

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Frequenz, Funktion und Phänotyp regulatorischer T-Zellen bei Kindern mit schwerer  
atopischer Dermatitis**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Verena Reichert  
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2009



**Referent:** Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Koreferent:** Professor Dr. med. Henning Hamm

**Dekan:** Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung :** 20. Juli 2010

**Die Promovendin ist Ärztin**



Meiner Familie gewidmet



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
aTreg	Antigen-induzierte regulatorische T-Zelle
Bio	biotinyliert
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CLA	cutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen
CTLA	Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen
CCR	Chemokin-Rezeptor
CyA	Cyclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
EASI	Eczema Area and Severity Index
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
g	Gramm
GITR	Glukokortikoid induzierter Tumornekrosefaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host Disease
h	Stunde

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IE	internationale Einheiten
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGA	Investigator's Global Assessment
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, x-linked-inheritance-syndrome
KM	Knochenmark
L	Ligand
LK	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting/Magnetische Zell- Separations Technologie
MHC	Major Histocompatibility Complex/ Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mk	monoclonal
mM	millimolar
MNZ	mononukleäre Zelle
MS	Multiple Sklerose
mRNA	messenger RNA/Botenribonukleinsäure
$\mu$ l	Mikroliter
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PBS	Phosphate Buffered Saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein



PBMC	peripheral blood mononuclear cells/mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
Ref.	Referenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
SEM	Standard Error of the Mean/Standardfehler
$T_{cm}$	central memory T cells/ zentrale T-Gedächtniszelle
$T_{eff}$	T-Effektorzellen
$T_{em}$	T-Effektor-Gedächtniszellen
TGF	Transforming Growth Factor/transformierender Wachstumsfaktor
$T_H$	T-Helferzelle
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
z.T.	zum Teil



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Überblick über das Immunsystem .....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2 Das erworbene Immunsystem .....	1
1.2 Die Zellen des erworbenen Immunsystems .....	2
1.2.1 Funktion der B-Lymphozyten .....	2
1.2.2 Funktion der T-Lymphozyten .....	4
1.2.3 Grundzüge der Entwicklung von T-Lymphozyten.....	4
1.2.4 Aktivierung der T-Lymphozyten .....	5
1.2.5 T-Helfer-Zell Differenzierung.....	6
1.2.6 Entwicklung der T-Effektor-Gedächtniszellen und zentralen T-Gedächtniszellen.....	7
1.2.7 Die regulatorischen T-Lymphozyten .....	9
1.2.8 Kontrolle der T-Effektorzell abhängigen Immunreaktion durch regulatorische T-Lymphozyten.....	10
1.2.9 Phänotyp und Eigenschaften humaner, regulatorischer T-Lymphozyten .....	10
1.2.10 Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in regulatorischen T-Lymphozyten .....	12
1.2.11 Verhältnis zwischen dem Aktivierungsmarker CD45RA und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in regulatorischen T-Lymphozyten .....	13
1.3 Die Hypersensitivitätsreaktionen .....	15
1.3.1 Der allergische Formenkreis .....	15

1.3.2	Die Atopie .....	16
1.3.3	Definition der atopischen Dermatitis .....	17
1.3.3.1	Epidemiologie der atopischen Dermatitis .....	17
1.3.3.2	Auswirkungen der atopischen Dermatitis auf die Lebensqualität Betroffener .....	18
1.3.3.3	Klinische Erscheinungsbilder der atopischen Dermatitis und deren Klassifikation .....	19
1.3.3.4	Prognose zum Verlauf der atopischen Dermatitis bei Kindern	20
1.3.3.5	Therapieoptionen bei atopischer Dermatitis .....	21
1.4	Pathogenese allergischer Erkrankungen.....	22
1.4.1	Pathogenese der atopischen Dermatitis .....	22
1.4.2	Die Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen und der atopischen Dermatitis .....	23
1.5	Fragestellung .....	25
<b>2.</b>	<b>Material .....</b>	<b>26</b>
2.1	Antibiotika.....	26
2.2	Antikörper.....	26
2.2.1	Durchflusszytometrie .....	26
2.2.2	Antikörper zur Lymphozytenstimulation .....	26
2.3	Magnetische Partikel zur Zellaufreinigung.....	26
2.4	Gebrauchsfertige Kits.....	27
2.4.1	Gebrauchsfertige Kits zur Zellaufreinigung .....	27
2.4.2	Gebrauchsfertige Kits zur intrazellulären Färbung .....	27
2.5	Säulen zur Zellaufreinigung.....	27
2.6	Feinchemikalien .....	27
2.7	Seren.....	27

2.8	Puffer und Medien .....	27
2.9	Gebrauchsfertige Lösungen .....	28
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Probanden- und Kontrollkollektiv .....	29
3.2	Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut .....	30
3.3	Anwendung der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung mononukleärer Zellen.....	30
3.3.1	Antikörperfärbung von Molekülen auf der Zelloberfläche isolierter, mononukleärer Zellen .....	31
3.3.2	Intrazelluläre Färbung von FoxP3 .....	31
3.4	Isolierung verschiedener Zellpopulationen mit Hilfe der magnetischen Zell-Separations Technologie.....	33
3.4.1	Anreicherung CD4+ T-Zellen mittels magnetischer Zell- Separation .....	33
3.4.2	Anreicherung von CD25+ und CD25-CD4+ T-Zellen mittels magnetischer Zell-Separation .....	34
3.4.3	Anreicherung antigenpräsentierender Zellen .....	35
3.5.	Analyse der Proliferation CD25- T-Zellen unter Anwendung der Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester Methode .....	36
3.6	Statistische Analyse .....	37
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
4.1	Das Probanden- und Kontrollkollektiv .....	38
4.2	Charakterisierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels CD25, CD127 sowie des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3.....	39
4.3	Vergleichende Untersuchungen von Tregs in Patienten- und Kontrollgruppe.....	41

4.3.1	Analyse der Frequenz regulatorischer T-Zellen .....	41
4.3.2	Funktionelle Analyse regulatorischer T-Lymphozyten.....	43
4.4	Phänotypische Charakteristika regulatorischer T-Zellen der Patienten- und Kontrollgruppe .....	45
4.4.1	Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD127, CD45RO/CD45RA und CCR7.....	45
4.4.2	Expression des Todesrezeptors CD95 .....	48
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
5.1	Methodische Überlegungen .....	52
5.2	Die regulatorischen T-Zellen .....	53
5.3	Rolle der Aktivierungs- und Gedächtnismarker CD25, CD45RO/RA und CCR7 .....	56
5.4	CD95 - Wie wichtig ist Apoptose? .....	58
5.5	Perspektiven: Regulatorische T-Zellen in der klinischen Anwendung .	60
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>

# **1. Einleitung**

## 1.1 Überblick über das Immunsystem

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

In Vertebraten wird zwischen angeborener (unspezifischer) und erworbener (spezifischer) Immunantwort unterschieden. Diese beiden Arten der Immunantwort lassen sich wiederum in die humorale und zelluläre Abwehr unterteilen. Das angeborene Immunsystem besteht aus der Barrierefunktion der Körperepithelien, welche die Entwicklung von Infektionen verhindern sowie aus Zellen und Molekülen, die in der Lage sind, Krankheitserreger, welche die äußere Barriere durchbrochen haben, zu eliminieren. Dazu gehören z.B. die Gewebs-Makrophagen, die zum zellulären Abwehrsystem gehören und das Komplementsystem, das die humorale Immunität vermittelt. Das angeborene Immunsystem bildet den ersten Schutz gegen Antigene, da es vier bis sieben Tage dauert, bis das adaptive Immunsystem eine wirksame Immunantwort zur Eliminierung eines Antigens erzeugen kann. Das unspezifische Immunsystem wird folglich auch von dem spezifischen Immunsystem unterstützt, ergänzt und gesteuert.

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene bzw. adaptive Immunsystem charakterisiert die durch klonale Selektion herbeigeführte Immunität und Spezifität. Des Weiteren kann das adaptive Immunsystem zwischen "selbst" und "nicht selbst" unterscheiden sowie eine Gedächtnisfunktion entwickeln. Diese Funktionen werden von hochspezialisierten T- und B-Lymphozyten ausgeführt. Die Spezifität der Immunreaktion kommt durch die extreme Vielfalt der Antigen-erkennenden Rezeptoren zustande. Jeder Lymphozyt exprimiert einen solchen Rezeptor, der für die Erkennung eines einzigen Antigens spezifisch ist, an seiner Zelloberfläche. Nach Antigenkontakt differenziert ein Teil der B- und T-Zellen zu Effektorzellen. Diese Effektorzellen werden größtenteils innerhalb weniger Wochen

apoptotisch, der überlebende Teil differenziert zu langlebigen Gedächtniszellen. Diese können bei wiederholtem Antigenkontakt sehr viel schneller und effizienter aktiviert werden (Übersicht in Ref. [1]).

## 1.2 Die Zellen des erworbenen Immunsystems

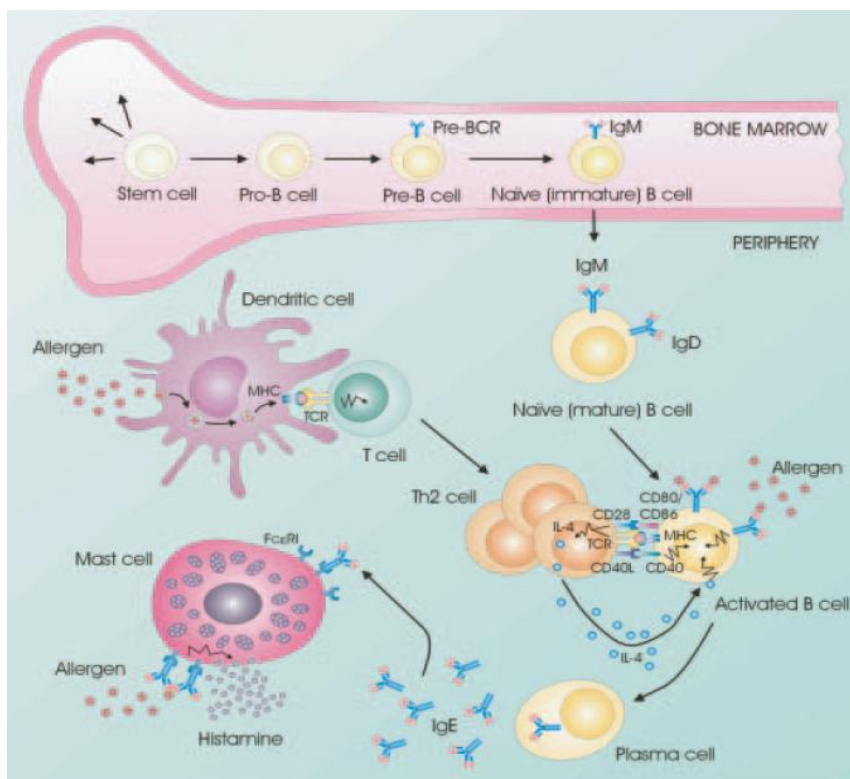
### 1.2.1 Funktion der B-Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Nach der B-Zell-Reifung im Knochenmark (primäres lymphatisches Organ) erfolgt deren Migration in die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. Lymphknoten (LK), Milz und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe, um dort ihre Effektorfunktionen auszuführen. Die Antigenbindungsstelle der B-Zellen, der B-Zell-Rezeptor (BZR), besteht aus einer membrangebundenen Form eines Antikörpers, dem sogenannten Oberflächen-Immunglobulin. Die Bindung eines Antigens an den BZR stimuliert die Expression von CD80/CD86 sowie des MHC-II-Komplexes. Mithilfe des MHC-Komplexes werden aufbereitete Antigene T-Lymphozyten präsentiert und T-Helferzellen aktiviert.

Der Kontakt zwischen BZR und  $T_H$ -Zellen führt zur Mehrexpression des CD40-Liganden (CD40L) auf der  $T_H$ -Zelle. Die Interaktion des CD40 Rezeptors der B-Zelle mit dem CD40L der T-Zelle stimuliert die B-Zell Proliferation. Einige B-Zellen differenzieren daraufhin zu Plasmazellen, die direkt ins Knochenmark wandern und IgM bzw. später IgG sezernieren (Übersicht in Ref. [2]). Der Großteil der B-Zellen migriert jedoch in die LK-Regionen. Einige Tage nach Antigenkontakt proliferieren B-Zellen im Keimzentrum der LK, das von aktivierenden  $T_H$ -Zellen umgeben ist. Innerhalb einer Woche entwickeln sich viele Keimzentren, in denen die somatische Hypermutation, der Wechsel der Immunklassen und die Formation von Plasma- und B-Gedächtniszellen stattfindet [2]. Bei der somatischen Hypermutation entstehen zufällige Veränderungen in der leichten und schweren Kette des BZR, so dass sich ihre Ig-Bindungsstelle verändert. Binden B-Zellen ein Antigen mit hoher Affinität, können sie weiterhin Antikörper sezernieren und zu Plasmazellen



differenzieren. B-Zellen, die mit niedriger Affinität Antigene binden werden durch Apoptose eliminiert [2]. Nach Antigenexposition werden zunächst Antikörper der Klasse IgM produziert. Im Verlauf wird bei dem sogenannten Ig-Klassen-Switch der H-Ketten Locus durch genetische Rekombination umgelagert. Hierzu ist die CD40/CD40L Interaktion sowie die Sekretion spezifischer Zytokine der aktivierten T-Zellen unabdingbar. Der Switch von IgM zu IgE, der bei atopischen und allergischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielt, wird unter anderem von den Zytokinen IL-4 und IL-13 gesteuert, die von T<sub>H</sub>2-Zellen sezerniert werden (Abb. 1) [2].



**Abb. 1:** Zelluläre Interaktion zwischen B- und T-Zellen bei der B-Zell-Reifung. B-Zellen des KM wandern zur Aktivierung in LK. Von APZs inokulierte Allergene werden an MHC-II-Komplexe gebunden und T-Zellen präsentiert, die daraufhin aktiviert werden und zu T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren. Treffen B-Zellen auf ihr spezifisches Antigen, wird dieses auf der B-Zelle durch den MHC-II-Komplex präsentiert und T<sub>H</sub>2-Zellen werden aktiviert sowie zur Proliferation und Sekretion von IL-4 angeregt. Ebenfalls wird die Expression des CD40L hochreguliert. Stimulation von CD40 der B-Zelle führt zur vermehrten Expression von CD80/86, welches die CD40L Expression auf T-Zellen anregt und B-Zellen durch die Induktion von IL-4 vermehrt stimuliert. Die CD40 vermittelte Stimulation der B-Zellen bewirkt mit der Hilfe von IL-4 Rezeptor-Signalen eine vermehrte Umlagerung des IgE-Genom-Locus und somit die Produktion von IgE-Antikörpern. Allergenspezifisches IgE bindet die hochaffinen IgE-Rezeptoren auf Mastzellen. Nach Allergenexposition werden die gebundenen Antikörper quervernetzt, was in der Mastzelldegranulation und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine resultiert [2].

### 1.2.2 Funktion der T-Lymphozyten

Anhand ihres Phänotyps können verschiedene Gruppen von T-Zellen, unterschieden werden.

CD8+ zytotoxische T-Zellen sind in der Lage körperfremde Zellen oder Zellen, die ein mutiertes Genprodukt exprimieren, zu vernichten. Sie erkennen Antigenfragmente in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. CD4+ T-Helfer-Zellen besitzen die Fähigkeit, andere Zellen, wie z.B. B-Zellen oder Makrophagen, zu aktivieren. Ihre Funktion besteht in der Kontrolle und Steuerung der Immunantwort. Sie erkennen Antigenfragmente, die mit MHC-Klasse-II-Molekülen assoziiert sind.

### 1.2.3 Grundzüge der Entwicklung von T-Lymphozyten

Die Entwicklung der Spezifität von Antigenrezeptoren auf T-Lymphozyten erfolgt nach dem Zufallsprinzip. Dies führt zu einem umfangreichen Repertoire an Antigenrezeptoren. Zahlreiche, potentielle Rezeptoren sind jedoch gegen körpereigene Strukturen gerichtet. Vorläufer der T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, wo die TZR Gene umgelagert werden und somit die Antigenspezifität eines jeden Lymphozyten festgelegt wird. Diesen Vorläufer-T-Zellen fehlen die meisten Oberflächenmoleküle, die für reife T-Zellen charakteristisch sind. Die Differenzierung zu Zellen der T-Zell-Linie erfolgt durch die Umlagerung der Genloci für die TZR- $\beta$ -Kette und die Expression des prä-TZR-Komplexes. Dies hat zur Folge, dass die „doppelt negativen“ CD4-CD8- Vorläuferzellen unter dem Einfluss von IL-7 expandieren und dass CD4 und CD8 auf der größten Untergruppe der „doppelt-positiven“ Thymozyten hochreguliert wird. Dies führt zur Umlagerung der TZR- $\alpha$ -Kette und zur Bildung des TZR [3, 4]. Doppelt positive T-Zellen werden daraufhin der Positivselektion unterzogen. Zellen, deren TZR schwach aber signifikant mit dem selbst-MHC-Peptid-Komplex reagiert, werden selektioniert und erhalten ein Überlebenssignal (Übersicht in Ref. [5, 6]). T-Zellen hingegen, die eine hohe Affinität zu selbst-MHC-Liganden und somit autoaggressive Eigenschaften

aufweisen, werden durch Negativselektion eliminiert (Übersicht in Ref. [5, 7]). So entwickeln sich "einfach positive" CD4+CD8- oder CD4-CD8+ T-Zellen. Die Zellen, die beide Selektionsprozesse überleben, werden in die Peripherie entlassen, um dort aktiviert zu werden und ihre Effektor- bzw. Regulatorfunktion auszuführen [5]. Durch diese Selektionsprozesse entwickelt sich eine immunologische Toleranz gegenüber allgegenwärtigen Selbst-Antigenen. Die reife Lymphozytenpopulation wird demnach nur von einem kleinen Teil der ursprünglich im Thymus oder Knochenmark erzeugten Lymphozyten gebildet [6].

