere einen lymphoproliferativen und lethalen Autoimmunsyndrom entwickeln [Furtado et al., 2002; Sharma et al., 2005]. Außerdem wird berichtet, dass IL-2 nicht nur wichtig für die Homeostase von Tregs, sondern auch essentiell für die Aktivierung ihrer Funktion ist [Scheffold et al., 2005]. Das in dieser Arbeit der gegenteilige Effekt durch die Blockade der IL-2R β -Kette gezeigt werden konnte, könnte einerseits daran liegen, dass hier kein *Knock-out* Tiermodell verwendet wurde, sondern lediglich eine lokale Inhibition in der Lunge appliziert wurde. Zum anderen könnte das Vorhandensein der Tregs in der Lunge nach Blockade der IL-2R β -Kette dadurch erklärt werden, dass periphere Tregs nicht nur IL-2 abhängig sind, sondern auch andere Cytokine für die Homeostase und Aktivierung ihrer Funktion von Bedeutung sind.

5. Ausblick

In dieser Dissertation konnte in einem murinen *in vivo* Asthmodell gezeigt werden, dass die Blockade des mIL-6R, welches in der Lage ist, beide Signalwege des IL-6 zu inhibieren, in die T_H2-Differenzierung und auch die Treg Funktion eingreift. Diese Erkenntnisse deuten somit darauf hin, dass die gezielte Antagonisierung von IL-6 bei Asthma ein mögliches therapeutisches Potential besitzt. Es bleibt zu klären, ob 1) die Blockade des *Trans-Signallings* mit gp130Fc, welches in der Lage ist, auch die T_H2-Entwicklung zu beeinflussen, eventuell bei höheren Konzentrationen zur Induktion regulatorischer T-Zellen führt und 2) ob ein *in vivo* Tiermodell, bei dem das gp130Fc transgen exprimiert wird, eventuell zu einer Induktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen führt. Weiterhin müssten in IL-6(-/-) Mäusen CD4⁺CD25⁺ regulatorische Zellen in der Lunge untersucht werden, ob diese in der Lage sind Tregs zu beeinflussen.

Die Ergebnisse der zweiten Studie liefern Hinweise für weitere Untersuchungen im Rahmen der CD8⁺CD122⁺ regulatorischen T-Zellen und vor allem für die Charakterisierung der CD8⁺ Effektor T-Zellen.

Sowohl bei der Blockade der IL-2R α als auch der β -Kette scheinen CD8⁺CD122⁺ T-Zellen inhibiert zu sein, aber nur die Blockade der IL-2R β -Kette hat einen reduzierenden Einfluß auf die AHR, bei gleichbleibender Anzahl CD4⁺CD25⁺ Tregs. Dieser Vorgang scheint außerdem IL-13 abhängig zu sein. Es bleibt zu klären, warum einerseits periphere Tregs nicht durch die Blockade der IL-2R β -Kette depletiert werden. Die Signaltransduktion verläuft nämlich über diese Kette in Verbindung mit der IL-2R γ -Kette. Außerdem ist noch zu klären, ob trotz Vorhandenseins CD4⁺CD25⁺ Tregs in der Lunge bzw. Lymphknoten diese auch funktionell aktiv sind. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht in der Lage sind, IL-2 unabhängig, über einen anderen Mechanismus zu wirken oder zu überleben.

6. Zusammenfassung

1. Teil

6.1 Die lokale Blockade der α IL-6R-Ketten

6.1.1 Schematische Darstellung der Blockade des *Signalings* bzw. *Trans-Signalings*

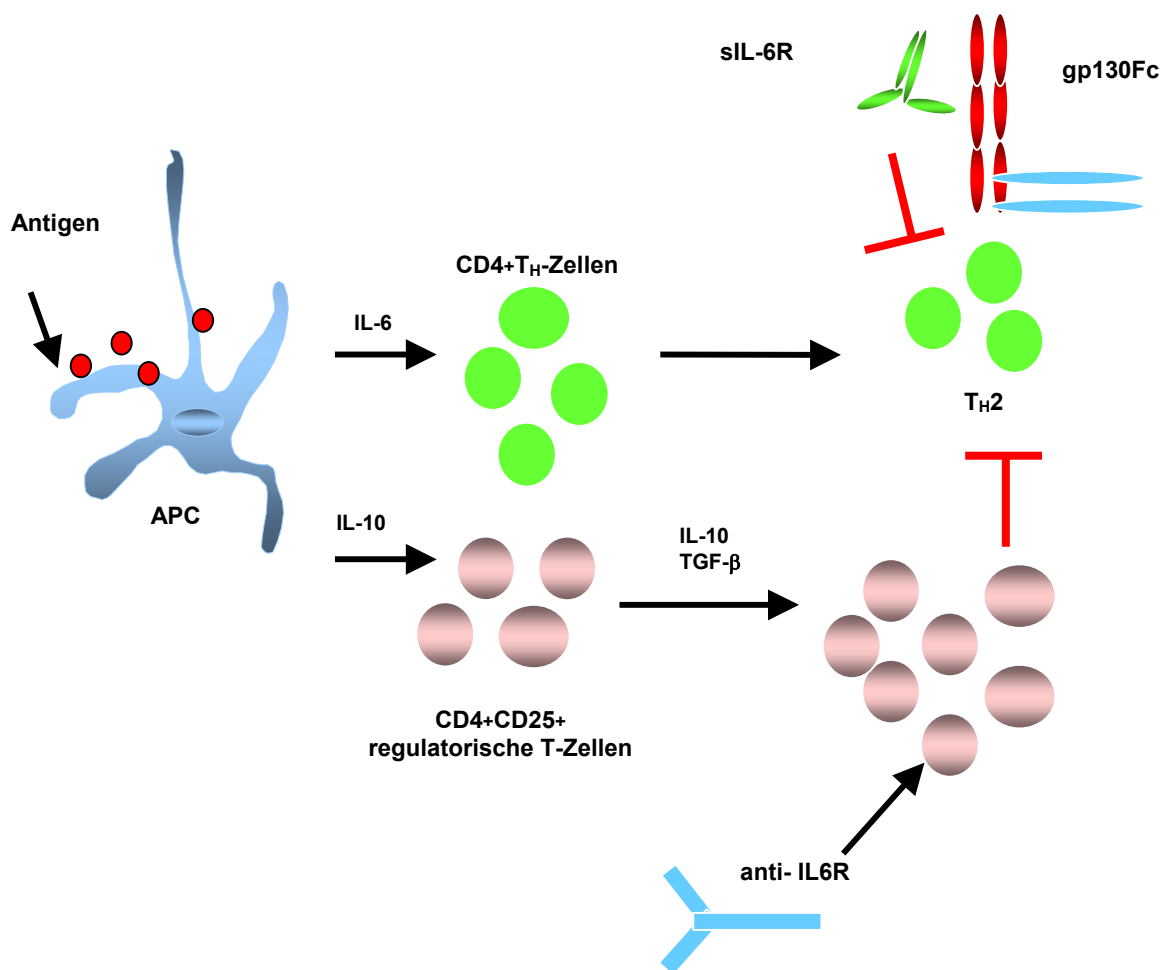


Abb. 52: Zusammenfassende Darstellung der durch lokale Applikation des α IL-6R ausgelösten Effekte