#### 1.2.4 Aktivierung der T-Lymphozyten

Die T-Zell Antwort auf eine Infektion kann in drei Teile gegliedert werden. Man unterscheidet die initiale Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten, die Entwicklung und Erhaltung eines immunologischen Gedächtnisses sowie die Reduktion und den Tod (Übersicht in Ref. [8]). Der Kontakt des TZR mit naiver T-Zellen mit einem Antigen, das an ein MHC-Molekül auf der Oberfläche einer APZ gebunden ist, führt mit Hilfe kostimulierender Signale zur Aktivierung von T-Zellen (Übersicht in Ref. [9]). Ein kostimulierendes Signal kann z.B. durch die Bindung von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), welche auf dendritischen Zellen und APZs induzierbar sind, an den CD28 Rezeptor auf naiven T-Zellen vermittelt werden (Übersicht in Ref. [10]). Die Integration der kostimulierenden Signale und die Anwesenheit bestimmter Zytokine wie z.B. IL-2, 4, 5, und IL-13 [11] triggern die Proliferation sowie die Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen [9]. Mit CD28 verwandte Proteine werden ebenfalls auf aktivierten T-Zellen induziert. Sie dienen der Veränderung kostimulatorischer Signale während der Entwicklung der T-Zellantwort. Eines dieser Proteine ist CTLA-4 (CD152), ebenfalls ein Rezeptor für B7 (CD80/CD86) Moleküle. CTLA-4 bindet mit höherer Affinität an CD80/CD86 als CD28 und vermittelt aktivierten T-Zellen ein inhibitorisches Signal [10]. Dies vermindert die Reaktionsfähigkeit aktivierter Tochterzellen auf die Stimulationssignale der APZs sowie die Sekretion des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2. Die Bindung von B7 Molekülen an CTLA-4

trägt entscheidend dazu bei, die Proliferation aktivierter T-Zellen als Reaktion auf Antigene und B7 zu begrenzen [9].

Es können verschiedene Subpopulationen von aktivierten T-Effektorzellen, die sogenannten T-Helferzellen, unterschieden werden [9].

#### 1.2.5 T-Helfer-Zell Differenzierung

Naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen ( $T_n$ ) besitzen die Fähigkeit, nach ihrer Aktivierung in  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, oder  $T_H17$ -Zellen zu differenzieren (Abb. 2). Sie entwickeln sich aus  $T_n$ -Zellen und können unter anderem anhand der von ihnen produzierten Zytokine typisiert werden.  $T_H1$ -Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort und kontrollieren intrazelluläre Pathogene. Die Differenzierung aus naiven CD4<sup>+</sup>T-Zellen erfolgt unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-12 und IFN $\gamma$  (Übersicht in Ref. [12, 13]). Die  $T_H1$ -Zellen selbst produzieren daraufhin IFN $\gamma$  Antigen-unabhängig und halten so die Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen aufrecht [12].  $T_H2$ -Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-4 und sind durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert. Die Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen hingegen wird durch IL-4 geblockt. IL-4 und IL-5 dienen der Aktivierung von B-Zellen und fördern deren IgE-Sekretion. Sie tragen ebenfalls zur Rekrutierung eosinophiler Zellen bei und unterstützen somit die humorale Immunantwort und die Abwehr parasitischer Infektionen [13]. Man geht davon aus, dass Dysregulationen der  $T_H2$ -Antwort bei der Entstehung von Krankheiten des atopischen Formenkreises eine Rolle spielen [13].

Zusätzlich zu den  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen konnte eine weitere Gruppe der T-Effektorzellen, die  $T_H17$ -Zellen, identifiziert werden.  $T_H17$ -Zellen zeichnen sich durch die Produktion und Freisetzung der Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-6 aus. Für die Entwicklung der  $T_H17$ -Zellen ist TGF- $\beta$  unentbehrlich. Nachdem ein Pathogen, das eine Entzündungsreaktion verursacht hat, eliminiert ist, sind diese Zellen in der Lage, die T-Effektorzell-Differenzierung zu beenden [12]. Welche Rolle genau die  $T_H17$ -Zellen in der Pathogenabwehr spielen, ist noch nicht vollständig geklärt [13]. Allerdings ist bekannt, dass sie ein hohes

proinflammatorisches Potenzial besitzen und bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten beteiligt sein können (Übersicht in Ref. [14]).

Nach der initialen Phase der T-Zell Aktivierung und Vermehrung sterben in der Reduktionsphase ca. 90-95% der aktivierten T-Zellen, die an der primären Immunabwehr und an der Beseitigung einer Infektion beteiligt waren, durch Apoptose (Übersicht in Ref. [15]). Dieses Phänomen wird als "activation induced cell death" bezeichnet (Übersicht in Ref. [16]). Die Apoptose der durch Antigene aktivierten T-Zellen ist ein wichtiger Vorgang, um die Ansammlung von Zytokin-produzierenden Zellen zu verhindern (Übersicht in Ref. [17]). Bei chronischen Entzündungen werden durch Antigene aktivierte T-Zellen oder autoreaktive T-Zellen nicht durch Apoptose eliminiert. Dies hat zur Folge, dass die induzierte Immunreaktion weiter unterhalten wird und somit Gewebeschäden verursachen kann [17-20]. Die Apoptose ist daher ein grundlegender Prozess zum Erhalt des Gleichgewichts zwischen Induktion und Beendigung einer Immunreaktion [21]. Sie wird durch ein intrazelluläres "Suizid-Programm" herbeigeführt, das z.B. durch CD95 (Fas) Moleküle initiiert werden kann. Kinder, deren Zellen nicht in der Lage sind Apoptosen zu induzieren, leiden an lymphoproliferativen Syndromen wie z.B. Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hypergammaglobulinämie und an Autoimmunerkrankungen [22-24]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen wie beispielsweise der atopischen Dermatitis ein Ungleichgewicht zwischen Aktivierung und Deaktivierung der T-Zellen besteht. Dies könnte u.a. durch eine Störung des CD95/CD95 Ligand-Systems und damit der Apoptoseinduktion verursacht sein.

#### 1.2.6 Entwicklung der T-Effektor-Gedächtniszellen und zentralen T-Gedächtniszellen

Folge der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Darunter versteht man die Fähigkeit des Immunsystems, auf schon bekannte Krankheitserreger schneller und effektiver zu reagieren [25, 26].

Dies beruht auf einer sich klonal vermehrenden Population antigenspezifischer Lymphozyten, den sog. T-Gedächtniszellen, die sich quantitativ und qualitativ von naiven T-Zellen und T-Effektorzellen ( $T_{\text{eff}}$ ) unterscheiden [27]. Eine stärkere Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von Gedächtniszellen und eine höhere Affinität des IL-2 Rezeptors oder des TZR sorgen dafür, dass Gedächtniszellen schneller [15] und bei geringerer Antigenexposition zu  $T_{\text{eff}}$  aktiviert werden können (Übersicht in Ref. [28]).

Hinsichtlich der Entwicklung von T-Gedächtniszellen ging man bislang davon aus, dass sich die T-Gedächtniszellen direkt aus  $T_{\text{eff}}$  entwickeln. Dieses sog. lineare oder „uniform potential“ Modell [29, 30] wurde von der Beobachtung gestützt, dass T-Gedächtniszellen unter besonderen Bedingungen direkt aus Zellen hervorgehen, die zuvor eine Effektorfunktion ausgeführt haben [28]. Nach der „straight-to-memory“ Theorie sind T-Gedächtniszellen in der Lage, sich direkt aus naiven T-Zellen zu entwickeln [31]. Bei letzterem Modell wird die Intensität und Dauer des antigenen Stimulus zur Generierung der  $T_{\text{eff}}$  und T-Gedächtniszellen berücksichtigt [32, 33].

Das Schicksal der reaktiven T-Zellen hängt von der Dauer der TZR-Wechselwirkung (z.B. dem Kontakt der T-Zelle mit APZs) und dem Einfluss von Zytokinen ab. Eine vergleichsweise kurze TZR-Wechselwirkung resultiert in der Entwicklung von zentralen T-Gedächtniszellen (central memory,  $T_{\text{CM}}$ ), während eine länger andauernde TZR-Wechselwirkung sowie der Einfluss von Zytokinen zur Entwicklung von  $T_{\text{eff}}$ -Gedächtniszellen ( $T_{\text{EM}}$ ) beitragen [26]. Die Population der T-Gedächtniszellen ist daher sehr heterogen und die Zellen können bezüglich ihres Phänotyps, der anatomischen Verteilung und ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden [34]. Anhand des Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) und von L-Selektin (CD62L) können  $T_{\text{CM}}$  und  $T_{\text{EM}}$  funktionell unterschieden werden [35, 36].  $T_{\text{CM}}$  exprimieren CCR7, halten sich vermehrt in den sekundären lymphatischen Organen auf und exprimieren verstärkt den  $CD62L^{\text{hi}}$  [8]. Sie besitzen weder unmittelbare Effektorfunktionen, wie die Fähigkeit zur IFN $\gamma$  Sekretion, noch zytotoxische Eigenschaften [14].  $CD4+T_{\text{CM}}$  sind jedoch in der Lage, nach wiederholtem Antigenkontakt, große Mengen IL-2 zu synthetisieren [32]. Nach der Bindung von IL-2 an den IL-2 Rezeptor der T-

Helferzellen wird einen komplexe Signalkaskade ausgelöst, die hauptsächlich autokrin auf die T<sub>H</sub>-Zellen selbst wirkt. Sie aktiviert die T<sub>H</sub>-Zellen und regt sie zur klonalen Teilung an. Neben der autokrinen Wirkung auf T<sub>H</sub>-Zellen hat IL-2 einen ähnlichen Effekt auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen [33]. T<sub>EM</sub> exprimieren CCR7 nicht und nur bedingt den CD62L [37]. Sie befinden sich im extralymphatischen Gewebe und können sehr schnell erneut Effektorfunktionen ausführen [14]. Sowohl T<sub>CM</sub> als auch T<sub>EM</sub> sind CD45RA negativ, was für Gedächtniszellen charakteristisch ist (Tab. 1) (Übersicht in Ref. [38]) .

CD4+T-Zellen	T <sub>CM</sub>	T <sub>EM</sub>
	CD45RA- CD62L <sup>hi</sup> CCR7+	CD45RA- CD62L <sup>hi/lo</sup> CCR7-

**Tab. 1:** Phänotypische Einteilung der CD4+ T-Gedächtniszellen. Zentrale T-Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>) exprimieren CCR7, CD62L in sehr hohem Maß und kein CD45RA. T-Effektor-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) exprimieren weder CCR7 noch CD45RA. Sie können den CD62L in unterschiedlichem Maße exprimieren.

### 1.2.7 Die regulatorischen T-Lymphozyten

Die Existenz einer T-Zell Subpopulation, die auf die Suppression der Immunantwort abzielt, wurde erstmals um 1970 beschrieben. Da die zellulären und molekularen Mechanismen, welche für die Suppressorfunktion verantwortlich sind, nicht eindeutig charakterisiert werden konnten, verlor man das Interesse an den Suppressorzellen [39, 40]. Doch um 1990 erlebten die T-Suppressorzellen eine Renaissance und wurden als regulatorische T-Zellen wiedergeboren. Sie besitzen die Fähigkeit, inadäquate Immunreaktionen auf ein Fremd- oder Selbst-Antigen zu verhindern und somit die periphere Immuntoleranz zu gewährleisten (Übersicht in Ref. [41]).

### 1.2.8 Kontrolle der T-Effektorzell abhängigen Immunreaktion durch regulatorische T-Lymphozyten

Die Reaktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf ein Pathogen beruht, wie bereits beschrieben, auf der Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T-Effektorzellen. Eine weitere, spezialisierte Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist in der Lage, destruktive Immunreaktionen zu kontrollieren und Immunreaktionen gegen harmlose Kommensalen sowie die Entwicklung selbstreaktiver T-Zellen zu verhindern. Diese regulatorischen T-Zellen (Tregs) haben die Aufgabe, die periphere Immuntoleranz aufrecht zu erhalten [42-44]. Tregs können in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Tregs, die im Thymus reifen, werden als natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (nTregs) bezeichnet und unterscheiden sich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> adaptiven Tregs (aTregs) die in der Peripherie durch Antigenkontakt induziert werden (Übersicht in Ref. [45]). Eine weitere Gruppe bilden die IL-10 produzierenden Tregs, die Tr1-Zellen (Übersicht in Ref. [42]). Des Weiteren wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Tregs beschrieben, die in ihrer Funktion den nTregs sehr ähnlich sind, sich aber aus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen entwickeln [46-49].

### 1.2.9 Phänotyp und Eigenschaften humaner, regulatorischer T-Lymphozyten

Natürlich vorkommende Tregs bilden ca. 5-10% der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zell Population im peripheren Blut [43, 45]. Sie exprimieren neben der hochaffinen  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), CTLA-4, den Rezeptor für den Glukokortikoid-induzierten Tumor-Nekrose Faktor (GITR) und HLA-DR. Tregs exprimieren die  $\alpha$ -Kette des IL-7 Rezeptors (CD127) nur in geringem Maße, was die Unterscheidung von aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>eff</sub> ermöglicht (Übersicht in Ref. [50]). Wie auch bei anderen Tregs sind die proliferativen Eigenschaften der nTregs nach Stimulation über den TZR *in vitro* sehr gering. Sie produzieren keine Zytokine und sind gegenüber Apoptose widerstandsfähiger als andere Zellen. Die Expression von CCR7, CCR6 und CD103 ermöglicht ihnen gezielte

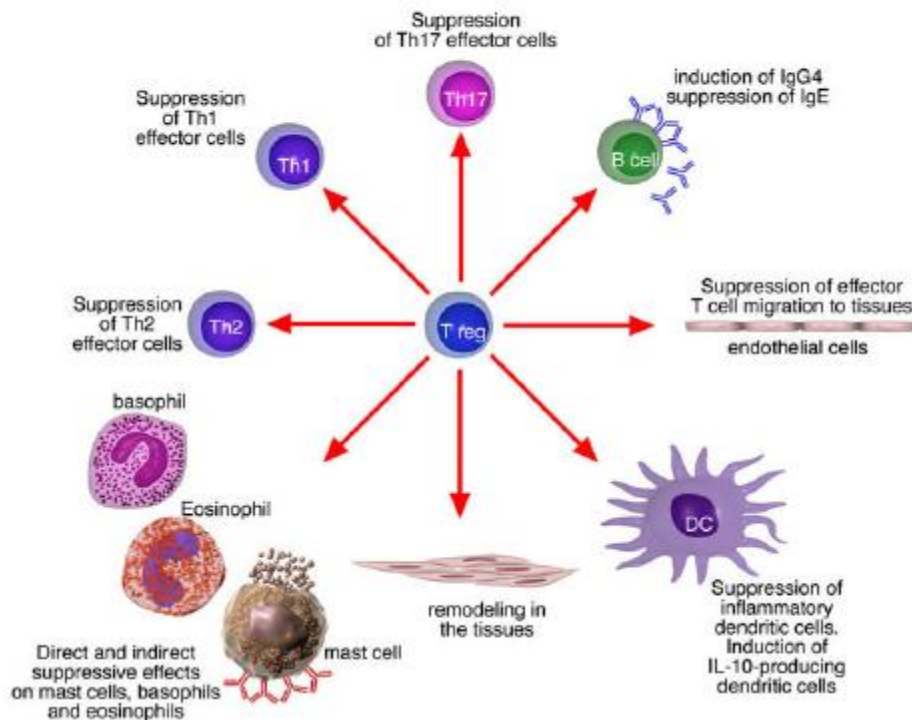


Chemotaxis zu inflammatorischen Herden [51]. Nach Aktivierung über den TZR supprimieren nTregs die Transkription von IL-2 mRNA sowie die Proliferation von CD4+ und CD8+ T<sub>eff</sub>. Der genaue Suppressionsmechanismus ist bisher allerdings noch unbekannt.

Man geht aber davon aus, dass die Suppression zellkontaktabhängig vermittelt wird [52]. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass lösliche Faktoren, wie z.B. TGF- $\beta$ , suppressive Funktionen ausführen können [52, 53]. CTLA-4 übermittelt ein intrazelluläres, inhibitorisches Signal und wurde bisher mit den suppressiven Fähigkeiten der Tregs in Verbindung gebracht. Allerdings vermittelt CTLA-4 die Suppressorfunktion der nTregs nicht direkt [44]. In einem CTLA-4 Knockout-Model waren Tregs, trotz des Auftretens schwerer Autoimmunerkrankungen in der Lage, ihre suppressiven Fähigkeiten auszuführen [44].

In humanen nTregs wurde das Granzym A identifiziert. Dies löst in den Zielzellen die Granzym/Perforin Reaktionskette aus, die zur Lyse der Zelle führt [44, 54]. Zusätzlich wird das Ectoenzym CD39, das ATP zu AMP degradiert, auf der Zelloberfläche humaner Tregs exprimiert [55]. Des Weiteren führt die Blockade von Galectin, einem Protein, das auf aktivierten Tregs von Mäusen und Menschen hochreguliert wird, zum Verlust der suppressiven Eigenschaften [56]. Natürlich vorkommende Tregs sind nicht nur in der Lage T<sub>eff</sub> zu supprimieren, sondern können auch die Entwicklung dendritischer Zellen sowie die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen [52] beeinflussen.

Unabhängig von dem zugrundeliegenden Suppressionsmechanismus ist IL-2 für die Suppressionsfähigkeit der nTregs sowie ein TZR-vermitteltes Signal unabdingbar. IL-2 spielt nicht nur eine große Rolle als Wachstumsfaktor für Tregs sondern ist auch essentiell für die Erhaltung und Funktion der Tregs *in vivo*. Tregs sind nicht in der Lage, IL-2 selbst zu sezernieren. Deshalb ist es für die Funktionserhaltung von Tregs überaus wichtig, dass IL-2 an deren Wirkungsort von T<sub>eff</sub> bereitgestellt wird (Abb. 2) [57].



**Abb. 2:** CD4+CD25+FoxP3+ und Tr1-Zellen tragen zur Kontrolle allergenspezifischer Immunantworten auf verschiedenen Wegen bei. Sie sind an der Suppression dendritischer Zellen, welche die Entwicklung von T-Effektorzellen unterstützen, beteiligt sowie an der Suppression von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. Des Weiteren tragen sie zur Suppression der allergenspezifischen Produktion von IgE durch Mastzellen bei [58].

### 1.2.10 Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in regulatorischen T-Lymphozyten

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die als Hauptregulatoren die Entwicklung und Funktion einer Zelle bestimmen. Diese können von verschiedenen extrazellulären Mediatoren und intrazytoplasmatischen Molekülen beeinflusst werden und so über positive oder negative Signale die Entwicklung des Genoms verändern [57].

FoxP3 ist der Haupttranskriptionsfaktor in der Entwicklung von Tregs. Er gehört zu den helixförmigen Transkriptionsfaktoren und wird sowohl von nTregs als auch von CD4+CD25<sup>hi</sup> Tregs in hohem Maße exprimiert [59, 60]. Beim Menschen werden zwei verschiedene Splice-Varianten exprimiert, wobei beide Varianten die Fähigkeit besitzen, die Anergie der CD4+ T-Zellen herzustellen [60]. Ein weiterer Unterschied zu murinen T-Zellen besteht darin, dass bei humanen T-Zellen die Expression von FoxP3 in aktivierten CD4+CD25- T-

Zellen hochreguliert wird, so dass auch CD4+CD25-FoxP3+ T-Zellen existieren, die allerdings nicht in der Lage sind Suppressorfunktionen auszuführen (Übersicht in Ref. [61]). Der Defekt des *FOXP3* Gens bei Mäusen führt zum Verlust des FoxP3 Proteins in nTregs und damit zum Verlust ihrer Suppressorfunktion. Dies hat die Entwicklung verschiedener organspezifischer Autoimmunpathologien zur Folge, die wiederum auf der Basis einer CD4 Überaktivierung entstehen [62, 63]. Depletiert man nTregs in Mäusen, nehmen diese Mäuse einen Scurfy-Phänotyp an. Scurfy Mäuse sind durch eine Mutation des *FOXP3* Gens charakterisiert. Dieser, mit dem X-Chromosom assoziierte, Defekt führt in hemizygoten männlichen Mäusen innerhalb von 16-25 Tagen nach der Geburt zum Tod. Diese Mäuse sind durch eine verstärkte Proliferation von CD4+ T-Lymphozyten, extensive Infiltration multipler Organe, sowie dem Anstieg des Serumgehalts zahlreicher Zytokine gekennzeichnet. Die isolierte Infusion von CD4+CD25+ nTregs in FoxP3 defiziente oder Scurfy-Mäuse verhindert andererseits die Manifestation des fatalen Scurfy-Syndroms [64, 65]. Ein Mangel an FoxP3 resultiert bei Menschen in einem fehlgesteuerten Immunsystem, Polyendokrinopathien und Enteropathien, dem sog. IPEX-Syndrom. Patienten, die am IPEX-Syndrom leiden, entwickeln im Kindesalter Diabetes mellitus Typ1, Reizdarm-Syndrom, Allergien, atopische Dermatitis, eine Überproduktion von IgE, viele hämatologische Erkrankungen sowie Infektionserkrankungen [62, 63]. Tregs sind daher ein vielversprechender Angriffspunkt zur Erforschung der Immunpathogenese von Allergien und Autoimmunerkrankungen.

#### 1.2.11 Verhältnis zwischen dem Aktivierungsmarker CD45RO und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in regulatorischen T-Lymphozyten

Nach abgeschlossenem, positiven Selektionsprozess im Thymus exprimieren T-Zellen CD45RO, konvertieren aber bei deren Entlassung in die Peripherie zu CD45RA+ T-Zellen [66]. Die Zellen, die auf ein geeignetes MHC-Peptid in der Peripherie treffen, exprimieren weiterhin CTLA-4 und wandeln sich zu

CD45RO<sup>+</sup> Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, um [66]. Die Zellen, die auf kein geeignetes MHC-Peptid treffen, kehren in den Ruhezustand zurück und unterscheiden sich von naiven T-Zellen nur in der Expression von CD25 und der Herunterregulation von CD4. Seddiki et al. beschrieben, dass CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen im Thymus, im Nabelschnurblut und im peripheren Blut von Erwachsenen als Teil der regulatorischen T-Zell Subpopulation angesehen werden können [66]. Die Messung der *FOXP3* mRNA in den Subpopulationen CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>/RO<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup> aus Nabelschnurblut und dem Blut erwachsener Probanden, ergab eine 500 Mal höhere Expression von *FOXP3*, als in naiven Zellen. CD25<sup>lo</sup> und CD25<sup>int</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut und aus dem Blut erwachsener Probanden exprimieren 10-30 Mal mehr *FOXP3* mRNA als naive CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen [66]. Das *FOXP3* Signal in den verschiedenen Populationen könnte allerdings auch von einer Kontamination mit Tregs herrühren oder aber die echte Expression durch konventionelle antigenerfahrene T-Zellen widerspiegeln. Diesbezüglich wurde bereits in mehreren Publikationen übereinstimmend von *in vitro* aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen berichtet, die ebenfalls FoxP3 exprimieren [67-69]. Seddiki et al. zeigten weiterhin, dass die Anzahl der Tregs in der Population der naiven Zellen und der Gedächtniszellen bei gesunden Erwachsenen sehr stark variiert. Diese Schwankungen können, vor allem bei naiven CD45RA<sup>+</sup> Zellen, vom Alter des Probanden abhängig sein, sind aber nicht einfach auf eine verminderte Produktion der Zellen im Thymus zurückzuführen [66, 70]. Ein geringeres Vorkommen von Tregs in der Population der CD4<sup>+</sup> Zellen könnte nicht nur durch eine verminderte Produktion im Thymus sondern auch durch eine geringere Lebenserwartung der Tregs im peripheren Blut bedingt sein. Deshalb ist es wichtig zu untersuchen, ob die Anzahl der naiven Tregs bei Patienten mit immuninflammatorischen und Autoimmunerkrankungen, die durch eine inadäquate Thymusfunktion gekennzeichnet sind, ebenfalls herabgesetzt sind [71-73].

## 1.3 Die Hypersensitivitätsreaktionen

### 1.3.1 Der allergische Formenkreis

Ursprünglich wurde die Allergie als eine Reaktion des Körpers auf eine unbekannt Substanz beschrieben (Überblick in Ref. [74]). Heute wird die Allergie als Krankheit bezeichnet, deren Ursache in einer überschießenden Reaktion des Immunsystems auf eigentlich harmlose Antigene im Sinne einer Hypersensibilitätsreaktion liegt [74]. Eine solche Überempfindlichkeitsreaktion kann Gewebeschäden und schwere Erkrankungen bedingen. Nach Coombs und Gell werden Hypersensitivitätsreaktionen in vier Klassen eingeteilt (Tab. 2), die sich hinsichtlich der beteiligten Antigene und Antikörperklassen unterscheiden [74]. Typ I Hypersensibilitätsreaktionen beruhen auf der Sekretion von IgE, das seinerseits die Aktivierung von Mastzellen auslöst, wie z.B. bei der atopischen Dermatitis, der allergischen Rhinitis, dem allergischen Asthma und der systemischen Anaphylaxie. Für die Typen II und III dagegen ist IgG verantwortlich. IgG löst, je nachdem welche IgG-Subklasse involviert ist und je nach den Eigenschaften des Antigens, Immunreaktionen unterschiedlichen Schweregrads aus [74]. Die durch IgG verursachte Immunreaktion wird entweder durch den Fc-Rezeptor oder durch phagozytische Effektormechanismen vermittelt. Typ II Reaktionen richten sich hauptsächlich gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene und führen zu Zellspezifischen Gewebeschäden, wie es z.B. bei verschiedenen Medikamentenallergien der Fall ist. Hierbei ist das auf der Zelloberfläche gebundene Arzneimittel Angriffsziel der IgG-Antikörper, was letztendlich zu einer Zerstörung der Zelle führt [74]. Typ III Reaktionen richten sich gegen lösliche Antigene, wie z.B. bei der Serumkrankheit oder Arthus-Reaktion. Ursache der auftretenden Symptome ist die Ablagerung von zirkulierenden Antigen: Antikörper-Aggregaten oder Immunkomplexen. Immunkomplexe treten bei jeder Antikörperreaktion auf, unterscheiden sich aber in Größe, Menge, Affinität und beteiligtem Isotyp des jeweiligen Antikörpers [74]. Kleine Aggregate können sich in den Gefäßwänden ablagern und dort zu schwerwiegenden Schädigungen des Gewebes führen. Typ IV Reaktionen werden nicht Antikörper sondern T-Zell vermittelt. Die

Gewebeschädigung wird hier entweder durch die Aktivierung von Makrophagen durch T<sub>H</sub>1-Zellen verursacht, was zu einer Entzündungsreaktion führt (z.B. Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion) oder es sind T<sub>H</sub>2-Zellen beteiligt, wobei eosinophile Zellen vorherrschend sind (z.B. chronisches Asthma, chronische allergische Rhinitis). Bei T<sub>H</sub>2-Zell-Beteiligung werden die Schäden direkt von zytotoxischen T-Zellen verursacht wie z.B. bei Kontaktdermatitis.

Antikörper-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion			Zell-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion
Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
IgE-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp	Humorale, zytotoxische Immunantwort	Immun-Komplex vermittelte Immunantwort	T-Zell vermittelte Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ
Allergische Rhinitis, Asthma bronchiale	Medikamenten-induzierte Zytopenie	Immunkomplex-Vaskulitis, Exogen-allergische Alveolitis	Kontaktallergie, Medikament-induziertes Exanthem

Tab. 2: Nach Coombs und Gell werden die Hypersensitivitätsreaktionen in vier Typen eingeteilt [74].

### 1.3.2 Die Atopie

In der westlichen Welt neigen 40% der Bevölkerung dazu, auf eine Vielzahl von Umweltantigenen wie z.B. Gräserpollen und Hausstaubmilben, mit übertrieben starken IgE-Antworten, sog. Hypersensitivitätsreaktionen des Typ I, zu reagieren. Diese Veranlagung wird als Atopie bezeichnet. Ihr Ursprung wird durch mehrere Genloci beeinflusst. Bei Menschen mit atopischer Prädisposition findet man einen höheren IgE-Gesamtspiegel und höhere Zahlen eosinophiler Zellen im Blut [75]. Veränderungen auf den Genloci, die für IL-3, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 und GM-CSF kodieren können für die Entwicklung der Atopie mitverantwortlich sein. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle beim IgE-Isotypwechsel, für das Überleben von eosinophilen Granulozyten, für die Vermehrung von Mastzellen und bei der Aufrechterhaltung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort (Übersicht in Ref. [76]).

Atopische Erkrankungen manifestieren sich meist schon im Säuglings- und Kleinkindalter und stellen somit den Beginn des „Atopischen Marsches“ dar.

Dieser ist gekennzeichnet durch den altersabhängigen Übergang der atopischen Dermatitis in die allergische Rhinokonjunktivitis in der Adoleszenz und das allergische Asthma im Erwachsenenalter [77].

### 1.3.3 Definition der atopischen Dermatitis

Die atopische Dermatitis hat eine Vielzahl von Bezeichnungen, wie z.B. atopisches Ekzem, Neurodermitis oder endogenes Ekzem. Sie ist eine häufige, durch sehr starken Juckreiz charakterisierte Hauterkrankung, die zumeist bei Kindern und jungen Erwachsenen, oft chronisch oder chronisch-rezidivierend, auftritt. Neben der atopischen Disposition stellen eine gestörte Immunregulation, vegetative Dysregulation, trockene Haut und erhöhte IgE-Bildung die wesentlichen pathophysiologischen Faktoren dar. Außerdem spielen Allergien auf Nahrungsmittel, Aeroallergene und psychosomatische Faktoren eine entscheidende Rolle (Übersicht in Ref. [78]).

#### 1.3.3.1 Epidemiologie der atopischen Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, die vor allem Kinder der westlichen Industrienationen betrifft. Die Zahl der erkrankten Kinder ist seit 1960 von 3% auf 10-20% gestiegen [78-80]. Die Erstdiagnose der atopischen Dermatitis wird in den ersten sechs Lebensmonaten bei 45% der betroffenen Kinder gestellt, bei 60% während des ersten Lebensjahrs und bei 85% innerhalb der ersten fünf Lebensjahre [81]. Die Prävalenz der AD unter US-amerikanischen Kindern ist (17,2%) mit der unter europäischen (15,6%) und japanischen Kindern (24%) vergleichbar [78]. Es wird ein gehäuftes Auftreten der AD in städtischen verglichen mit ländlichen Gebieten beobachtet sowie bei Familien mit gehobenem sozioökonomischem Status [78].

### 1.3.3.2 Auswirkungen der atopischen Dermatitis auf die Lebensqualität Betroffener

Studien zufolge ist die Lebensqualität von Patienten mit atopischer Dermatitis stärker eingeschränkt als die von Patienten, die an anderen chronischen Hauterkrankungen wie z.B. Psoriasis leiden [82]. Neben der Einschränkung der Lebensqualität spielt auch die starke psychische Belastung eine große Rolle [82]. Eine australische Studie belegte, dass die psychische Belastung der Familien mit Kindern, die an atopischer Dermatitis erkrankt sind, um ein Vielfaches höher ist als bei Familien mit Kindern, die an insulinpflichtigem Diabetes mellitus leiden [79, 83]. Sowohl bei Kindern als auch Eltern, sorgt außerdem ein großes Schlafdefizit für eine höhere Morbidität [84]. Aufgrund der Schlafstörungen, die meist auf den starken Juckreiz der Hautläsionen zurückzuführen sind, beobachtet man bei betroffenen Kindern tagsüber deutliche Verhaltensauffälligkeiten [85]. Nicht selten treten emotionale Störungen wie Heulanfälle, Trennungsängste, Hyperaktivität und Konzentrationsstörungen auf [86]. Letztere werden oft fälschlicherweise als Lernbehinderung und nicht als Folge eines Schlafdefizits gedeutet. Dies beeinflusst die schulische Karriere der erkrankten Kinder schwerwiegend [87, 88]. Des Weiteren ist es für die Eltern der betroffenen Kinder aus pflegerischen Gründen außerordentlich schwer in ein Arbeitsverhältnis einzutreten, nicht nur wegen der problematischen Unterbringung ihrer Kinder in Kindertagesstätten, sondern auch aufgrund der sehr geringen sozialen Unterstützung [89]. Die Eltern machen sich oft selbst große Vorwürfe, dass sie wegen ihrer eigenen atopischen Prädisposition für die Krankheit ihrer Kinder verantwortlich seien. Dies und das Fehlen adäquater Medikamente für die Behandlung der atopischen Dermatitis macht sie zu einer Erkrankung, die für die gesamte Familie eine sehr hohe physische und psychische Belastung darstellt [85].



### 1.3.3.3 Klinische Erscheinungsbilder der atopischen Dermatitis und deren Klassifikation

Die AD manifestiert sich zunächst als Milchschorf im Säuglingsalter. Davon sind vor allem das Gesicht und die Streckseiten der Extremitäten betroffen, später die großen Beugen, Handgelenke und der Hals [78]. Um die Diagnose „atopische Dermatitis“ stellen zu können, müssen mindestens drei der in Tabelle drei aufgeführten Hauptkriterien und mindestens drei der Nebenkriterien erfüllt sein [78]. Um den Schweregrad der Erkrankung sowie deren Progression oder Therapiechancen, beurteilen zu können, wird der standardisierte „Eczema area and severity index“ angewendet. Dieser Index bezieht die befallenen Körperregionen und den Schweregrad der Erkrankung mit ein. Der Körper wird in Kopf und Hals, obere Extremitäten, Stamm und untere Extremitäten eingeteilt, die zu verschiedenen prozentualen Anteilen in die Bewertung eingehen. Des Weiteren werden der Schweregrad (mild, mäßig, schwerwiegend) und die Art der aufgetretenen Läsionen (Erythem, Blasenbildung, Exkoration, Lichenifikation) beurteilt [90]. Um einen schnellen Überblick über den aktuellen Schweregrad der atopischen Dermatitis zu erlangen, kann der „Investigator’s Global Assessment“, ein weiteres Beurteilungssystem, herangezogen werden. Mit Hilfe dieses Systems wird auf einer Skala von 0 bis 5 der Schweregrad von "momentan beschwerdefrei" bis "sehr schwere Läsionen" eingeteilt [91].

Hauptkriterien	Nebenkriterien
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausgeprägter Juckreiz</li> <li>• Hautläsionen typischer Morphologie und Verteilung</li> <li>• Bei Kindern: Befall von Gesicht und Streckseiten der Extremitäten</li> <li>• Bei Erwachsenen: Befall der großen Beugen</li> <li>• Lichenifikation</li> <li>• Chronische Dermatitis</li> <li>• Positive Eigen- und Familienanamnese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trockenheit der Haut</li> <li>• Ichthyose</li> <li>• Palmare Hyperlinearität</li> <li>• Keratosis pilaris</li> <li>• Positiver Prick- oder Intrakutantest</li> <li>• Erhöhte Serum-IgE-Spiegel</li> <li>• Frühkindlicher Krankheitsbeginn</li> <li>• Prädisposition gegenüber bakteriellen und viralen Hautinfektionen</li> <li>• Dermatitis der Hände und Füße</li> <li>• Infraorbitale Faltenbildung</li> <li>• Okuläre Hyperpigmentierung</li> <li>• Gesichtsblässe</li> <li>• Nahrungsmittelunverträglichkeit</li> <li>• Weißer Dermographismus</li> <li>• Beeinflussbarkeit durch Umweltfaktoren und psychische Belastung</li> </ul>

Tab. 3: Um die Diagnose Atopische Dermatitis erheben zu können müssen nach Hanifin mindestens drei der Hauptkriterien und mindestens drei Nebenkriterien erfüllt sein [78].

#### 1.3.3.4 Prognose zum Verlauf der atopischen Dermatitis bei Kindern

Eine Langzeitstudie an 100 Kindern über einen Zeitraum von 22 Jahren zeigte, dass die Prävalenz der atopischen Dermatitis im ersten Jahr mit 20% am höchsten war und am Ende der Studie nur noch 5% betrug. Während dieser Zeit stieg die Prävalenz der allergischen Rhinitis von 3% auf 15% an. Der Anteil der Patienten, die an Atembeschwerden litten, stieg von 5% im ersten Jahr auf 60% im letzten Studienjahr an [92, 93]. Eine weitere Studie über acht Jahre untersuchte 94 Kinder, die an AD litten. Die Symptome der AD besserten sich bei 84 von 92 Kindern. Bei 43% der Patienten entwickelte sich während der acht Jahre Asthma bronchiale und bei 45% eine allergische Rhinitis [94]. Nur Kinder mit der mildesten Form der AD entwickelten weder allergische Rhinitis noch allergisches Asthma. Der Schweregrad der atopischen Dermatitis kann somit als Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma bronchiale betrachtet werden. Unter den Kindern mit schwerer AD entwickelten 70% Asthma bronchiale. Von den Kindern mit einer milden Form der AD waren nur 30% betroffen [78]. Wie mehrere Studien belegten, werden die meisten Patienten mit

AD im Laufe der Jahre symptomfrei, haben aber eine ungünstige Prognose hinsichtlich der Entwicklung von Asthma bronchiale (Übersicht in Ref. [95]).