Die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) führt zur Sezernierung von IL-6, welches naive CD4⁺ T-Zellen zu einem T_H2 Phänotyp polarisiert. Die Produktion von IL-10 dagegen bewirkt, dass vermehrt IL-10 produzierende Tregs induziert werden. Die i.n. Applikation der mIL-6R-Antikörper inhibiert T_H2-Zellen und induziert zudem CD4⁺CD25⁺ Tregs. Die Blockade des sIL-6R mit gp130Fc dagegen inhibiert T_H2-Zellen.

Im ersten Teil der Dissertation wurde in einem experimentellen Astmamodell demonstriert, dass die Signaltransduktion über IL-6 das Gleichgewicht zwischen Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen durch verschiedene Rezeptorkomponenten kontrolliert. Hierbei zeigte sich, dass speziell das IL-6 *Trans-Signaling* über den sIL-6R die T_H2 Cytokinproduktion steuert. Dagegen supprimiert die IL-6 Signaltransduktion über seinen mIL-6R die Entwicklung und Funktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen und induziert die frühe Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen in der Lunge über IL-4. Analog dazu führt die Blockade des mIL-6R zur Expansion dieser regulatorischen T-Zellen mit suppressiven Fähigkeiten. Diese CD4⁺CD25⁺ Tregs induzieren außerdem IFN γ produzierende CD4⁺ T-Zellen in der Lunge und verbessern daneben die AHR. Nach Akbari et al. [2002] und Stock et al. [2004] ähneln diese Tregs einer schon früher beschriebenen Population in der Milz. Im Überblick konnte in der vorliegenden Dissertation demonstriert werden, dass IL-6 die *Balance* zwischen der Funktion von Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen in der Lunge über unterschiedliche Wege kontrolliert, dem sIL-6R und dem mIL-6R. Die Blockade des IL-6 Signalwegs wirkt sich positiv auf experimentelle Asthmastudien aus, wobei die Blockade des sIL-6R zur Unterdrückung der T_H2 Zellentwicklung und die Blockade des mIL-6R zu einer Expansion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in der Lunge führt. Diese Ergebnisse deuten auf ein mögliches therapeutisches Potential dieses Cytokins bei Asthma hin, erfordern aber teilweise noch weitere Untersuchungen.

2. Teil

6.2 Die lokale Behandlung der IL-2R α bzw. IL-2R β -Kette

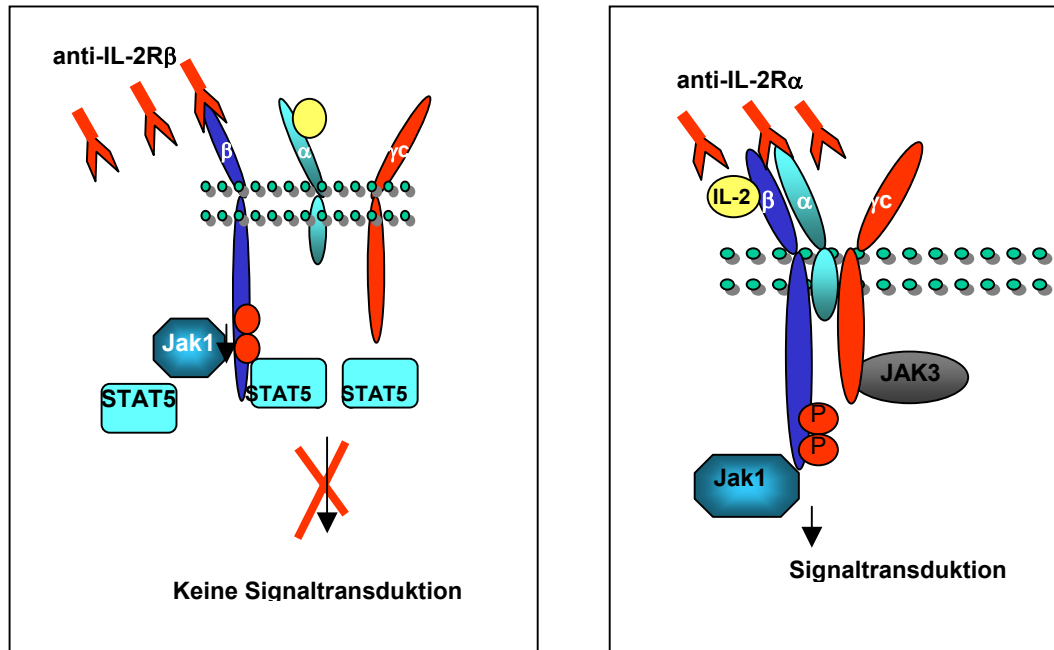


Abb. 53: Schematische Darstellung über die lokale Blockade der IL-2R β -Kette (links) und die IL-2R α -Kette (rechts)

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die lokale Blockade der IL-2R α und IL-2R β -Kette untersucht. Als ein spezifischer Aktivierungs- und Wachstumsfaktor von T-Zellen [Morgan et al., 1976] nimmt IL-2 eine zentrale Stellung im Immunsystem ein. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass monoklonale Antikörper gegen die IL-2R α -Kette (CD25) die Proliferation inhibiert und selektive Immunsuppression fördert [Leonard et al., 1982]. Hier konnte demonstriert werden, dass die Blockade der IL-2R α -Kette die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor und somit die T-Zell-Proliferation inhibiert. Zudem konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass die Blockade der IL-2R β -Kette zur Verbesserung der AHR, der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen und verminderter T_H2-Cytokinproduktion führt (Abb. 54). In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht, wobei eine Induktion dieser Population ausschließlich in den Lymphknoten nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass CD8⁺CD122⁺ regulatorische T-Zellen durch die Blockade der IL-2R β -Kette depletiert werden. CD8⁺CD122⁺ Tregs sind bekannt für die IL-10 abhängige Suppression von IFN γ in CD8⁺ T-Zellen [Endharti, et al., 2005]

sowie Rifa'i et al. [2004]. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der IL-2R β -Kette zu einem Anstieg der IFN γ -Mengen und einer Reduktion der IL-10-Produktion in der BALF führt.