#### 1.3.3.5 Therapieoptionen bei atopischer Dermatitis

Da keine kurative Therapie der AD bekannt ist, beschränkt sich die Behandlung auf die Prävention von Hautinfektionen, das Vermeiden von Triggern und die medikamentöse Intervention im akuten Schub. Basis-Hautpflege bei Patienten mit AD beinhaltet ausgiebige Hydrierung sowie den Gebrauch von Emollientien, um das Austrocknen der Haut zu vermeiden. Außerdem sollten irritierende und provozierende Allergene vermieden werden (Übersicht in Ref. [96]). Starker Juckreiz wird mit topischer Applikation von Steroiden und Calcineurin-Inhibitoren behandelt [96]. Im akuten Schub können Patienten von der Verabreichung systemischer Kortikosteroide profitieren, der Langzeitgebrauch und die Verabreichung an Kinder sollten jedoch aufgrund gravierender Nebenwirkungen vermieden werden. Eine effektive Alternative zur Verabreichung von systemischen Kortikosteroiden stellt die systemische Applikation des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A dar. Auch hier sollte wegen evtl. auftretender Nebenwirkungen das Ziel sein, die Dosis so gering wie möglich zu halten und die Behandlung nur so lange wie nötig durchzuführen [96]. Eine weitere Möglichkeit bietet die Anwendung von Azathioprin, dessen immunsuppressiver Effekt bei der Behandlung der AD gezeigt werden konnte. Hier können allerdings auch schwerwiegende Nebenwirkungen wie z.B. Myelosuppression, Hepatotoxizität, gastrointestinale Störungen sowie ein erhöhtes Infektionsrisiko auftreten. Deshalb sollte die Indikation sehr streng gestellt werden. Phototherapie als Second-Line Behandlung sollte erst bei Kindern ab dem 12. Lebensjahr und bei Erwachsenen zur Behandlung der AD eingesetzt werden [95]. Folglich ist vor allem die Behandlung der kindlichen AD höchst problematisch.

## 1.4 Pathogenese allergischer Erkrankungen

Das grundlegende Ereignis für die Entwicklung einer allergischen Erkrankung ist die Generierung einer allergenspezifischen CD4+ T<sub>H</sub>-Zelle (Übersicht in Ref. [97]). Diese T<sub>H</sub>2-Effektorzellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 und vermitteln somit sowohl Effektor- als auch regulatorische Funktionen. Dazu gehört die Induktion der Produktion von allergenspezifischem IgE durch B-Zellen sowie die Entwicklung und Rekrutierung von eosinophilen Zellen [97]. Im Gegensatz dazu sind die T<sub>H</sub>1-Zellen in der Lage, durch Allergien verursachte Entzündungsreaktionen einzudämmen [76].

Neben T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Effektorzellen spielen aber auch die natürlich vorkommenden nTregs sowie die induzierbaren Tr1-Zellen mit ihren suppressiven Eigenschaften, eine wichtige Rolle. Diese Zellen sind in der Lage, die allergiebedingte T<sub>H</sub>2-Antwort zu supprimieren (Übersicht in Ref. [98]). Neben ihrer Fähigkeit die T<sub>H</sub>2-Antwort zu unterdrücken, können Tregs auch den Immunglobulin Klassen-Wechsel zu IgE verhindern. Daher geht man davon aus, dass eine Fehlfunktion der Tregs in der Entwicklung der atopischer Erkrankungen und von Allergien eine entscheidende Rolle spielt (Übersicht in Ref. [99]).

### 1.4.1 Pathogenese der atopischen Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung [95], multifaktorieller Genese. Eine grundlegende Voraussetzung ist die genetische Prädisposition. Die AD sowie die allergische Sensibilisierung konnten mit einer Region auf Chromosom 3q21 in Verbindung gebracht werden [100]. Zudem wurden 4 weitere Phänotypen sowie 11 Genloci identifiziert, die mit der Diagnose AD, dem spezifischen IgE sowie mit dem Schweregrad der AD assoziiert werden können [101]. Neben der genetischen Prädisposition ist aber auch der Einfluss von Umweltfaktoren bei der Entwicklung von Allergien und der atopischen Dermatitis von großer Bedeutung (Übersicht in Ref. [102]). Die ansteigende Prävalenz von Allergien in den westlichen Nationen wird vor allem

auf die veränderten Lebensweise zurückgeführt. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass der hohe Hygienestandard und geringere Kontakt von Kindern mit mikrobiellen Agentien während der frühkindlichen Entwicklung ein wesentlicher Faktor ist, der die Prävalenz und den Schweregrad der atopischen Dermatitis begünstigt [102]. Diese sog. Hygiene-Hypothese besagt, dass die Verlagerung der allergenspezifischen Immunantwort vom  $T_H2$ -Phänotyp zum  $T_H1$ -Phänotyp aufgrund der geringeren Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten in der frühen Kindheit ausbleibt [102] und somit die Entwicklung der Allergien begünstigt. Weitere Faktoren, welche die Entwicklung der atopischen Dermatitis beeinflussen, sind eine defekte Barrierefunktion der Haut sowie die immunologische Reaktion mit der Aktivierung von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und eosinophilen Zellen [102].

#### 1.4.2 Die Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen und der atopischen Dermatitis

Da Tregs die Fähigkeit zugeschrieben wird, allergiebedingte  $T_H2$ -Antworten erfolgreich zu supprimieren, besteht die Möglichkeit, dass ein Mangel oder eine Fehlfunktion der Tregs ursächlich für die Entwicklung allergischer Erkrankungen ist [98]. Initiale Untersuchungen konnten keinen Unterschied zwischen der suppressiven Kapazität von Tregs atopischer und nicht-atopischer Probanden feststellen [103, 104]. Folgestudien hingegen zeigten, dass die suppressiven Fähigkeiten von Tregs atopischer Patienten, die an schwerer allergischer Rhinitis litten, deutlich geringer waren als die des nicht-atopischen Kontrollkollektivs [75]. In dieser Studie wurden Tregs der Probanden mit deren  $CD4+CD25^-$  T-Zellen, die zuvor durch ein Allergen stimuliert worden waren, kokultiviert, um dann deren suppressives Potential als Funktion der Proliferation der  $CD4+CD25^-$  T-Zellen zu bewerten [75]. Diese Studie zeigte beispielhaft, dass Tregs grundsätzlich in der Lage sind, durch Allergen-aktivierte  $CD4+CD25^-$  T-Zellen zu unterdrücken und gibt Grund zur Annahme, dass diese Funktion bei Tregs atopischer Patienten fehlgesteuert ist [98]. Wie bereits beschrieben spielen regulatorische T-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit, die T-

Zellantwort zu kontrollieren, eine ausschlaggebende Rolle bei der Immunregulation. Welche Aufgabe Tregs bei der Pathogenese der AD besitzen, ist allerdings noch ungeklärt [105, 106].

## 1.5 Fragestellung

Die atopische Dermatitis ist eine immer häufiger, vor allem bei Kindern in den westlichen Industrienationen, vorkommende, chronisch-entzündliche Hauterkrankung des allergischen Formenkreises, der wahrscheinlich eine fehlgesteuerte Immunreaktion zu Grunde liegt. Immunreaktionen sind komplexe, physiologische Vorgänge, die strengen Regulationen unterliegen und sich bereits in der Kindheit ausprägen. Fehlgesteuerte Immunreaktionen können die Ursache von Allergien und Atopien sein. Die atopische Dermatitis entsteht meist in der frühen Kindheit, in der die regulatorischen T-Zellen möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems nehmen. Im Folgenden wurden Tregs von Kindern und Jugendlichen, die schon seit dem Säuglingsalter an der schwerwiegendsten Form atopischer Dermatitis leiden und einer gesunden Kontrollgruppe bezüglich verschiedener Eigenschaften vergleichend untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob Unterschiede in der Frequenz der regulatorischen T-Zellen bei Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis und der Kontrollgruppe bestehen und inwiefern sich die funktionellen Eigenschaften der Tregs innerhalb der Kollektive *in vitro* unterscheiden. Es wurde zudem untersucht, ob Unterschiede in der Expression der Schlüssel-Oberflächenmoleküle der Tregs, CD25 und CD127 sowie des Transkriptionsfaktors FoxP3 vorliegen. Abschließend erfolgte die vergleichende Untersuchung der Aktivierungsmarker CD45RA/CD45RO und CCR7 sowie des Todesrezeptors CD95.





## 2.4 Gebrauchsfertige Kits

### 2.4.1 Gebrauchsfertige Kits zur Zellaufreinigung

CD4+ T-Zell Isolations Kit II	Milteny Biotec
CD4+CD25+ T-Zell Isolations Kit	Milteny Biotec

### 2.4.2 Gebrauchsfertige Kits zur intrazellulären Färbung

PE anti-human FoxP3 Staining Set	eBioscience
----------------------------------	-------------

## 2.5 Säulen zur Zellaufreinigung

LS Separationssäule	Milteny Biotec
LD Separationssäule	Milteny Biotec
MS Separationssäule	Milteny Biotec

## 2.6 Feinchemikalien

Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester Invitrogen

## 2.7 Seren

Fetales Kälberserum	Invitrogen
AB Serum	Arbeitskreis Wiley (Nepean Hospital Penrith, Austraia)

## 2.8 Puffer und Medien

### PBS 10x:

0,37 g	KCl
1,34 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,35 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O
8,00 g	NaCl

Gebrauchslösung: PBS 10x + H<sub>2</sub>O (1:9)

PBS pH 7,4 gebrauchsfertiges Pulver	Sigma-Aldrich
-------------------------------------	---------------

### RPMI<sup>+</sup> 500 ml

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin GIBCO, Invitrogen

supplementiert mit:

100 U/ml Penicillin GIBCO, Invitrogen

100 µl/ml Streptomycin GIBCO, Invitrogen

FCS ( 5% oder 10%) GIBCO, Invitrogen

### FACS Puffer 1l

998 ml PBS

1 ml NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) 2%

1 ml FCS (30 min bei 65°C hitzeinaktiviert)

### Lysepuffer

FACS Lysing Solution 10x Concentrate BD, PharMingen

Gebrauchslösung: FACS Lysing Solution 10x + H<sub>2</sub>O (1:9)

### Paraformaldehyd 2%

2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS durch Erhitzen auf 70°C unter dem Abzug auflösen.

## 2.9 Gebrauchsfertige Lösungen

Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS

Amersham, Bioscience

### **3. Methoden**

#### **3.1 Probanden- und Kontrollkollektiv**

Das Patientenkollektiv, das in dieser Studie untersucht wurde, setzte sich aus Kindern und Jugendlichen zusammen, die drei bis 16 Jahre alt waren und seit ihrem frühen Säuglingsalter an schwerster atopischer Dermatitis litten. Allen war gemeinsam, dass sie IgE-Werte über 2000 IE, einen EASI von über 60 und einen IGA von 4 besaßen.

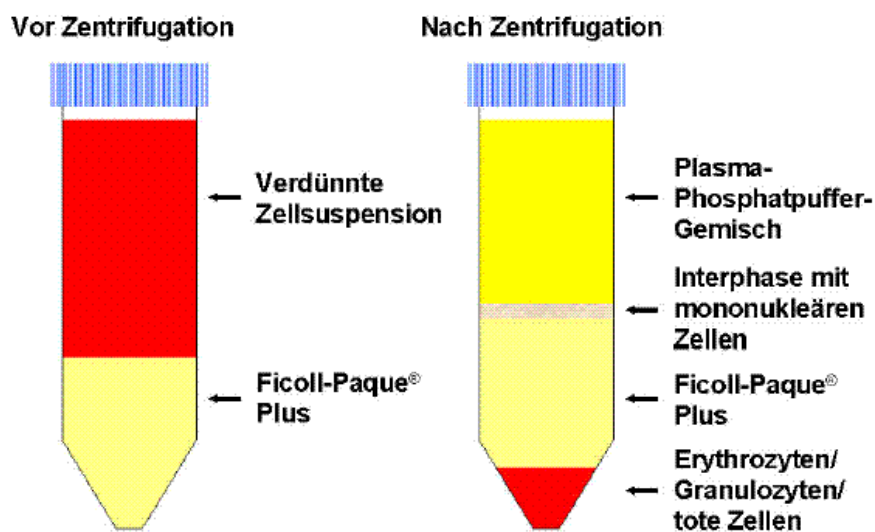
Der standardisierte „Eczema area severity index“ (EASI) [90] wurde zur Beurteilung des Schweregrades der AD angewandt. Dieser bezieht die Schwere und Art der Hautläsionen sowie die befallene Körperregion mit ein und kann Werte zwischen null und 72 annehmen. Ein weiteres Beurteilungssystem, das den aktuellen Zustand der AD beschreibt, ist der sog. „Investigator’s Global Assessment“ [91]. Er wurde ebenfalls zur Bewertung des Patientenkollektivs herangezogen. Dieser Index kann Werte von null bis fünf annehmen. Wobei der Wert „null“ Beschwerdefreiheit indiziert und „fünf“ das Vorhandensein schwerer Läsionen signalisiert.

Die Patienten befanden sich zum Studienzeitpunkt in der Behandlung von Professor Andrew Kemp im Children’s Hospital in Westmead, Sydney, Australien und stellten sich regelmäßig in der Allergieambulanz vor. Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch mit Eltern und Kindern durch den behandelnden Arzt und schriftlicher Einwilligung der Erziehungsberechtigten, wurde den Kindern im Rahmen einer Routinekontrolle 10-50 ml Blut entnommen. Die Studie war von der Ethikkommission der Western Sydney Area Health Services zuvor genehmigt worden. Als Kontrollkollektiv dienten volontierende nicht-atopische junge Erwachsene im Alter von 18-25 Jahren, denen nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung 50 ml Blut abgenommen wurden.

### 3.2 Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut

Lösungen: PBS ohne FCS  
PBS mit 0,5% FCS  
Ficoll

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem, venösen Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten, wurde das Probandenblut 1:1 mit PBS verdünnt, anschließend Ficoll im Verhältnis 1:2 mit der verdünnten Blutlösung überschichtet und bei 1700 U/min für 35 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die mononukleäre Interphase (Abb.3) mit einer Glaspipette entnommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und 3 Mal mit 50 ml PBS/0,5% FCS gewaschen (10 min, 1200 U/ min, RT). Die mononukleären Zellen wurden in einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) gezählt und für die funktionellen Versuche sowie die phänotypischen Analysen verwendet.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines Dichtegradienten mit den entstehenden Phasen bei der Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Paque™ PLUS-Technik.

### 3.3 Anwendung der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung mononukleärer Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden spezifische Oberflächenantigene von mononukleären Zellen auf ihr Expressionsmuster untersucht, die Zellgröße bestimmt sowie die Granulierung der Zellen analysiert. Die Oberflächenepitope

wurden mit unterschiedlich fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer detektiert. Die so erhobenen Daten wurden mit der Cell-Quest Software für Apple Macintosh ausgewertet.

### 3.3.1 Antikörperfärbung von Molekülen auf der Zelloberfläche isolierter, mononukleärer Zellen

Lösung: FACS-Puffer

Soweit nicht anders beschrieben wurden je Färbeansatz  $5 \times 10^5$  Zellen in Rundboden-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1600 U/min, 4°C). Die gewünschten, mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper wurden in der, vortitrierten Verdünnung, in einem Endvolumen von  $100 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen, zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 U/min, RT). Bei Verwendung eines biotinylierten Antikörpers wurde bei gleichen Färbebedingungen 10 min mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Streptavidin inkubiert. Die Spezifität der Färbungen wurde durch den Einschluß geeigneter Isotypenkontrollen sichergestellt.

Antikörper	Verdünnung (Herstellerangaben)
Anti-CD4 PE	1:5
Anti-CD4 FITC	1:5
Anti-CD4 Bio	1:2,5
Anti-CD25 APC	1:5
Anti-CD25 PE	1:5
Anti-CD45RA Bio	1:5
Anti-CD45RO PE	1:5
Anti-CD95 APC	1:5
Anti-CD127 Bio	1:5
Anti-FoxP3 PE	1:20-1:5
Streptavidin PerCP	1:2,5

**Tab. 4:** Zur durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenantigene mononukleärer Zellen verwendete Antikörper und deren Konzentrationen.

### 3.3.2 Intrazelluläre Färbung von FoxP3

Lösungen: Staining Set (eBioscience): Fix/Perm Concentrate, Fix/Perm Diluent, 10x Permeabilization Buffer, Flow

Cytometry Staining Buffer, normal rat serum, Anti-FoxP3 (human)

Gebrauchslösungen:

Verdünnung von Fix/Perm Concentrate (1 Teil) mit Fix/Perm Diluent (3 Teile); Verdünnung des 10x Permeabilization Buffers in 1x Permeabilization Buffer mit destilliertem Wasser (1 Teil Permeabilization Buffer und 9 Teile destilliertes Wasser).

Für die Färbung mit Anti-FoxP3 wurden  $1 \times 10^6$  MNZs pro Färbung verwendet. Nach der Färbung der Zelloberflächen mit den jeweiligen Antikörpern, wie unter 3.3.1 beschrieben, wurde die folgende FoxP3 Färbung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Hierzu wurden nach der Oberflächenfärbung die Zellen in Rundboden-Zentrifugenröhrchen mit dem im Staining Set enthaltenen Flow Cytometry Staining Buffer gewaschen (5 min, 1600 U/min, RT). Danach wurde 1 ml der Fix/Perm Gebrauchslösung zu jeder Probe dazu gegeben und 45 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Flow Cytometry Staining Buffer gewaschen und bei 1600 U/ min für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Proben zwei Mal mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer gewaschen (1600 U/min, 5 min, RT). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen, anschließend wurde das Zellpellet mit 2 µl Rattenserum resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Ohne das Rattenserum abzuwaschen wurde der Anti-FoxP3 PE Antikörper in der vorher austitrierten Konzentration (oder nach Empfehlung des Herstellers) zu einem Maximalvolumen von 100 µl dazugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden dann zwei Mal mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer (5 min, 1600 U/ min) gewaschen und unter der Zugabe von 200 µl Flow Cytometry Staining Buffer ins Durchflusszytometer aufgenommen und analysiert.