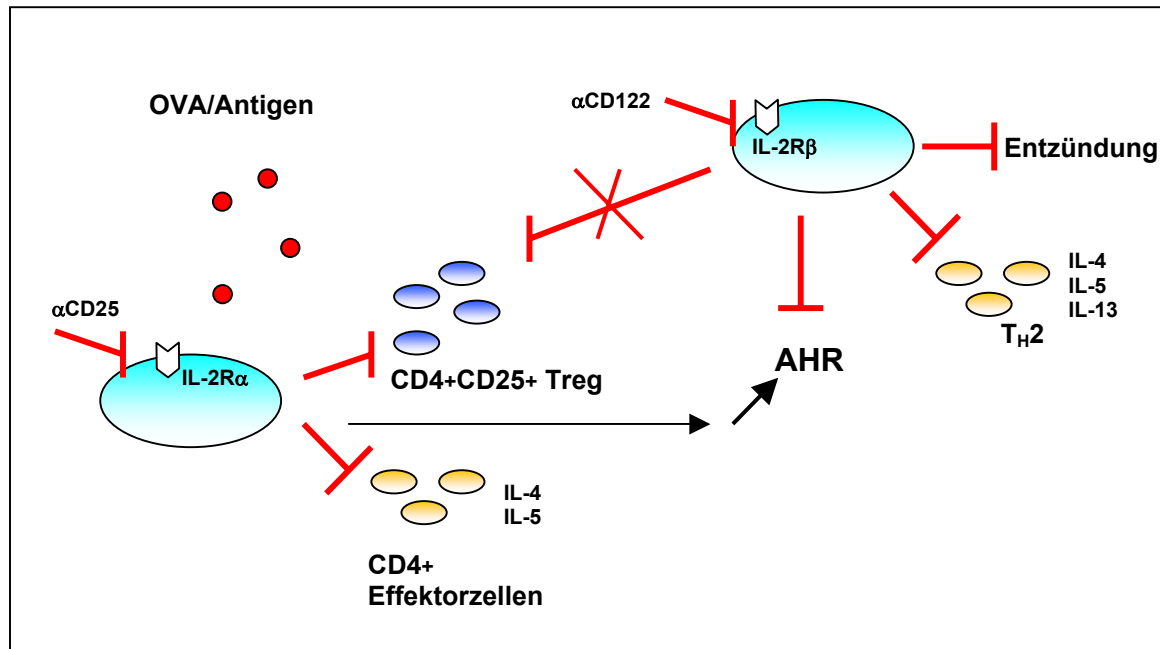


Abb. 54: Die lokale Blockade der IL-2R β -Kette führt in einem *in vivo* Asthmamodell zur Verbesserung der AHR, Verminderung entzündlicher Zellen in den Atemwegen und der T_H2 Cytokine

Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 1997. Cellular and molecular immunology, 3. Auflage. Harcourt Brace & Company , Philadelphia.

Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, C., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R., Semenzato, G., 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J Immunol.* 157(2):910-918.

Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., and Kishimoto, T. 1994. "Molecular cloning of APRF, a novel IFNstimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway." *Cell* 77(1): 63-71.

Almeida, A.R.M., Legrand, N., Papernik, M., and Freitas, A.A. 2002. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that control CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol.* 169(9): 4850-4860.

Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., and Bandeira, A. 2001. CD25⁺ CD4⁺ T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10. *J of Immunology.* 166: 3008-3018.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. 2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med.* 196: 379-387.

Armstrong, L., Jordan, N., and Millar, A. 1996. Interleukin-10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor α (TNF α) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax.* 51: 143-149.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., Powrie, F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 190: 995-1004.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (ed.). 1995. Current protocols in molecular biology, John Wiley and sons, Inc., New York, N.Y.

Bacharier L.B., and Geha, R.S. 2000. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: S547-S558.

Barnes, P.J. 2000. New directions in allergic diseases: mechanism-based anti- inflammatory therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 5-16.

Barnes, P.J. 2001. Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res.* **2**: 64–65.

Bayer, A.S., Yu, A., Adeegbe, D., Malek, T.R. 2005. Essential role for interleukin-2 for CD4+CD25+ T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med.* **201**(5): 769-777.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. 2002. CD4+CD25+Tregs control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**: 502–507.

Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P.J., Barnes, P.J., and Chung, K.F. 1995. Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1 α Expression by IL-10. *J Immunol.* **155**: 4412-4418.

Bluestone, J.A. and Tang, Q. 2005. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology.* **17**:638–642

Blyth, D.I., Pedrick, M.S., Savage, T.J., Bright, H., Beesley, J.E., and Sanjar, S. 1998. Induction, duration, and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma: effect of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **19**(1): 38-54.

Bonni, A., Sun, Y., Nadal Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., and Greenberg, M. E. 1997. “Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway.” *Science* **278**(5337): 477-83.

Borish, L.C., Nelson, H.S., Lanz, M.J., Claussen, L., Whitmore, J.B., Agosti, J.M., Garrison, L. 1999. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **160**: 1816-1823.

Borish, L., Aarons, A., Rumbyrt, J., Cvietusa, P., Negri, J., and Wenzel, S. 1996. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **97**: 1288-1296.

Boulton, T.G., Stahl, N., and Yancopoulos, G.D. 1994. “Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors.” *J Biol Chem.* **269**(15): 11648-55.

Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., and Vignola, A.M. 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**(5): 1720-1745.

Bradding, P., Roberts, J.A., Britten, K.M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C.H., Howarth, P.H., Holgate, S.T. 1994. Interleukin-4, -5, and -6 and tumour necrosis factor -alpha in

normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cells as a source of these cytokines. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **10**: 471-480.

Burchill, M.A., Ynag, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., Farrar, M.A. 2007. IL-2 Receptor α Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* **178**: 280-290.

Busse, W.W., Lemanske, R. F. 2001. Asthma. *New England Journal of Medicine* **344**(5): 350-362

Cohn, L., Tepper, J.S., Bottomly, K. 1998. Cutting edge: IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *The Journal of Immunology*. **161**: 3813-3816.

Corry, D.B., and Kheradmand F. 1999. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* **402**:B18-B22.

Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R.M. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol.* **118**: 108 – 125.

De Sanctis, G.T, Merchant, M., Beier, D.R., Dredge, R.D., Grobholz, J.K., Martin, T.R., Lander, E.S., and Drazen, J.M. 1995. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nature Genetics* **11**: 150-154.

De Sanctis, G.T., Itoh, A., Green, F.H.Y., Shixin, Q., Kimura, T., Grobholz, J.K., Matrin, T.R., Maki, T., Drazen, J.M. 1997. T-lymphocytes regulate genetically determined airway hyperresponsiveness in mice. *Nature Medicine* **3** (4): 460-462.

De Sanctis, G.T., Mehta, S., Kobzik ,L., Yandava, C., Jiao, A., Huang, P.L., Drazen, J.M. 1997. Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *American Journal of Physiology* **273**: L883-888.

De Vries J.E., Carballido J.M., and Aversa G. 1999. Receptors and cytokines involved in allergic Th2 cell responses. *J. Allergy Clin Immunol.* **103**: S492-S496.

De Waal Malefyt, R., Fidgor, C.G., and de Vries, J.E. 1993. Effects of interleukin 4 on monocyte functions: comparison to interleukin 13. *Res Immunol.* **144**(8): 629-633.

De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figor, C.G., de Vries, J.E. 1991. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* **174**: 1209-1220.

Diamond, R., and De Maggio, S. 1992. Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting. A laboratory handbook. Springer Lab. Berlin.

DiCosmo, B., Geba, G.P., Picarella, D., Elias, J.A., Rankin, J.A., Stripp, B.R., Whitsett, J.A., Flavell, R.A. 1995. Expression of interleukin-6 by airway epithelial cells: effects of airway inflammation and hyperreactivity in transgenic mice. *Chest*. **107**: 131S.

Diehl, S., and Rincon, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*. 39(9): 531-536.

Diehl, S., How, C-H., Weiss, L., Palmetshofer, A., Twardzki, T., Rounds, L., Serfling, E., Davis, R.J., Anguita, J., and Rincon, M. 2002. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *Journal of Experimental Medicine*. **196**: 39-49.

Dodge, I.L., Woldemar-Carr, M., Cernadas, M., Brenner, M.B. 2003. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *The Journal of Immunology* **170**: 4457-4464.

Doganci, A., Eigenbrod, T., Krug, N., De Sanctis, G.T., Hausding, M., Erpenbeck, V.J., El-Bdaoui, H., Lehr, H.A., Schmitt, E., Bopp, T., Kallen, K.J., Herz, U., Schmitt, S., Luft, C., Hecht, O., Hohlfeld, J.M., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Rose-John, S., Renz, H., Neurath, M.F., Galle, P.R., and Finotto, S. 2005. The IL-6 receptor alpha chain controls lung CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell development and function during allergic airway inflammation *in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation* **115**: 313-325.

Drazen, J.M., Arm, J.P., Austen, K.F. 1996. Sorting out the cytokines of asthma, *J Exp Med*. **183**: 1-5.

El Soaud, A.A. 2002. Role of receptors in the therapeutic field of rheumatic disorders. rheuma.netfirms.com/articles/amany.html

Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacey, E., and Crabtree, G.R. 1989. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* **1246**: 1617-1620.

Endharti, A.T., Rifa'i, M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K., Suzuki, H. 2005. Cutting Edge: CD8⁺CD122⁺ Regulatory T Cells Produce IL-10 to Suppress IFN γ -Production and Proliferation of CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. **175**: 7093-7097.

Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., and Powrie, F. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *J Exp Med*. **201**: 737-746.

- Fantini, M.C., Becker, C., Tubbe, I., Nikolaev, A., Lehr, H.A., Galle, P., and Neurath, M.F. 2006.** Transforming growth factor β induced FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis Gut. **55**:671-680.
- Finotto, S., Galle, P.R., Neurath, M.F. 2000.** Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale. Pneumologie **54**: 412-418.
- Finotto, S., and Glimcher, L.T. 2004.** T cell directives for transcriptional regulation in asthma. Springer Semin Immunopathol. **25**(3-4): 281-93.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A. 1991.** IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. **147**: 3815-3822.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003.** Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Nat Immunol. **4**: 330-336.
- Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. 2004.** Molecular aspects of regulatory T cell development. Semin Immunol. **16**: 73-80.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2005.** A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. Nat Immunol. **6**: 1142-1151.
- Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthei, K.I., and Young, I.G. 1996.** Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. Journal of Experimental Medicine. **183**: 195-201.
- Foster, P.S., Ming, Y., Matthei, K.I., Young, I.G., Temelkovski, J., and Kumar, R.K. 2000.** Dissociation of inflammatory and epithelial responses in a murine model of chronic asthma. Laboratory Investigation. **80**: 655-662.
- Foti, M., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., 2004.** A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. Trends Immunol. **25** (12): 650-654.
- Francis, J.N., Till, S.J., Durham, S.R. 2003.** Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol. **111**: 1255-1261.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. 2001.** IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol. **22**(10): 556-560.
- Furtado, G.C., Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. 2002.** Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4 Regulatory T Cell Function. J Exp Med. **196**(6): 851-857.

Fuss, I.J., Boirivant, M., Lacy, B., Strober, W. 2002. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol.* **168**:900-908.

Garman, R.D., Jacobs, K.A., Clark, S.C., and Raulet, D.H. 1987. "B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells." *Proc Natl Acad Sci. USA* **84**(21): 7629-33.

Garni-Wagner, B.A., Witte, P.L., Tutt, M.M., Kuziel, W.A., Tucker, P.W., Bennett, M., and Kumar, V. 1990. Natural killer cells in the thymus. Studies in mice with severe combined immune deficiency. *J Immunol.* **144**: 796 - 803.

Gershon, R.K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**: 723-737.

Gershon, R.K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**: 903-914.

Gessani, S., and Belardelli, F. 1989. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**(2): 117-23.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., Groner, B. 1994. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* **13**(18): 4361-9.

Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., and Ahdieh, M. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**(5161): 965-968.

Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol.* **2**(9):882 – 888.

Greenfeder, S., Umland, S.P., Cuss, F.M., Chapman, R.W., Egan, R.W. 2001. Th2 cytokines and asthma — The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* **2**: 71–79.

Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Ying, S., Abrams, J.S., Kay, A.B., Moqbel, R. 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6 *in vitro*. *Blood* **80**: 1496-1501

Heijink, I.H., Vallenga, E., Borger, P., Postma, D.S., de Monchy, J.G., Kauffmann, H.F. 2002. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells *Immunology* **107**: 316-324.

Henderson, W.R., Chi, E.Y., Albert, R.K., Chu, S.J., Lamm, W.J.E., Rochon, Yvan., Jonas, M., Christie, P.E., Harlan, J.M. 1997. Blockade of CD49d ($\alpha 4$ Integrin) on intrapulmonary but not circulating leukocytes inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *Journal of Clinical Investigation* **100**: 3083-3092.