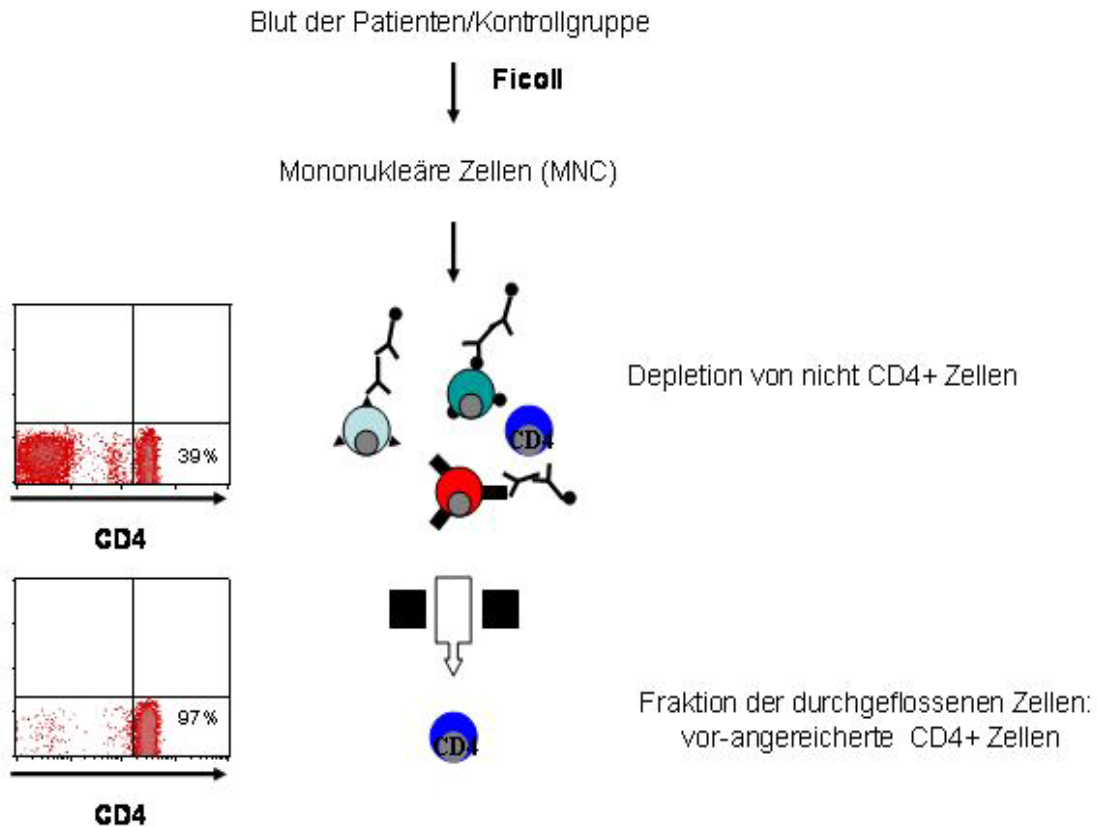
3.4 Isolierung verschiedener Zellpopulationen mit Hilfe der magnetischen Zell-Separations Technologie

3.4.1 Anreicherung CD4+ T-Zellen mittels magnetischer Zell-Separation

Lösungen: CD4+ T-Zell Isolations Kit II (CD4+ T-Zell Biotin-Antikörper Cocktail, Anti-Biotin Mikropartikel), PBS/0,5% FCS Puffer

Die magnetische Zell-Separation beruht auf der Negativ- oder Positivselektion der unerwünschten bzw. gewünschten Zellpopulationen. Aus Vollblut isolierte, mononukleäre Zellen wurden zunächst gezählt und  $1 \times 10^7$  Zellen in 40  $\mu$ l PBS/0,5% FCS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l des Gemischs aus mit Biotin konjugierten, mk-Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  und CD235a zu den Zellen gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 30  $\mu$ l des PBS/0,5% FCS Puffers dazugegeben. Anschließend wurden zu den Zellen 20  $\mu$ l des sekundären Anti-Biotin Antikörpers, welcher mit Magnetpartikeln behaftet war, dazugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Das Zell-Antikörper-Gemisch wurde mit 500  $\mu$ l PBS/0,5%FCS Puffer gewaschen und für 10 min (1600 U/min) bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l PBS/0,5% FCS Puffer resuspendiert.

Dieses Zell-Antikörper-Gemisch wurde dann nach einem Protokoll des Herstellers auf eine MACS-LS Säule gegeben und im magnetischen Feld negativ selektioniert, wobei CD4+, nicht markierte Zellen die Säule ungehindert passieren konnten. Die CD4+ T-Zellen wurden anschließend gezählt und zur Anreicherung CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen genutzt. Die Reinheit der separierten CD4+ Zellen wurde im FACScan durch Färbung gegen CD4 mit einem Anti-CD4 Antikörper, wie unter 3.3.1 beschrieben, kontrolliert und lag bei 95-98% (Abb. 4).



**Abb. 4:** Nach der Anreicherung von CD4+ Zellen aus mononukleären Zellen der Patienten- und Kontrollgruppe, wurden diese zur Reinheitsbestimmung mit einem mk-Antikörper gegen CD4, , gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil CD4+ Zellen betrug 97%.

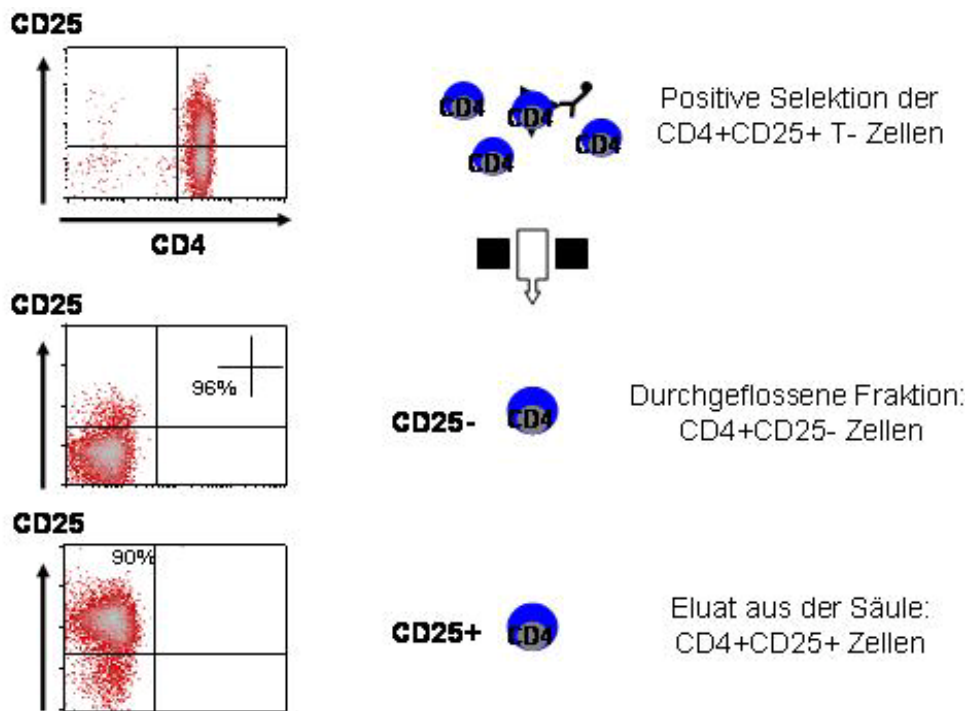
### 3.4.2 Anreicherung von CD25+ und CD25-CD4+ T-Zellen mittels magnetischer Zell-Separation

Lösung: CD4+CD25+ T-Zell Isolations Kit (CD25 Mikropartikel, Anti-CD25 PE Antikörper), PBS/0,5% FCS Puffer

Mittels magnetischer Zell-Separation gewonnene CD4+ Zellen wurden für 10 min bei 1600 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet von  $1 \times 10^7$  CD4+ T-Zellen wurde in 90  $\mu$ l PBS/0,5% FCS Puffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ l CD25+ Mikropartikeln für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 10  $\mu$ l Anti-CD25 PE zu der Zellsuspension gegeben und 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l PBS/0,5% FCS Puffer für 10 min bei 1600 U/min (4°C) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen wurde und das Zellpellet in 500  $\mu$ l PBS/0,5% FCS resuspendiert.



Das Zell-Antikörper-Gemisch wurde dann nach einem Protokoll des Herstellers auf eine MACS-MS Säule gegeben und im magnetischen Feld selektioniert. CD4+CD25- T-Zellen konnten die Säule ungehindert passieren. Die in der Säule zurück gebliebenen Zellen wurden als CD4+CD25+ T-Zellen eluiert (Abb. 5). Die Reinheit der separierten CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen wurde im FACScan kontrolliert und lag bei 90-96% (Abb. 5).



**Abb. 5:** Die Anreicherung von CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen aus den gewonnenen CD4+ T-Zellen wurde mittels einer Kontrollfärbung mit einem mk-Antikörper gegen CD25 überprüft.

### 3.4.3 Anreicherung antigenpräsentierender Zellen

Lösung: CD3 Mikropartikel, PBS/0,5% FCS Puffer

Die Isolation antigenpräsentierender Zellen (APZ) aus mononukleären Zellen erfolgte durch Negativselektion der unerwünschten Zellpopulation (CD3+ Zellen) in einem MACS System. Hierzu wurden  $1 \times 10^7$  MNZs für 10 min bei 1600 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 80 µl PBS/0,5% FCS Puffer resuspendiert und mit 20 µl CD3 Mikropartikeln für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann unter Zugabe von 2 ml PBS/0,5%

FCS Puffer zentrifugiert (1600 U/min, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl PBS/0,5% FCS Puffer resuspendiert. Die mit magnetischen Anti-CD3-Partikeln beladenen Zellen wurden anschließend auf die MACS-LD Säule im magnetischen Feld gegeben. CD3<sup>+</sup> depletierte Zellen konnten die Säule ungehindert passieren und wurden im funktionellen Ansatz als antigenpräsentierende Zellen verwendet.

### 3.5. Analyse der Proliferation CD25<sup>-</sup> T-Zellen unter Anwendung der Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester Methode

#### CFSE Färbung

Lösung: CFSE-Stocklösung: 10 mM CFSE in DMSO, RPMI1640/5%FCS  
Mit Hilfe der CFSE-Färbung wurde die Anzahl der Zellteilungen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Lymphozyten bestimmt. Der CFSE-Farbstoff bindet kovalent mit aliphatischen, ungeladenen Aminosäuren wodurch jede Zellteilung eine Halbierung der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Einzelzellsuspensionen von CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden vor der Färbung mit CFSE drei Mal mit proteinfreiem Medium gewaschen und anschließend bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$ /ml in einer Verdünnung von 1:10000 (Verdünnungsreihe) für 10 min bei 37°C mit CFSE inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von RPMI1640/ 5%FCS Medium, beendet.

#### In vitro Suppressionstest

Der Suppressionstest wurde in 96-well Mikrotiterplatten angesetzt. Das Gesamtvolumen pro well betrug 200 µl. Alle Ansätze wurden in zweifacher Ausführung ausgesät. Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn gezählt und in RPMI1640/ 10%FCS Medium resuspendiert. Responderzellen (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>hi</sup>CD25<sup>-</sup>) und Suppressorzellen wurden in der Anwesenheit von  $5 \times 10^4$  CD3 depletierten MNZs (in 100µl RPMI1640/ 10%FCS) kultiviert und mit Anti-CD3 Antikörper (0,25 µg/ml) stimuliert. Die CD25<sup>-</sup> Responderzellen waren mit CFSE markiert und wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/ well in 50 µl RPMI1640/ 10% FCS ausgesät. Die Suppressorzellen wurden im

Verhältnis 1:1 ebenfalls in einem Volumen von 50 µl zu den Responderzellen gegeben. In den Kontrollansätzen wurden die Suppressorzellen durch Responderzellen ersetzt.

Um mögliche Fehlfunktionen eines Zelltyps zu erkennen, wurden folgende Zellkombinationen untersucht: (1) Responderzellen der Kontrolle mit autologen Suppressorzellen, (2) Responderzellen der Kontrollen mit allogenen Suppressorzellen des Patienten, (3) Responderzellen des Patienten mit autologen Suppressorzellen und (4) Responderzellen des Patienten mit allogenen Suppressorzellen der Kontrolle.

Nach 72 h Inkubationszeit wurde der Versuch beendet. Die Zellen wurden im well sorgfältig resuspendiert und die jeweils gleichen Ansätze in ein Rundboden-Zentrifugenröhrchen überführt. Die geernteten Zellen wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (1600 U/min, 5 min, RT). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellteilungen der Responderzellen, mit und ohne Suppressorzellen, im Durchflusszytometer analysiert. Die Suppression wurde relativ zu den Zellteilungen der Kontrollen (wells, die nur Responderzellen enthielten) errechnet.

### 3.6 Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der SPSS 15.0 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt und p-Werte  $\leq 0.05$  wurden als signifikant gewertet.

Soweit nicht anders erwähnt, repräsentieren die Fehlerbalken in allen Abbildungen den Standardfehler des Mittelwertes.

## 4. Ergebnisse

Der genaue Pathomechanismus der atopischen Dermatitis ist noch nicht bekannt. Offensichtlich handelt es sich um eine systemische Erkrankung, in der die T-Zell-vermittelte Immunität eine zentrale Rolle spielt. Um den Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und der atopischen Dermatitis zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Studie Frequenz, Funktion und phänotypische Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen bei gesunden jungen Erwachsenen und bei Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis vergleichend untersucht.

### 4.1 Das Probanden- und Kontrollkollektiv

Das Untersuchungsmaterial wurde von Kindern im Alter von drei bis 16 Jahren (Tab. 5), die an der schwersten Form der atopischen Dermatitis leiden, in der Allergieambulanz des Westmead Children's Hospital, Sydney, Australien, gewonnen. Um mögliche Unterschiede der T-Zellimmunität zwischen Kontrollkollektiv und Patienten an einem kleinen Patientenkollektiv zu erkennen, wurden nur die Patienten ausgewählt, die an der extremsten Form der atopischen Dermatitis litten. Der standardisierte „Eczema area severity index“ [90] wurde zur Beurteilung des Schweregrades der AD angewandt. Bei allen Patienten wurde ein EASI von über 60 gemessen. Ein weiteres Beurteilungssystem, das den aktuellen Zustand der AD beschreibt, ist der sog. „Investigator's Global Assessment“ [91]. Bei allen Patienten wurde ein IGA von vier erhoben worden.

Die in die Kontrollgruppe einbezogenen Probanden konnten aus praktischen und ethischen Gründen nicht genau dem Alter der Patientengruppe angepasst werden, so dass sich die Kontrollgruppe aus jungen gesunden Erwachsenen im Alter von 18-25 Jahren zusammensetzte.

Patient	Alter	Eosinophile / $\mu$ l	IgE (IU/mL)	Klinik	Therapie
I	16	600	29048	florides Ekzem	symptomatisch
II	6	2900	14184	Besserung	Azathioprin
III	3	1000	2784	schwer floride	symptomatisch
IV	10	1300	22407	Besserung	Azathioprin
V	4	1300	12524	florides Ekzem	symptomatisch
VI	9	N/A	37407	florides Ekzem	symptomatisch
VII	8	2300	N/A	florides Ekzem	symptomatisch
VIII	7	1400	20714		symptomatisch
IX	11	300	19867		symptomatisch
X	10	2300	N/A	Besserung	symptomatisch
XI	3	1600	N/A	schwer floride	symptomatisch
XII	9	2300	8723		Azathioprin
Mittelwert	8	1545	18629		

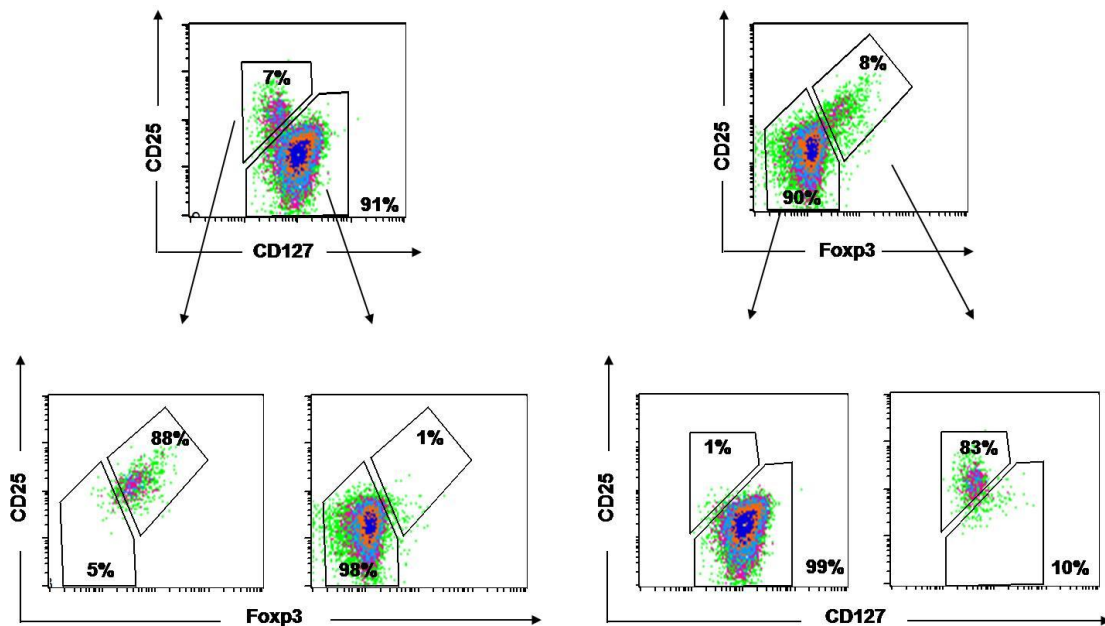
**Tab. 5:** Charakteristika des Patientenkollektivs.

#### 4.2 Charakterisierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels CD25, CD127 sowie des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3

Tregs können anhand verschiedener Merkmale identifiziert werden. Zunächst wurde die ursprüngliche Oberflächenmarkerkombination CD4+CD25+ (Abb. 6/7) zur Identifizierung der Tregs herangezogen. Bei der Anwendung dieser Kombination kann nicht zwischen aktivierten T-Zellen und Tregs im eigentlichen Sinne unterschieden werden, da von beiden T-Zell Subpopulationen CD25, die IL-2  $\alpha$ -Kette, exprimiert wird. Die Annahme, dass nur der Anteil humaner CD4+ T-Zellen, die das CD25 Molekül stark exprimieren (CD25<sup>hi</sup>), Regulatorfunktion besitzen, ist inzwischen widerlegt [50]. Es konnte allerdings gezeigt werden,

dass auch die Zellen regulatorische Eigenschaften haben, die CD25 intermediär exprimieren. Insofern ist eine Quantifizierung von Tregs mit dieser Markerkombination ungenau.