Henderson, W.R., Chi, E.Y., Maliszewski, C.R. 2000. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *The Journal of Immunology* **164**: 1086-1095.

Herz, U., Braun, A., Ruckert, R. & Renz, H. 1998. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* **28**(5): 625-634.

Hibi, M., and Hirano, T. 1998. Signal transduction through cytokine receptors. *Int. Rev. Immunol.* **17**: 75-102.

Hibi, M., Nakajima, K., and Hirano, T. 1996. "IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system." *J Mol Med.* **74**: 1-12.

Hogan, S.P., Koskinen, A., Matthei, K.I., Young, I., Foster, P.S. 1998. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity and lung damage in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157**: 210-218.

Hogan, S.P., Matthei, K.I., Young, J.M., Koskinen, A., Young, I.G., Foster, P.S. 1998. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in Balb/c mice independently of IL-4 and IL-5. *The Journal of Immunology* **161**: 1501-1509.

Hogan, S.P., Mould, A., Kikutani, H., Ramsay, A.J., Foster, P.S. 1997. Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airway hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins. *Journal of Clinical Investigation* **99**: 1329-1339.

Holt, P.G., Macaubas, C., Stumbles, P.A. & Sly, P.D. 1999. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**(6760 Suppl): B12-17.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057-1061.

Horn, F., Henze, C., Heidreich, K. 2000. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology* **202**: 151-167.

Howard, M., Muchamuel, T., Andrade, S., and Menon, S. 1993. Interleukin-10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med.* **177**: 1205-1208.

Ihara, S., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., Nagata, S., Hirano, T., and Fukui, Y. 1997. "Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6." *EMBO J.* **16**(17): 5345-52.

Ihle, J.N. 1995. Cytokine receptor signaling. *Nature* **377**:591-594.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. 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**: 5317-5326.

Janeway, C.A. Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. 2005. Immunobiology- the immune system in health and disease. 6th edition.

Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyhara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y-H., Dakhama, A., and Gelfand E.W. 2007. Naturally Occurring Lung CD4⁺CD25⁺ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- β The Journal of Immunology. **178**: 1433-1442.

Jones, S.A. 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6 The Journal of Immunology. **175**: 3463-3468.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H., 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* **193**: 1285-1294.

Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., Rose-John, S. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R Trans-Signaling responses. *Eur J Biochem.* **268**:160-167.

Kallen, K-J. 2002. The role of Trans-Signaling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1592**: 323-343.

Karras, J.G., McGraw, K., McKay, R.A., Cooper, S.R., Lerner, M., Lu, T., Walker, C., Dean, N.M., Monia, B.P. 2000. Inhibition of antigen-induced eosinophilia and late phase airway hyperresponsiveness by an IL-5 antisense oligonucleotide in mouse models of asthma. *The Journal of Immunology.* **164**: 5409-5415.

Karwot, R., Doganci, A., Maxeiner, J.H., Schmitt, S., Scholtes, P., Hausding, M., Lehr, H.A., Boross, I., Galle, R.P., Glimcher, L.H., and S. Finotto. Essential role for NFATc2 in CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in a murine model of allergic sensitisation. *JEM* submitted, 2nd revision.

Kawano, Y., Noma, T., and Yata, J. 1994. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol.* **153**(11): 4948-58.

Kay, A.B. 1996. Pathology of mild, severe, and fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **154**(2 Pt 2): S66-69.

Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., Lloyd, C.M. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med.* **202**(11): 1539-47.

Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* **4**: 337-342.

Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* **86**: 1243-1254.

Kon, O.M., and Kay, A.B. 1999. T cells and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* **118**:133-135.

Kroegel, C., Julius, P., Matthys, H. 1996. Endobronchial secretion of IL-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to IL-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J.* **9**: 899-904.

Krug, N., Cruikshank, W.W., Tschernig, T., Erpenbeck, V.J., Balke, K., Hohlfeld, J.M., Center, D.M., Fabel, H. 2000. Interleukin-16 and T-cell chemoattractant activity in bronchoalveolar lavage 24 hours after allergen challenge in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **162**: 105-111.

Kundig, T.M., Schorle, H., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., and Horak, I. 1993. Immune responses in IL-2-deficient mice. *Science* **262**: 1059-1061.

La Flamme, A.C., and Pearce, E.J.1999. The Absence of IL-6 Does Not Affect Th2 Cell Development In Vivo, But Does Lead to Impaired Proliferation, IL-2 Receptor Expression, and B Cell Responses. *Journal of Immunology.* **162**: 5829-5837.

Lambrecht, B.N., Salomon, B., Klatzmann, D. & Pauwels, R.A. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* **160**(8): 4090-4097.

Lange, P., Parner, J., and Vesto, J. 1998. A 15-year follow-up study of ventilatory funktion in adults with asthma. *N Engl J Med* **339**: 1194-1200.

Leckie, M.J., ten Brincke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, M., Cowley, H., Chung, K.F., Djukanovic, R.J., Hansel, T.T., Holgate, S.T., Sterk, P.J., Barnes, P.J. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response. *Lancet*. **356**: 2144–2148.

Lee, J.J., McGarry, M.P., Farmer, S.C., Denzler, K.L., Carson, K.A., Carrigan, P.E., Brenneise, I.E., Horton, M.A., Haczku, A., Gelfand, E.W., Leikauf, G.D., and Lee, N.A. 1997. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *Journal of Experimental Medicine* **185**: 2143-2156.

Leonard, W.J., Depper, J.M., Uchiyama, T., Smith, K.A., Waldmann, A.T., and Greene, W.C. 1982. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Letters to Nature*. **300**: 267-269.

Leonard, W.J. Kronke, M., Pepper, N.J., Depper, J.M., and Greene, W.C. 1985. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *PNAS* **82**:6281-6285.

Leung, R., Wong, G., Lau, J., Ho, A., Chan, J.K., Choy, D., Douglass, C., and Lai, C.K. 1997. Prevalence of asthma and allergy in Hong Kong schoolchildren: an ISAAC study. *Eur Respir J* **10**(2): 354-360.

Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M.G. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. **129**: 263-76.

Liang, B., Gardner, D.B., Griswold, D.E., Bugelski, P.J., and Song X.Yu R. 2006. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunology*. **119** (3): 296 – 305.

Lilly, C.M., Chapman, R.W., Sehring, S.J., Mauser, P.J., Egan, R.W., and Drazen, J.M. 1996. Effects of interleukin-5-induced pulmonary eosinophilia on airway reactivity in the guinea pig. *American Journal of Physiology*. **270**: L368-375.