Als Goldstandard zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen gilt der Nachweis des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3, der für die Entwicklung und Differenzierung von Tregs unerlässlich ist. Die intrazelluläre Anfärbung erfolgt nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembran. Die Zellen sind danach nicht mehr für funktionelle Untersuchungen verwendbar. Seddiki et al. zeigten [50], dass die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 invers mit der Expression des Oberflächenmoleküls CD127 auf CD4+CD25+ Zellen korrelierte. Bei CD127 handelt es sich um die IL-7 Rezeptor  $\alpha$ -Kette, die auf Tregs nur geringfügig exprimiert wird. Die Unterscheidung der Tregs mit Hilfe der Markerkombination CD4+CD25+CD127- ermöglichte die Isolierung intakter Tregs, die somit für weitere funktionelle Analysen verwendet werden konnten (Abb. 6).



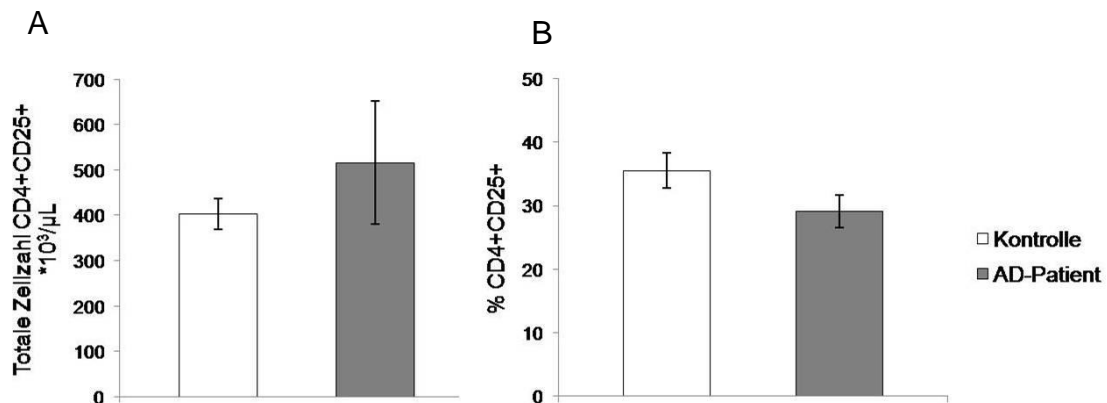
**Abb. 6:** Inverse Korrelation von FoxP3+ und CD127+ humaner CD4+ T-Zellen. CD4+ T-Zellen wurden mit mAk gegen CD25, CD127 und FoxP3 gefärbt. Die Analyse zeigte, dass die Population CD4+FoxP3+ T-Zellen der Population CD4+CD127- T-Zellen entsprach.

### 4.3 Vergleichende Untersuchungen von Tregs in Patienten- und Kontrollgruppe

#### 4.3.1 Analyse der Frequenz regulatorischer T-Zellen

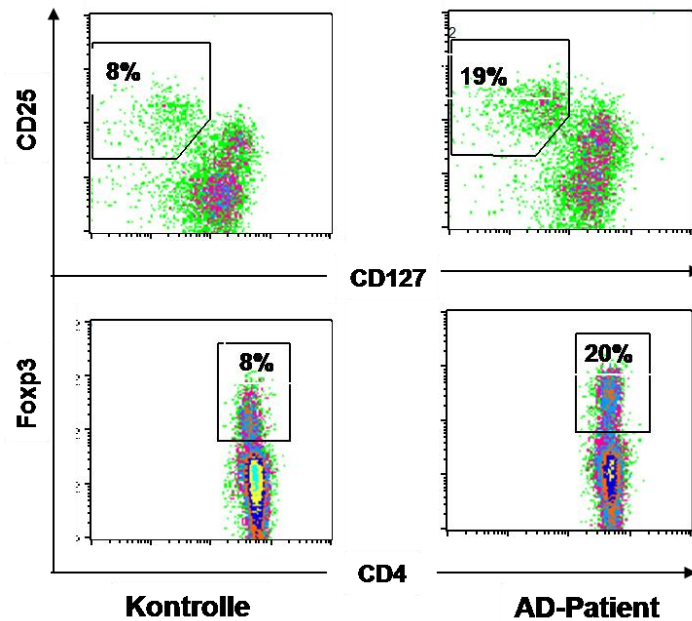
Möglicherweise spielt bei der Pathogenese der AD eine erhöhte oder erniedrigte Anzahl zirkulierender Tregs im peripheren Blut eine Rolle. Um diese Hypothese zu testen, wurden die mononukleären Zellen beider Probandenkollektive mit verschiedenen Markerkombinationen zur Identifizierung von Tregs (1) CD4+CD25+, (2) CD4+FoxP3+ und (3) CD4+CD25+CD127- untersucht.

Bei der quantitativen Untersuchung der CD4+CD25+ T-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Atopikern und Kontrolle festgestellt werden (Abb. 7A). Der prozentuale Anteil der CD25+ T-Zellen an der Population CD4+ T-Zellen wies keinen Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen auf (Abb. 7B).

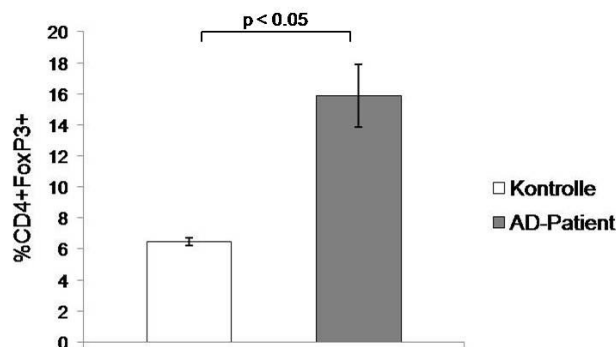


**Abb. 7:** Totale (A) und relative (B) Zellzahl der CD4+CD25+ T-Zellen. Die Anzahl der CD4+CD25+ T-Zellen der Patienten (n=14) betrug im Mittelwert  $525,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , die der Kontrolle (n=16)  $318,36 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (A). Der prozentuale Anteil CD4+CD25+ T-Zellen betrug bei der Kontrollgruppe 36%, bei der Patientengruppe 30%. Die Mittelwerte der Kontrollen (+/- Standardfehler) werden durch weiße Säulen repräsentiert, die der Patienten durch graue Säulen.

Im nächsten Schritt wurden MNZ von sieben Patienten und 14 Kontrollen mit den Markerkombinationen CD4, FoxP3 und CD4, CD25, CD127 untersucht (Abb. 8). Es zeigte sich, dass 8% der CD4+ T-Zellen der Kontrollgruppe und 20% der CD4+ T-Zellen der Patienten FoxP3 positiv waren (Abb. 9).



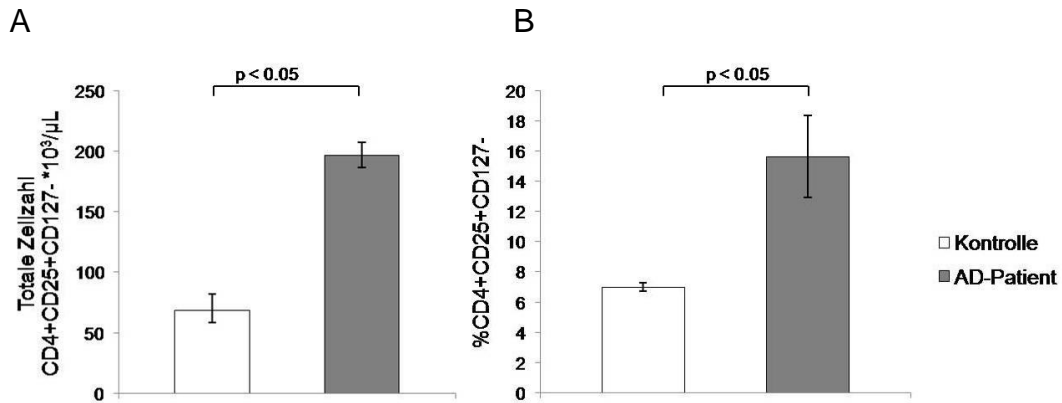
**Abb. 8:** Patienten mit AD zeigten eine signifikant größere Population der CD4+CD25+CD127-T-Zellen (19%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (8%). Die Population der CD4+FoxP3+ T-Zellen der Patientengruppe war mit 20% signifikant größer als die der Kontrollgruppe (8%).



**Abb. 9:** Relative Zellzahl der CD25+FoxP3+ T-Zellen. FoxP3 wird durchschnittlich von 7% aller MNZs der Kontrollen (n=16) und 16% aller MNZs der Patienten (n=7) exprimiert. Mittelwerte der Kontrollen (+/- SEM) werden durch weiße Säulen repräsentiert, die der Patienten durch graue Säulen. Der signifikante Unterschied der Expression von FoxP3 auf MNZs der Patienten und Kontrollgruppe wurde unter Anwendung des Mann-Whitney U-Tests ermittelt.

Dieses Ergebnis lässt sich auch mit der Markerkombination CD4+CD25+CD127 bestätigen. Sowohl die absolute Anzahl der CD4+CD25+CD127-T-Lymphozyten als auch der prozentuale Anteil der CD4+CD25+CD127-T-Lymphozyten war bei den Patienten mit AD signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 10).

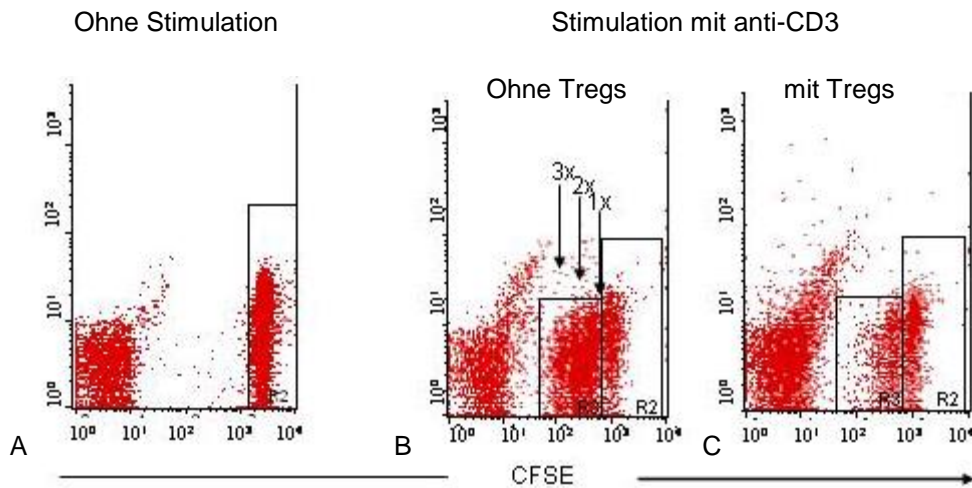




**Abb. 10:** Totale und relative Zellzahl der CD4+CD25+CD127- T-Zellen. Die Anzahl der CD4+CD25+CD127- T-Zellen der Patienten (n=7) betrug im Mittelwert  $196,8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , die der Kontrolle (n=17)  $62,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (A). Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+CD127- T-Zellen betrug bei der Kontrollgruppe 7% (weiße Säule), bei der Patientengruppe 16% (graue Säule). P-Werte wurden unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

#### 4.3.2 Funktionelle Analyse regulatorischer T-Lymphozyten

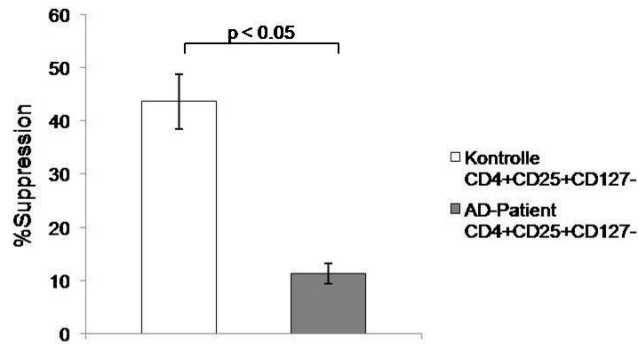
Um das Suppressionspotenzial von Tregs zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe der magnetischen Zell-Separation aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts der Patienten- und Kontrollgruppe isoliert. Mit CFSE markierte CD25- T-Zellen wurden als Responderzellen verwendet, CD25+CD127- Tregs der Patienten- und Kontrollgruppe als Suppressorzellen. Um mögliche Fehlfunktionen des jeweiligen Zelltyps zu erkennen, wurden folgende Zellkombinationen untersucht: CD25- T-Zellen der Kontrolle mit autologen CD25+ T-Zellen, um eine fehlerhafte Supprimierbarkeit der CD25- T-Zellen auszuschließen sowie mit allogenen CD25+ T-Zellen der Patienten. CD25- T-Zellen der Patienten wurden mit autologen CD25+ T-Zellen sowie mit allogenen CD25+ T-Zellen der Kontrollgruppe kombiniert, um auch hier von einer generellen Supprimierbarkeit der CD25- T-Zellen der Patienten ausgehen zu können.



**Abb. 11:** Mit CFSE markierte CD25<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe befinden sich rechts im Teilabschnitt A, die nicht-markierten CD3 depletierten Zellen links. (B) Nach dreitägiger Stimulation der CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit Anti-CD3 waren drei Zellteilungen sichtbar (1x, 2x, 3x) sowie die CD3 depletierte Zellpopulation (links). (C) Es waren deutlich weniger Zellteilungen am dritten Tag nach Stimulation mit Anti-CD3 und unter Zugabe von Tregs der Kontrollgruppe sichtbar. Die CD3 depletierten Zellen sind weiterhin links im Eck erkennbar.

Mit CFSE markierte, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit einem Anti-CD3-Antikörper stimuliert und somit zur Proliferation angeregt. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs der Kontrollgruppe unterdrückten die Proliferation autologer (Abb. 11) und allogener CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz dazu war die Suppressionsfähigkeit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen der AD-Patienten sowohl gegenüber autologen als auch allogenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen eingeschränkt (Abb. 12).

Die hier untersuchte Fähigkeit von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen der Patienten und Kontrollgruppe, die Proliferation von CD25<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe zu supprimieren, ist in Abb. 12 dargestellt. Die weiße Säule des Säulendiagramms repräsentiert das Suppressionspotenzial der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe über die CD25<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe. Das Suppressionspotenzial der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs der Patienten über die CD25<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe ist durch die graue Säule in Abb.12 dargestellt. Es zeigte sich eine signifikant geringere suppressive Kapazität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs von Patienten mit AD.



**Abb. 12:** Die Suppressionsfähigkeit der CD4+CD25+CD127- T-Zellen der Kontrollgruppe und der Patienten mit AD über CD25- T-Zellen der Kontrollgruppe zeigte eine signifikant geringere Suppression durch die CD4+CD25+CD127- T-Zellen der Patienten als durch die CD4+CD25+CD127- T-Zellen der Kontrollen (n=8). Mittelwerte der Kontrollen (+/- SEM) werden durch weiße Säulen repräsentiert, die der Patienten durch graue Säulen. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet.

#### 4.4 Phänotypische Charakteristika regulatorischer T-Zellen der Patienten- und Kontrollgruppe

##### 4.4.1 Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD127, CD45RO/CD45RA und CCR7

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit AD eine höhere Anzahl an Tregs besitzen, diese aber in ihrer Funktionsfähigkeit stark eingeschränkt sind. Bei der AD handelt es sich um einen chronischen Prozess. Möglicherweise kommt es dabei zu einer dauerhaften Stimulation der Tregs, was sich durch den Nachweis von Aktivierungs- und Gedächtnismarkern indirekt belegen ließe. Die Entwicklung immunologischer Gedächtniszellen kann auf verschiedene Weisen aus naiven T-Zellen und T-Effektorzellen erfolgen. Naive Zellen exprimieren in der Regel CD45RA, während Gedächtniszellen normalerweise CD45RO positiv sind. Des Weiteren wird zwischen sog. zentralen Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen unterschieden. Die Populationen der CD45RA-CCR7+ zentralen Gedächtniszellen und der CD45RA-CCR7- Effektor- Gedächtniszellen unterscheiden sich möglicherweise in ihren funktionellen Eigenschaften.

Diese unterschiedlichen Gedächtniszellen wurden vergleichend bei Patienten mit AD und der Kontrollgruppe bei regulatorischen T-Zellen und nicht regulatorischen T-Zellen (non Tregs) untersucht.

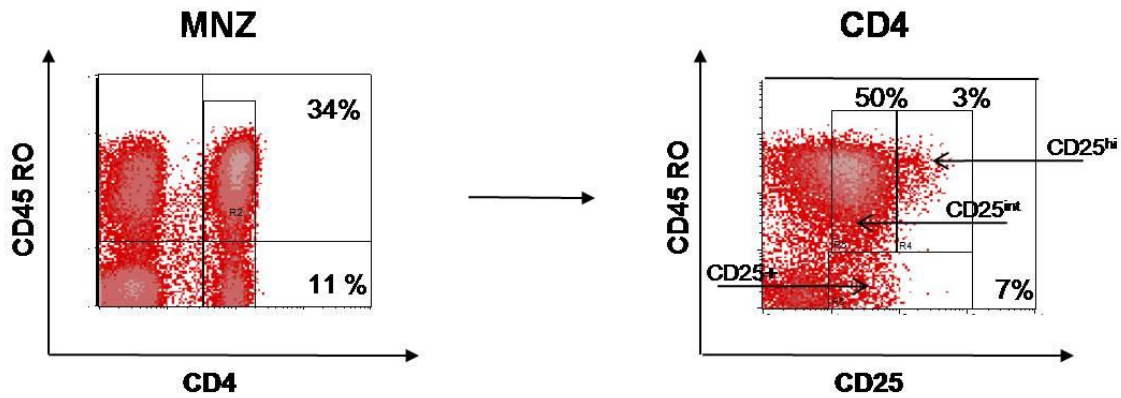
Anhand der Höhe der CD25 Expression unterscheidet man bei den CD4+CD45RO+ T-Zellen hochexprimierende (CD25<sup>hi</sup>) und intermediär exprimierende (CD25<sup>int</sup>) T-Zellen. Des Weiteren kann eine CD45RO-CD25+ Population unterschieden werden. Den CD4+CD45RO+CD25<sup>hi</sup>, CD4+CD45RO+CD25<sup>int</sup> und den CD4+CD45RA+CD25<sup>hi</sup> Zellen von Kindern werden regulatorische Fähigkeiten zugeschrieben.