Lin, J-X., and Leonard, W.J. 1997. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cyt. Groth Fac. Rev* **8**(4): 313-332,

Liu, K.D., Greene, W.C., and Goldsmith, M.A. 1996. The alpha chain of the IL-2 receptor determines the species specificity of high affinity IL-2 binding. *Cytokine* **8**: 613- 621.

Löhning, M. 2000. Differenzierungsprogramme von T-Helfer-Lymphozyten. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln. Ref Type: Thesis/Dissertation

- Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, P., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T., and Carson, D. A. 1988.** "B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes." *J Exp Med.* **167**(3): 1253-8.
- Lowenthal, J.W., Corthésy, P., Tougne, C., Lees, R., MacDonald, H.R., and Nabholz, M. 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 – 3994.
- Lust, J.A., Donovan, K.A., Kline, M.P., Greipp, P.R., Kyle, R.A., and Maihle, N.J. 1992.** "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." *Cytokine* **4**: 96-100.
- MacDonald T.T. 1998.** T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol* **10**: 620- 627.
- Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich P.C., and Rose-John, S. 1992.** "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." *J Immunol.* **149**(6): 2021-7.
- Malek, T.R. and Bayer. A.L. 2004.** Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* **4**: 665-674.
- Maloy, K.J., and Powrie, P. 2001.** Tregs in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* **2**:816–822.
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J., Mattoli, S. 1992.** Expression of the potent inflammatory cytokines, GM-CSF and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *Journal of Allergy Clinical Immunology* **89**: 1001-1009.
- Mark, D.A., Donovan, C.E., De Sanctis, G.T., Krinzman, S.J., Kobzik, L., Sayegh, M.H., Lederer, J., Perkins, D.L., and Finn, P.W. 1998.** Both CD80 and CD86 co-stimulatory molecules regulate allergic pulmonary inflammation. *Int Immunol.* **10**(11): 1647-1655.
- Marone G. 1998.** Asthma:recent advances. *Immunol Today* **19**(1): 5-9.
- McLoughlin, R.M., Witowski, J., Robson, R.L., Wilkinson, T.S., Hurst, S.M., Williams, J.D., Rose-John, S., Jones, S.A., and Topley, N. 2003.** Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation *J Clin Invest.* **112**(4):598-607.
- Marshall, J. S., Leal-Berumen, I., Nielsen, L., Glibetic, M., and Jordana, M. 1996.** Interleukin (IL)-10 Inhibits Long-Term IL-6 Production but Not Preformed Mediator Release from Rat Peritoneal Mast Cells. *J Clin Invest.* **97**: 1122-1128.

- Maxeiner, J.H., Karwot, R., Hausding, M., Sauer, K.A., Scholtes, P., and Finotto, S. 2007.** A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nat Protoc.* **2**(1): 105-112.
- Meinke, A., Barahmand-Pour, F., Wohrl, S., Stoiber, D., Decker, T. 1996.** Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signaling in response to interferons. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6937-44.
- Mishima, H., Hojo, M., Watanabe, A., Hamid, Q.A., Martin, J.G. 1998.** CD4⁺ T cells can induce airway hyperresponsiveness to allergen challenge in the brown norway rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **158**: 1863-1870.
- Moreau, J.-L., Nabholz, M., Diamantstein, T., Malek, T., Shevach, E., and Thèze, J. 1987.** Monoclonal antibodies identify three epitope clusters on the mouse p55 subunit of the interleukin 2 receptor: relationship to the interleukin 2-binding site. *Eur J Immunol.* **17**: 929 - 935.
- Mosmann, T.R., and Moore, K.W. 1991.** The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today.* **12**(3): A49-53.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. 1993.** "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase." *Science* **260**(5115): 1808-10.
- Murawski, M.R., Litherland, S.A., Clare-Salzler, M.J., and Davoodi-Semiromi, A. 2006.** Upregulation of Foxp3 Expression in Mouse and Human Treg Is IL-2/STAT5 Dependent: Implications for the NOD STAT5B Mutation in Diabetes Pathogenesis. *Ann NY Acad Sci.* **1079**: 198-204.
- von Mutius, E., Martinez, F.D., Fritsch, C., Nicolai, T., Roell, G., and Thiemann, H.H. 1994.** Prevalence of asthma and atopy in two areas of west and east germany. *Am J Respir Crit Care Med.* **149**:358-364.
- Mutschler, E., und Geisslinger, G. 2001.** Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P.C., and Rose-John, S. 1992.** "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." *Biochem Biophys Res Commun.* **189**(2): 794-800.
- Naclerio R., and Solomon W. 1997.** Rhinitis and inhalant allergens. *JAMA* **278**: 1842- 1848.

- Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., and Hirano, T. 1996.** A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J.* **15**(14): 3651-3658.
- Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. 2001.** Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* **194**: 629-644.
- Naseer, T., Minshall, E. M., Leung, D. Y. 1997.** Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* **155**: 845-851.
- Nelson, B.H. 2002.** Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr Dir Autoimmun.* **5**: 92-112.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H. 2002.** The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine* **8**: 567-573.
- Ninan, T.K., Russell, G., Shaw, R.A., Crane, J., O'Donnell, T.V., Porteous, L.E. & Coleman, E.D. 1992.** Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population:1975-89. *Bmj* **304**(6831): 873-875.
- Norihiro, N., Aie, I., Mika, O., Hiromi, T., Tomoshige, M., Tetsuya, T., Takahiro, O., and Kazuyuki, Y. 2000.** "IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor." *International Immunology* **12**(2): 187-193.
- Oddera, S., Silvestri, M., Penna, R. 1998.** Airway Eosinophilic Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness after Allergen Inhalation Challenge in Asthma. *Lung* **176**: 237-247.
- O'Garra, A., and Vieira, P. 2003.** Twenty-first century Foxp3. *Nat Immunol.* **4**:304–306.
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. 1988.** "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J Immunol.* **141**(5): 1543-9.
- Ouyang, W., Löhning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., Murphy, K.M. 2000.** STAT6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* **12**: 27-37.
- Paetkau, V. 1985.** Molecular biology of interleukin 2. *Can J Biochem Cell Biol* **63**: 91-699.