Demnach wurde das Expressionsprofil von CD25 in der Subpopulation der CD4+CD45RO+ T-Zellen der Patienten- sowie der Kontrollgruppe untersucht.

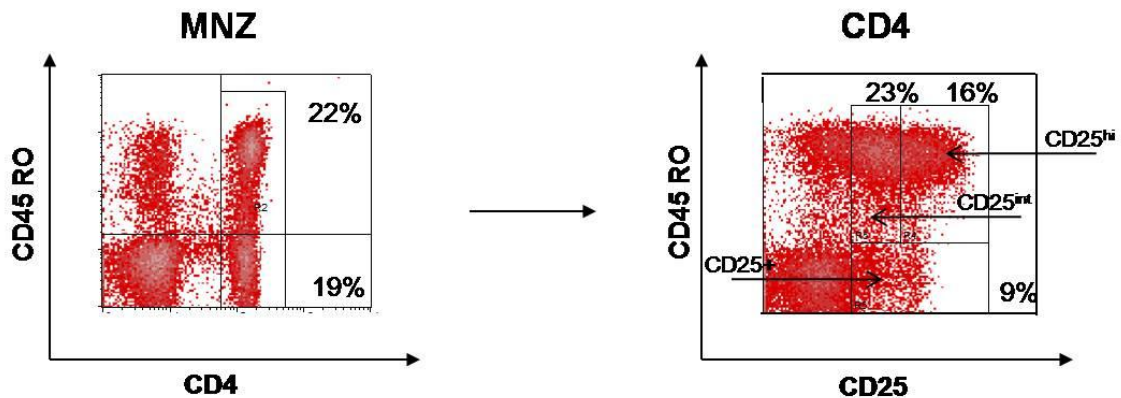
Die durchflusszytometrischen Daten zeigten, dass 16% der CD4+CD45RO+ T-Zellen der Patienten CD25<sup>hi</sup> exprimierende Zellen waren (Abb. 14). In der Kontrollgruppe betrug dieser Anteil, in dem hier vorliegenden Beispiel, nur 3% (Abb. 13). Dieser signifikante Unterschied ist im Säulendiagramm (Abb. 15) unter Einbeziehung aller Messwerte dargestellt.

Die Population der CD45RO+CD25<sup>int</sup> Zellen verhielt sich genau umgekehrt. Es konnte eine größere CD45RO+CD25<sup>int</sup> Population bei der Kontrollgruppe (50%) als bei den Patienten mit AD (23%) ermittelt werden (Abb. 13/14). Dieses Ergebnis ist ebenfalls im Säulendiagramm (Abb. 15) verdeutlicht. Es konnte kein Unterschied bezüglich der CD45RO-CD25+ Population zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

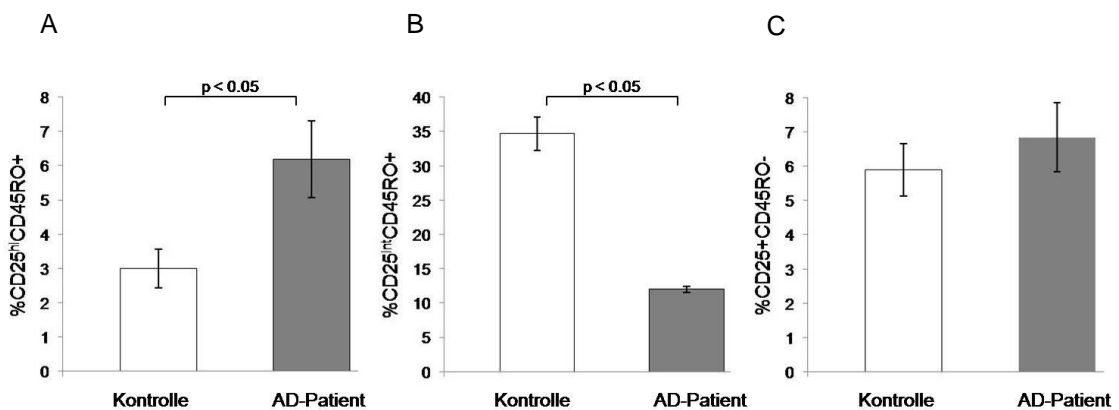
Die Untersuchung der naiven, zentralen Gedächtniszellen (central memory, T<sub>CM</sub>) und Effektor-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) in der Gruppe der non-Tregs zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Bei den Tregs hingegen war ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Untersuchungsgruppen in der Population der naiven T-Zellen und Effektor-Gedächtniszellen zu erkennen. Der Anteil der naiven Tregs war in der Kontrollgruppe wesentlich größer als in der Patientengruppe. Demgegenüber war der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen im Patientenkollektiv dreimal höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 16/17).



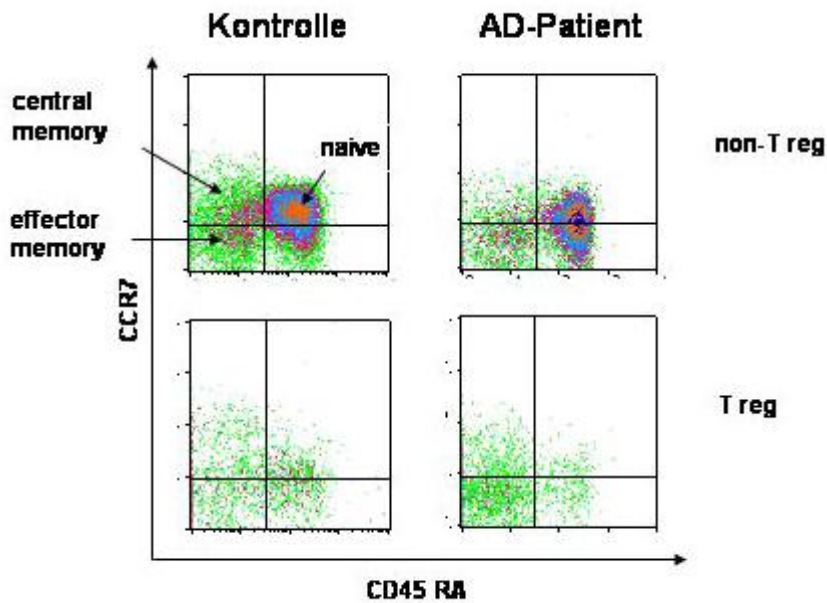
**Abb. 13:** Anhand der CD25 und CD45RO Expression auf CD4+ MNZs der Kontrollgruppe konnten drei verschiedene Populationen unterschieden werden: CD4+CD45RO+CD25<sup>hi</sup> (3%) CD4+CD45RO+CD25<sup>int</sup> (50%) und CD4+CD45RO-CD25+ (7%).



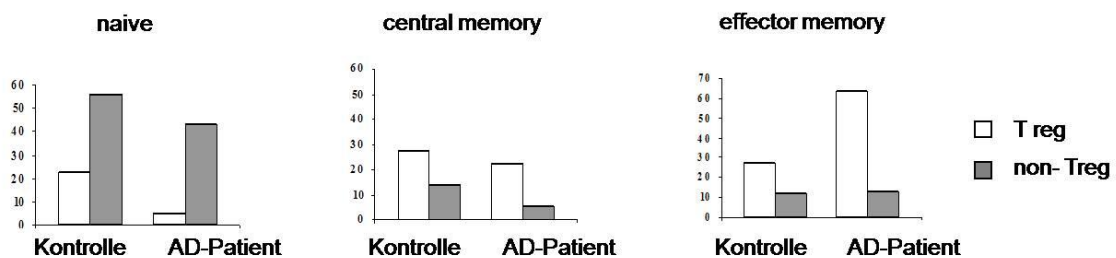
**Abb. 14:** Im Patientenkollektiv betrug der Anteil der CD4+CD45RO+CD25<sup>hi</sup> 16%, der Anteil der CD4+CD45RO+CD25<sup>int</sup> 23% und die Fraktion der CD4+CD45RO-CD25- Zellen 9%.



**Abb. 15:** (A) Die Anzahl CD4+CD45RO+ CD25<sup>hi</sup> T-Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. (B) Der Anteil CD4+CD45RO+ CD25<sup>int</sup> T-Zellen war bei der Kontrollgruppe signifikant größer als bei der Patientengruppe. (C) Die Expression von CD25 auf CD4+CD45RO- T-Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse der Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.



**Abb. 16:** Expression von CD45RA und CCR7 auf Tregs und non-Tregs der Patienten- und Kontrollgruppe: Die naiven Zellen waren durch das Expressionsprofil CD45RA+CCR7+ gekennzeichnet, die zentralen Gedächtniszellen durch CD45RA-CCR7+ und die Effektor-Gedächtniszellen durch CD45RA-CCR7-.

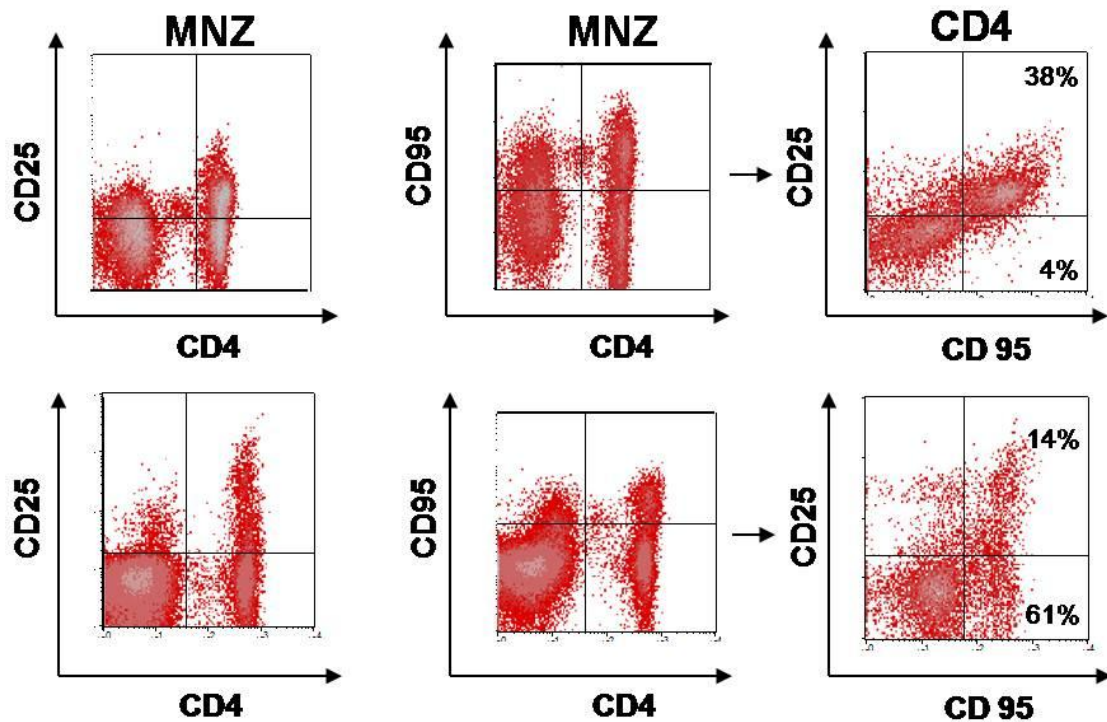


**Abb. 17:** Der prozentuale Anteil der naiven, zentralen Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen in der Gruppe der Tregs und non-Tregs bei Patienten mit AD und der Kontrolle. Tregs sind durch die weißen Säulen gekennzeichnet, non-Tregs durch die grauen Säulen.

#### 4.4.2 Expression des Todesrezeptors CD95

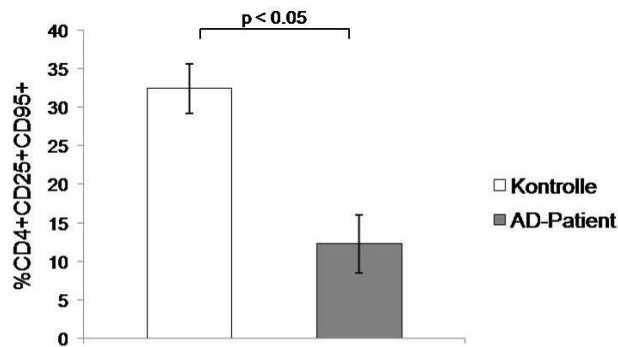
Die höhere Frequenz von Tregs bei Kindern mit AD ist möglicherweise auf ein Ungleichgewicht zwischen Entwicklung von Tregs und Apoptose zurückzuführen. In der vorliegenden Studie wurde daher die Expression des Todesrezeptors CD95 auf CD4+CD25+ T-Zellen, welche die regulatorischen CD25<sup>hi</sup> und CD25<sup>int</sup> exprimierenden Zellen einschließen, sowohl der Patienten- als auch der Kontrollgruppe untersucht.

Es zeigte sich, dass die Population der CD25+CD95+ T-Zellen unter den CD4+ Zellen der Patienten mit 14% (Abb.18) deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe mit 38% (Abb. 18).



**Abb. 18:** Bei Untersuchungen zur CD95 Expression auf CD4+CD25+ Zellen des Kontrollkollektivs zeigte sich, dass 38% dieser Zellen positiv für dieses Markermolekül waren. Bei der Patientengruppe hingegen gaben nur 4% der Zellen ein positives Signal in der FACS-Analyse.

Wie schon in Abb. 18 verdeutlicht, war der prozentuale Anteil der CD95+ Zellen in der Population der CD4+CD25+ T-Zellen bei der Kontrollgruppe signifikant größer als bei den Patienten mit AD (Abb. 19).



**Abb. 19:** CD95 Expression bei Patienten mit AD (weiße Säule) im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe (graue Säule). Es zeigte sich eine signifikant geringere Expression von CD95 im Patientenkollektiv. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Der signifikant geringere Anteil CD95+ T-Zellen lässt eine fehlerhafte Apoptosefunktion der CD4+CD25+ Population bei Patienten mit AD vermuten.

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Untersuchung von Frequenz, Phänotyp und Funktion der regulatorischen T-Zellen wurde zwischen CD4+CD25+ T-Zellen, CD4+CD25+CD127- und CD4+FoxP3+ Tregs unterschieden. Während bei der Frequenzanalyse mit der Markerkombination CD4+CD25+ kein deutlicher Unterschied zwischen der Kontroll- und Patientengruppe aufgezeigt werden konnte, waren Foxp3+ und CD4+CD25+CD127- Tregs bei Patienten mit AD deutlich erhöht.

Bei der funktionellen Analyse war die suppressive Kapazität der CD4+CD25+CD127- regulatorischen T-Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis *in vitro* signifikant vermindert.

Es konnte gezeigt werden, dass CD4+CD25+ T-Zellen, einschließlich CD25<sup>hi</sup> und CD25<sup>int</sup> exprimierende Zellen, die als Teil der regulatorischen T-Zellpopulation angesehen werden können eine signifikant geringere Expression des Todesrezeptors CD95 aufweisen.

Die Untersuchung von Aktivierungs- und Gedächtnismarkern ergab, dass der Anteil der regulatorisch aktiven CD45RO+CD25<sup>hi</sup> T-Zellen bei Patienten mit AD signifikant höher als in der Kontrollgruppe war. Der Anteil der CD45RO+CD25<sup>int</sup> T-Zellen war im Patientenkollektiv signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.



Analysen zur Expression von CCR7 und CD45RA auf Tregs und nicht-regulatorischen T-Zellen ergaben, dass der größere Anteil der Tregs des Patientenkollektivs Effektor-Gedächtniszellen waren. Im Gegensatz dazu war der prozentual größte Anteil an Tregs in der Kontrollgruppe als naiv anzusehen. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Population der zentralen Gedächtniszellen der Tregs und der non-Tregs beider Gruppen aufgezeigt werden.

## 5. Diskussion

Die vergleichende Untersuchung der Frequenz regulatorischer T-Lymphozyten bei Kindern, die an schwerer atopischer Dermatitis leiden und dem gesunden Kontrollkollektiv zeigte, dass die Anzahl der Tregs bei den Patienten mit AD signifikant erhöht war. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass trotz der höheren Anzahl der Tregs deren Suppressorfunktion deutlich eingeschränkt war. Die Untersuchung der verschiedenen phänotypischen Eigenschaften ergab, dass bei dem Patientenkollektiv im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein deutlich größerer Anteil der CD45RO+ Population CD25<sup>hi</sup> exprimieren. Die Analyse der naiven T-Zellen, der Effektor-Gedächtniszellen und der zentralen T-Gedächtniszellen zeigte, dass der Anteil der naiven Tregs in der Kontrollgruppe wesentlich höher war als bei der Patientengruppe. Demgegenüber war der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen der Tregs bei den Kindern mit AD um ein vielfaches höher als bei der Vergleichsgruppe. Die Untersuchung der Expression des Todesrezeptors CD95 ergab, dass die Population der CD4+CD25+CD95+ T-Zellen bei den Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis signifikant geringer war als bei der gesunden Kontrollgruppe.

### 5.1 Methodische Überlegungen

Die Untersuchung von Tregs bei Kindern, die an der schwersten Form der atopischen Dermatitis leiden, erwies sich bei der Durchführung als problematisch. Da es sich bei dem Probandenkollektiv um Kinder zwischen drei und 16 Jahren handelt, deren Haut stark von ihrer Erkrankung gezeichnet war, stellte sich die Gewinnung der Blutprobe als äußerst schwierig dar. Des Weiteren konnten maximal 5-10 ml Blut, zusätzlich zur Routineblutuntersuchung, gewonnen werden. Dies resultierte häufig in einer sehr geringen Anzahl isolierter Zellen, was die Durchführung der funktionellen Analyse erschwerte. Aufgrund der Erkrankung waren nur wenige Eltern dazu

bereit, ihr Kind an der Studie teilnehmen zulassen, was sich in den geringen Fallzahlen widerspiegelt.

Aus praktischen und ethischen Gründen konnte das Alter der Kontrollgruppe nicht genau dem Alter der Patientengruppe angepasst werden. Allerdings sollte dies keinen Einfluss auf die Anzahl und Funktion der Tregs haben. Santner-Nanan et al. beschrieben, dass sowohl die Anzahl als auch die suppressive Funktion der Tregs im Alter weitgehend konstant bleibt [107]. Deshalb sollte der Altersunterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die hier dargestellten Ergebnisse haben.