- Pasare, C., and Medzhitov, R. 2003.** Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**:1033–1036.
- Pawson, T. 1995.** Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**: 573-580.
- Pearlman, D.S. 1999.** Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* **104**: S132-S137.
- Perkins, C., Wills-Karp, M., and Finkelman, F.D. 2006.** IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 118(2): 410-419.
- Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Fattori, E., Ciliberto, G., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Rose-John, S. 1997.** Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *Journal of Experimental Medicine* **185**: 755-766.
- Peters, M., Müller, A., Rose-John, S. 1998.** Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* **92**: 3295-3504.
- Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Mullberg, J., Wolf, E., Brem, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Rose-John, S. 1996.** The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med.* **183**: 1399-1406.
- Peters, M., Odenthal, M., Schirmacher, P., Blessing, M., Fattori, E., Ciliberto, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Rose-John, S. 1997.** Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. *J Immunol.* **159**: 1474-1481.
- Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. 2001.** Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* **167**:1137-1140.
- Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E.M. 2002.** CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* **196**: 237-246.
- Pollard, A.M., and Lipscomb, M.F. 1990.** Characterization of murine lung dendritic cells: similarities of Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J Exp Med.* **172**: 159-167.

Postma D.S., Bleecker, E.R., Amelung, P.J., Holroyd, K.J., Xu, J., Panhuysen, C.I.M., Meyers, D.A., and Levitt, R.C. 1995. Genetic susceptibility to asthma - bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med.* **333**: 894-900.

Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E.O. 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol.* **167**(4):1877-1881.

Ray, A., Tatter, S.B., Santhanam, U., Helfgott, D.C., May, L.T., Sehgal, P.B. 1989. Regulation of expression of interleukin-6: molecular and clinical studies. *Ann NY Acad Sci* **557**: 353–362.

Ray, A., and Cohn, L. 1999. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation* **104**: 985-993.

Renz, H., Bradley, K., Enssle, K., Loader, J.E., Larsen, G.L., Gelfand, E.W. 1996. Prevention of the development of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness following *in vivo* treatment with soluble IL-4 receptor. *International Archives of Allergy and Immunology* **109**: 167-176.

Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. 2004. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med.* **200**(9):1123-3435.

Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R.A. 1997. Interleukin-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4 T cells. *J Exp Med.* **185**:461.

Ring, J. 1997. Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *Int Arch Allergy Immunol.* **113**:7-10.

Robinson, D.S., Hamid, Q., Bentley, A.M., Ying, S., Kay, A.B., Durham, S.R. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **92**: 313-324.

Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., Kay, A.B. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *New England Journal of Medicine* **326**: 298-304.

Rolland J., and O'Hehir R. 1998. Immunotherapy of allergy: anergy, deletion, and immune deviation. *Curr Opin Immunol* **10**: 640-645.

- Roncador, G., Brown, P.J., Maestre, L., Hue, S., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Ling, K-L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B.C., Cerundolo, V., Powrie, F., Banham, A.H. 2005.** Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* **35**: 1681-1691.
- Romagnani S., Parronchi P., D'Elia M.M., Romagnani P., Annunziato F., Piccini M.P., Manetti R., Sampognaro S., Mavillia C., De-Carli M., Maggi E., and Del-Prete D.F. 1997.** An update on Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol* **113**: 153-156.
- Romagnani, S. 2000(b)** The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* **105**: 399-408.
- Romagnani, S. 2006.** Regulation of T cell response. *Clin Exp Allergy.* 36(11): 1357-1366.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., and Mantovani, A. 1997.** "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment." *Immunity* **6**: 315-325.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., Levings, M.K. 2001.** Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* **182**: 68-79.
- Rose-John, S., Fischer, M., Blinn, G., Peschel, C., Peters, M., und Mackiewicz, A. 1998.** Interleukin-6 (IL-6) und IL-6 Rezeptor sind potente Stimulatoren der Immunantwort und der Hämatopoese in vitro und in vivo. **6th** International Expert Forum on Immunotherapy and Gene therapy.
- Rose-John, S., and Heinrich, P. C. 1994.** Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J.* **300**(2): 281–290.
- Ruscetti, F.W. 1985.** Interleukin-2, 1984: year of the receptor. *Year Immunol.* 100-106.
- Sabin, E.A., Kopf, M.A., and Pearce, E.J. 1996.** *Schistosoma mansoni* egg induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med.* **184**:1871-1878.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. 1995.** Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* **155**: 1151-1164.
- Sakaguchi, S. 2005.** Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**: 345-352.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. New York, N.Y.

Sampson A.P., and Rorke S. 1996. Combination therapy with anti-mediator drugs in allergic disease. Clin Exp Allergy **31**: 11-17.

Saura, M., Zaragoza, C., Bao, C., Herranz, B., Rodriguez-Puyol, M., and Lowenstein, C.,J. 2006. Stat3 Mediates Interleukin-6 Inhibition of Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression. J Biol Chem. **281**(40): 30057-30062.

Scheffold, A., Huhn, J., Hofer, T. 2005. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango. Eur J Immunol **35**(5): 1336-41.

Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin (IL)-6, IL-1 and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. Blood **75**: 40-47.

Seddon, B. and D. Mason. 2000. The third function of the thymus. Immunol Today **21**:95-99.

Shardonofski, F.R., Venzor, J., Barrioa, R., Leong, K.-P., Huston, D.P. 1999. Therapeutic efficacy of an anti-IL-5 monoclonal antibody delivered into the respiratory tract in a murine model of asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology **104**: 215-221.

Sharma, R., Bagavant, H., Jarjour, W.N., Sung, S-S. J., Ju, S-T. 2005. The Role of Fas in the Immune System Biology of IL-2R α Knockout Mice: Interplay among Regulatory T Cells, Inflammation, Hemopoiesis, and Apoptosis. J Immunol. **175**: 1965-1973.

Shaw, R.A., Crane, J., O'Donnell, T.V., Porteous, L.E. & Coleman, E.D. 1990. Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population: 1975-89. Arch Dis Child. **65**(12): 1319-1323.

Shevach, E.M. 2002. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. **2**: 389-400.

Shirakawa, F., Tanaka, Y., Eto, S., Suzuki, H., Yodoi, J., and Yamashita, U. 1986. Effect of interleukin 1 on the expression of interleukin 2 receptor (Tac antigen) on human natural killer cells and natural killer-like cell line (YT cells). J Immunol. **137**(2): 551-556.

Solway, J. 2000. What makes the airways contract abnormally? Is it inflammation? American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **161**: 164S-167S.

- Spiteri, M.A., Prior, C., Herold, M., Knight, R.A., Clarke, S.W., Chung, K.F. 1992.** Spontaneous release of IL-1, IL-6, TNF- α and GM-CSF by alveolar macrophages (AM) in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* **145**: A239.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., J.N., I. and Yancopoulos, G.D. 1994.** "Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components." *Science* **263**(5143): 92-95.
- Steinke, J.W., Borish, L. 2001.** Th2 cytokines and asthma — Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* **2**:66–70.
- Striz, I., Mio, T., Adachi, Y., Romberger, D.J., Rennard, S.I. 1999.** Th2-type cytokines modulate IL-6 release by human bronchial epithelial cells. *Immunology Letters.* **70**: 83-88.
- Suri-Payer, E., and Cantor, H. 2001.** Differential Cytokine Requirements for Regulation of Autoimmune Gastritis and Colitis by CD4+CD25+T cells. *Journal of Autoimmunity.* **16**(2): 115-123.
- Suzuki, H., Duncan, G.S., Takimoto, H., and Mak, T.W. 1997.** Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J. Exp med.* **185**(3):499-505.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa,, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. 2000.** A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* **100**(6):655-669.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. 1989.** "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." *Cell* **58**(3): 573-81.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. 1998.** Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**: 1969-1980.
- Tanaka, .T., Tsudo, M., Karasuyama, H., Kitamura, F., Kono, T., Hatakeyama, M., Taniguchi, T., and Miyasaka, M. 1991.** A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL- 4 cells. *J Immunol.* **147**(7): 2222-2228.

- Tang, C., Rolland, J.M., Ward, C., Quan, B., and Waters, E.H. 1997.** IL-5 production by bronchoalveolar lavage and peripheral blood mononuclear cells in asthma and atopy. *Eur Respir J.* **10**:624–632.
- Tang, C., Rolland, J.M., Li, X., Ward, C., Bish, R., and Walters, E.H. 1998.** Alveolar macrophages from atopic asthmatics, but not nonasthmatics, enhance interleukin-5 production by CD4+ T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **157**: 1120-1126.
- Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, Y., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, M., Hatakeyama, M., Liu, Z.J. 1995.** IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Annals NY Acad Sci.* **766**: 235-244.
- Tamm, I. 1989.** IL-6: Current research and new questions. *Ann NY Acad Sci.* **557**: 478-489.
- Taniguchi, T., and Minami, Y. 1993.** The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell.* **73**: 5 -8.
- Thornton, A.M. and Shevach, E.M. 1998.** CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* **188**: 287-296.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. 2000.** Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* **164**:183-190.
- Thornton, A.M., Donovan, E.E., Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. 2004.** Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* **172**: 6519-6523.
- Thornton, A.M., Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. 2004.** Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* **34**: 366-376.
- Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., and Leiden, J.M. 1996.** Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature.* **384**: 474-478.
- Ulich, T.R., Yin, S., Guo, K., Yi, E.S., Remick, D., del Castillo, J. 1991.** Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. Interleukin-6 and transforming growth factor inhibit acute inflammation. *American Journal of Pathology.* **138**: 1097-1101.
- Valitutti, S., Muller, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A. 1996.** Signal extinction and T cell repolarization in T helper cell-antigen-presenting cell conjugates. *Eur J Immunol.* **26**: 2012-2016.

- Van Harwerden L, Harrap, S.B., Wong, Z.Y., Abramson, M.J., Kutin, J.J., Forbes, A.B., Raven, J., Lanigan, A., and Walters, E.H. 1995.** Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in the absence of atopy. *Lancet* **346**: 1162-1165.
- Vercelli, D., Jabara, H., Arai, K., Yokota, T., Geha, R.S. 1989.** Endogenous IL-6 plays an obligatory role in IL-4 dependent IgE synthesis. *European Journal of Immunology*. **19**: 1419-1424.
- Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996.** T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**: 104-106.
- Virchow, J. C., C. Walker, D. Häfner, C. Kortsik, P. Werner, H. Matthys, C. Kroegel. 1995.** T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge in atopic asthma. *Am J Crit Care Med*. **151**: 960-968.
- Waldmann, T.A. 1991.** Lymphokine receptor-directed therapy: a model for immune intervention in leukemia, autoimmunity, and immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. **61**: 37-46.
- Waldmann, H, Cobbold, S.P., Wraith, D., Isaacs, J. 1992.** Therapeutic immunosuppression of T cells. *Curr Opin Biotechnol*. **3**(6): 668-674.
- Wakao, H., Gouilleux, F., Groner, B. 1994.** Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *Embo J*. **13**(9): 2182-91.
- Wan, S., Xia, C., and Morel, L. 2007.** IL-6 Produced by Dendritic Cells from Lupus-Prone Mice Inhibits CD4+CD25+ T Cell Regulatory Functions *The Journal of Immunology*. **178**: 271-279.
- Wang, J., Homer, R.J., Chen, Q., Elias, J.A. 2000.** Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *The Journal of Immunology*. **165**: 4051-4061.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M. 1994.** IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*. **153**: 811-816
- Watanabe, K., Saito, K., Kinjo, M., Matsuda, T., Tamura, M., Kon, S., Miyazaki, T., and Uede, T. 2004.** Molecular dynamics of STAT3 on IL-6 signaling pathway in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **324**(4):1264-1273.
- Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S., and Filipovich, A.H. 2002.** Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. **39**: 537-545.

- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. 1995.** Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 3(4): 521-530.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., Donaldson, D.D. 1998.** Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. *Science*. 18: 2258-2261.
- Winther L., Malling H-J., and Mosbech H. 2000.** Allergen-specific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. II. Side-effects. *Allergy*. 55: 827-835.
- Wohlfert, E.A., Callahan, M.K., and Clark, R.B. 2004.** Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b^{-/-} mice. *J Immunol* 173: 1059-1065.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, H., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.-F., Achong, M.K. 1998.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*. 101: 311-320.
- Yang, Y., Ochando, J., Yopp, A., Bromberg, J.S., and Ding, Yaozhong. 2005.** IL-6 Plays a Unique Role in Initiating c-Maf Expression during Early Stage of CD4 T Cell Activation. *J Immunol*. 174: 2720-2729.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Morrigl, R., Henninghausen, L., Wu, C., and O'Shea, J.J. 2007.** Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*. 109(10):4368-4375.
- Yokoyama, A., Kohno, N., Fujino, S., Hamada, H., Inoue, Y., Fujioka, S., Ishida, S., and Hiwada, K. 1995.** Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 151 (5): 1354-1358.
- Yokoyama, A., Kohno, N., Sakai, K., Kondo, K.-I., Hirasawa, Y., Hiwada, K. 1997.** Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 156: 1688-1691.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. 1997.** The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89: 587-596.
- Zhou, M., and Ouyang, W. 2003.** The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunology Research*. 28: 25-37.
- Zohlnhöfer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E., and Heinrich, P. C. 1992.** "The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand." *FEBS Lett*. 306(2-3): 219-222.