Die Arbeit mit einem solch ausgewählten Patientenkollektiv bringt auf der einen Seite viele Schwierigkeiten mit sich, auf der anderen Seite aber ist gerade diese Patientengruppe von unschätzbarem Wert. Bei Patienten, die nur an einer milden Form der AD leiden und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden können Unterschiede häufig nicht eindeutig herausgearbeitet werden. Daher war es von besonderer Wichtigkeit in der hier vorliegenden Studie Kinder zu untersuchen, die an der schwersten Form der atopischen Dermatitis leiden.

## 5.2 Die regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit T-Effektorzellen zu supprimieren zu können eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Allergien und Autoimmunkrankheiten. In der vorliegenden Studie wurde zunächst die Expression von CD25, dem ursprünglichen Definitionsmerkmal der Tregs [108, 109], sowohl bei dem Patienten- als auch bei dem Kontrollkollektiv vergleichend untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl der CD4+CD25+ T-Zellen bei den Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht war.

Bellinghausen et al. konnten in ihrer Studie über die Frequenz und Funktion von CD4+CD25+ T-Zellen bei Patienten mit atopischen Krankheitsbildern keinen Unterschied bezüglich der Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe aufzeigen [103].

Andere Studien hingegen, welche die Häufigkeit CD4+CD25+ T-Zellen bei autoimmunologischen Vorgängen verschiedener Erkrankungen untersuchten, konnte eine verminderte Anzahl an CD4+CD25+ T-Zellen bei erkrankten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufgezeigt werden [71-73, 110].

Im Gegensatz dazu konnten Studien über die Frequenz der CD4+CD25+ T-Zellen in Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [111, 112], der Myasthenia gravis [113] und der Multiplen Sklerose [114] keinen Unterschied bezüglich der Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen feststellen. Teilweise wurde sogar eine erhöhte Frequenz dieser T-Zellen im Vergleich zur jeweiligen gesunden Kontrollgruppe berichtet.

Kontroverse Ergebnisse über die Anzahl der regulatorischen T-Zellen könnten auf der Tatsache begründen, dass zunächst keine Möglichkeit zur Verfügung stand, zwischen aktivierten, also CD4+CD25+ T-Zellen, und CD4+ T-Zellen mit regulatorischer Funktion zu unterscheiden [50, 103].

Die Kommerzialisierung eines mAk gegen FoxP3, einen für Tregs charakteristischen Transkriptionsfaktor, ermöglichte eine genauere Identifizierung der Tregs auf Einzelzellebene [69]. Da es sich bei FoxP3 um einen intrazellulären Transkriptionsfaktor handelt, erfordert dessen Anfärbung die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, so dass diese für anschließende funktionelle *in vitro* Versuche mit vitalen Zellen nicht zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund können mit Tregs, die durch die Markerkombination CD4+CD25+FoxP3+ isoliert wurden, keine funktionellen Versuche durchgeführt werden.

In einer Studie von Seddiki et al. [50] wurde gezeigt, dass die Expression von CD127, der  $\alpha$ -Kette des IL-7 Rezeptors, in Kombination mit CD25 zur Differenzierung zwischen aktivierten CD4+ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen verwendet werden kann. Da IL-2 für die Entwicklung der Tregs entscheidend ist [115], wurde angenommen, dass andere, die Differenzierung von Tregs beeinflussende Faktoren (IL-7), von untergeordneter Rolle sind, wohingegen sie bei anderen, nicht-regulatorischen T-Zell Subpopulationen, die sich vorwiegend IL-2 unabhängig entwickeln, unabdingbar sind [116].

Es konnte gezeigt werden, dass humane Tregs eine geringere Expression an CD127 aufweisen als der Gesamtpool der CD4+ Zellen [50].

Da CD127 auf der Zelloberfläche exprimiert wird und somit keine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zur Identifizierung der Markermoleküle notwendig ist, stellt die Markerkombination CD4+CD25+CD127- für die Identifizierung und Isolierung humaner Tregs eine adäquate Alternative dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Aussage von Bellinghausen et. al bestätigt werden, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der CD4+CD25+ T-Zellen bei den Patienten mit AD und der Kontrollgruppe gezeigt hat. Allerdings konnte mit Hilfe der neuen Markerkombination CD4+CD25+CD127- eine signifikant höhere Anzahl an Tregs bei Kindern mit AD nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch bestätigt werden, dass die Population der CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen der Population der CD4+CD25+CD127- T-Zellen entspricht [103].

Nachdem in der vorliegenden Studie eine deutlich erhöhte Frequenz der Tregs bei Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis aufgezeigt werden konnte, wurde ebenfalls die Funktionsfähigkeit dieser Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Supressorfunktion von Tregs bei Kindern mit schwerster atopischer Dermatitis deutlich vermindert war. Bellinghausen et al. hingegen zeigten, dass es keinen Unterschied in der Häufigkeit und Funktion der CD4+CD25+ T-Zellen zwischen den von ihnen untersuchten Patienten mit atopischen Erkrankungen und der nicht-atopischen Kontrollgruppe gab [103]. Es wurde diskutiert, dass dies an einer mangelnden Unterscheidung zwischen aktivierten T-Zellen und tatsächlichen Tregs liegen könnte [103]. Ou et al. [117] untersuchten die Frequenz und Funktion von CD4+CD25+ T-Zellen in adulten Patienten mit atopischer Dermatitis oder allergischem Asthma und in einer nicht-atopischen Kontrollgruppe. Sie fanden, dass die Frequenz der CD4+CD25+ T-Zellen bei Patienten mit AD, im Vergleich zu Patienten mit allergischem Asthma, signifikant erhöht war. Sie zeigten zudem, dass CD4+CD25+ T-Zellen adulter AD Patienten die gleichen suppressiven Eigenschaften besaßen wie CD4+CD25+ T-Zellen der Vergleichsgruppen. Dazu wurden mit Thymidin markierte CD25- T-Zellen mit Anti-CD3 stimuliert

und die Zellteilungsrate nach Zugabe von CD25<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Ein weiterer Versuch zeigte allerdings, dass nach Stimulation der CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit dem Staphylokokken Superantigen jegliche suppressive Funktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen erloschen war [117].

Der Grund für die kontroversen Ergebnisse könnte einerseits die als Tregs klassifizierte Zellpopulation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen sein und zum anderen die zugrunde liegende Methodik [103, 117].

### 5.3 Rolle der Aktivierungs- und Gedächtnismarker CD25, CD45RO/RA und CCR7

In der vorliegenden Arbeit wurden die Populationen von CD25<sup>hi</sup>, CD25<sup>int</sup> und CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Gruppe der CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen bei Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis sowie einer gesunden Vergleichsgruppe untersucht. Das Resultat ergab, dass der prozentuale Anteil von CD25<sup>hi</sup> Zellen in der Gruppe der CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen bei Kindern mit AD wesentlich höher war als in der Kontrollgruppe. Andererseits war der Anteil CD25<sup>int</sup> T-Zellen in der Subpopulation der CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen der Patienten mit atopischer Dermatitis signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

Den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T-Zellen in der Subpopulation der CD45RO<sup>+</sup> Zellen beim adulten Menschen sowie der CD45RA<sup>+</sup> naiven Subpopulation bei Kindern wird eine ähnliche regulatorische Funktion zugeschrieben wie den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen. Aufgrund dieser regulatorischen Eigenschaften liegt eine Beteiligung dieser Zellpopulation an der Pathogenese von Allergien und Autoimmunerkrankungen nahe [66].

Tregs exprimieren unterschiedliche Phänotypen in verschiedenen Organsystemen. Die Expression der unterschiedlichen Phänotypen lässt wiederum Rückschlüsse auf ihre physiologische Funktion zu.

Nach ihrer Selektion im Thymus entwickeln sich CD45RO<sup>+</sup> Tregs und wandern in die Peripherie. Während dieses Prozesses akquirieren sie die Expression von CD45RA. Seddiki et al. beschrieben, dass CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen im Thymus, im Nabelschnurblut und im peripheren Blut von Erwachsenen als

Anteil der regulatorischen T-Zell Subpopulation angesehen werden können [66]. Die Quantifizierung von *FOXP3* mRNA in der CD25+CD45RA-/RO+ Subpopulation aus dem Blut erwachsener Probanden und der CD25+CD45RA+/RO- Subpopulation aus dem Nabelschnurblut ergab wesentlich höhere Werte als für naive Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD25<sup>lo</sup> und CD25<sup>int</sup> in CD45RO+ Zellen aus Nabelschnurblut und aus dem Blut adulter Probanden um ein vielfaches mehr *FOXP3* mRNA exprimieren als naive CD25-CD45RA+ Zellen. Die uneingeschränkte Suppressionsfähigkeit der CD45RO+ sowie der CD45RA+ Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden [66].

Die Anzahl der Tregs in der Population der naiven Zellen und der Gedächtniszellen variiert bei gesunden Erwachsenen altersabhängig sehr stark. Folglich könnte eine Verminderung der Tregs in der Subpopulation der naiven CD4+ T-Zellen auf einen Rückgang in der Produktion im Thymus oder aber auf eine kürzere Lebenserwartung zurückzuführen sein [66]. Da in der vorliegenden Studie die Anzahl der CD45RO+ regulatorischen T-Zellen allerdings erhöht war, könnte man davon ausgehen, dass wie in der Population der CD4+CD25+FoxP3+CD127- Zellen, die regulatorischen Zellen der Patienten mit AD zwar in einem höheren Maß produziert werden, ihre Suppressorfunktionen allerdings nicht ausführen können bzw. andere CD45RO unabhängige Faktoren mit eine Rolle spielen [66].

Die Quantifizierung des Anteils naiver Tregs im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass AD Patienten signifikant weniger naive Tregs besaßen als die gesunde Kontrollgruppe. Demgegenüber war der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen an der Population der Tregs im Patientenkollektiv dreimal höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Der geringere Anteil der naiven T-Zellen bei den Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis, könnte auf ein geringes Output der naiven Zellen aus dem Thymus zurückzuführen sein oder auf eine zu frühe Reifung der naiven Tregs, die dadurch einen Teil ihrer regulatorischen Funktion verlieren. Des Weiteren könnte der vergleichsweise hohe Anteil der Effektor-Gedächtniszellen in der Population der Tregs der Patienten mit AD dadurch bedingt sein, dass es bei der AD, einer chronisch-inflammatorischen

Hauterkrankung, immer wieder zur Stimulation dieser Zellen kommt wodurch der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen gegenüber dem Anteil der naiven T-Zellpopulation ansteigt.

#### 5.4 CD95 - Wie wichtig ist Apoptose?

Am Ende einer durch Infektion hervorgerufenen, sich selbst limitierenden Immunantwort werden die meisten reaktiven T-Zellen durch Apoptose vernichtet. Eine kleine Population überlebt allerdings und differenziert sich weiter zu Gedächtniszellen [118-120]. Die Apoptose der durch Antigene aktivierten T-Zellen ist ein wichtiger Vorgang, um die Ansammlung von zytokinproduzierenden und damit schädigenden Zellen zu verhindern [17]. Bei chronischen Entzündungen dagegen werden die durch Antigen aktivierten T-Zellen oder autoreaktiven T-Zellen nicht durch Apoptose eliminiert, so dass die in Gang gesetzte Immunreaktion weiter unterhalten wird [17-20]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von CD95 auf den CD4+CD25+ T-Zellen bei Patienten mit AD und einer gesunden Kontrollgruppe vergleichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Patienten mit atopischer Dermatitis die Population der CD4+CD25+CD95+ T-Zellen signifikant geringer war als bei der gesunden Kontrollgruppe. Dies weist daraufhin, dass möglicherweise ein Fehler in der Apoptosefunktion der CD4+CD25+ T-Zellen bei Patienten mit AD vorliegt. Des Weiteren exprimierte die Subpopulation der CD25<sup>int</sup> Zellen der Patienten mit AD kein CD95. Da CD25<sup>int</sup> auch regulatorische Eigenschaften besitzen, könnte man daraus schließen, dass die Apoptosefunktion bei der regulatorischen Subpopulation deutlich vermindert ist.

Allerdings handelte es sich bei dem Patientenkollektiv um teilweise mit Azathioprin behandelte Kinder, was möglicherweise die CD95 Expression beeinflussen könnte. Die Auswertungen wiesen allerdings keine Extremwerte bei den mit Azathioprin behandelten Kindern auf. Die Werte für die behandelten Patienten lagen konstant im Bereich der Werte der unbehandelten Patienten. Eine Studie von Braun et. al über die Behandlung von MS Patienten mit einer



Kombinationstherapie, die unter anderem Azathioprin beinhaltete zeigte, dass Azathioprin keinen Einfluss auf den CD95-Gehalt im Serum der untersuchten Patienten hatte [121]. Dies untermauert die Annahme, dass die Behandlung mit Azathioprin keinen Einfluss auf die CD95 Expression hatte und die erzielten Ergebnisse daher durchaus repräsentativen Charakter haben.

Nicht nur eine insuffiziente Apoptosefunktion CD4+CD25+ T-Zellen sondern auch anderer T-Zellpopulationen könnte in der Pathogenese der AD eine wichtige Rolle spielen.

Eine Studie von Orteu et al. zeigte, dass der CD95L auf den T-Zell-Infiltraten der Hautläsionen von Patienten mit AD nur in geringem Maße exprimiert wurde. Dies lässt auf eine Persistenz der aktivierten T-Zellen in den, durch AD verursachten, Hautläsionen schließen [118]. Auch Akdis et al. zeigten, dass eine fehlgesteuerte Apoptosefunktion der Effektorzellen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der AD spielt. Eine Dysregulation der Apoptose resultierte hier in einer verlängerten Lebensdauer der eosinophilen Zellen und einer erhöhten Apoptoserate der Keratinozyten. Ebenfalls führte die pathologische Apoptosefunktion zu einer uneinheitlichen Lebensdauer der T-Zellen des peripheren Blutes gegenüber den T-Zellen der Hautinfiltrate [122]. Sowohl der Fas-Ligand als auch der Fas-Rezeptor wurden auf CLA+CD45RO+ T-Zellen aus dem peripheren Blut vermehrt exprimiert und wurden somit durch Apoptose vernichtet. CLA negative Zellen dagegen exprimierten weder den Fas-Liganden noch den Fas-Rezeptor [123]. Im Gegensatz dazu exprimierten T-Zellen, die in den Hautläsionen der Patienten mit AD aufzufinden waren den CD95L und CD95R. Anzeichen der Apoptose konnte allerdings nicht gefunden werden. Vielmehr wurde die Apoptose von den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-15 inhibiert, was zu einer erhöhten Überlebensrate der T-Zellen in den Hautläsionen führte [124]. Eine weitere Studie von Sohn et al. untersuchte die Fas vermittelte Apoptose in MNZs bei Kindern mit AD unter dem Einfluss von Staphylococcus Enterotoxin B (SEB). MNZs von Kindern, mit einer milden Form der AD, einer extremen Form der AD oder von einem gesunden Kontrollkollektiv, wurden isoliert und 48h mit oder ohne Zugabe von SEB kultiviert. Danach erfolgte die Färbung der Oberflächenrezeptoren mit Antikörpern gegen CD3 und CD95.

Sohn et. al konnten zeigen, dass bei den Kindern mit AD CD95 auf einem größeren Teil der CD3+ Zellen exprimiert wurde als bei der gesunden Kontrollgruppe, sowohl mit als auch ohne Stimulation durch SEB [125]. Im Gegensatz dazu konnte nach der initialen Isolierung der MNZs kein Unterschied hinsichtlich der Expression von CD95 festgestellt werden.

Bisher sind keine weiteren Studien publiziert, die das Apoptoseverhalten von regulatorischen T-Zellen bei allergischen oder autoimmunologischen Erkrankungen untersuchen. Dies kann nicht zuletzt an den kontroversen Ergebnissen über die Anzahl der Tregs bei Patienten mit atopischer Dermatitis liegen. In der vorliegenden Studie weist allerdings die verminderte Anzahl CD95 exprimierender CD4+CD25+ T-Zellen sowie der Überschuss an funktionell defizienten Tregs bei den Kindern mit AD auf einen möglichen Zusammenhang dieser beiden Eigenschaften hin.

## 5.5 Perspektiven: Regulatorische T-Zellen in der klinischen Anwendung

Eine unzureichende Funktion der Tregs wird immer häufiger in Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen gebracht. Dazu gehören zum Beispiel Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I, Rheumatoide Arthritis und diverse andere Autoimmunerkrankungen [112, 126, 127]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass funktionelle Tregs zur Therapie dieser Erkrankungen eingesetzt werden können. Die Anwendung dieser Zellen zur

- 1) Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Überempfindlichkeitsreaktionen
- 2) Vermeidung von Graft-versus-Host Reaktionen,
- 3) Gewährleistung einer Toleranzentwicklung gegen Fremd-Transplantate,

birgt neben potentiellen Vorteilen aber auch schwerwiegende Nachteile und Risiken. Mögliche Nachteile könnten unter anderem sein, dass sich Tregs wieder in T-Effektorzellen umwandeln oder dass die natürliche Immunantwort

auf Infektionen schwerwiegend unterdrückt wird. Des Weiteren könnte der Einsatz von Tregs zum Auftreten von malignen Tumorerkrankungen beitragen. Durch den Gebrauch von CD3 und CD28 Antikörpern sowie von IL-2 konnten *ex vivo* isolierte Tregs in Zellkultur expandiert werden [128, 129]. Tregs konnten in 2-3 Wochen um ein Vielfaches (200-300x) vermehrt werden. Diese *in vitro* kultivierten Zellen exprimieren eine Reihe von Treg spezifischen Oberflächenmerkmalen, wie zum Beispiel CD25, CD62L, HLA-DR, CTLA4, GITR und vor allem den Treg spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3. Des Weiteren weisen sie Treg spezifische Eigenschaften auf. Dazu gehört unter anderem die Suppression der Proliferation aktivierter T-Effektorzellen [130].

Tatsächlich können isolierte Tregs ungewollte immunologische Reaktionen bei der Graft-versus-Host-disease (GvHD) und Colitis ulcerosa im Mausmodell effizient verhindern [131, 132]. Ob das auch für die Applikation im Menschen Gültigkeit hat bleibt abzuwarten.

Allogene Knochenmarkstransplantationen werden als potentiell kurative Therapie bei hämatopoetischen Krankheiten eingesetzt. Die Knochenmarkstransplantation hat allerdings einen entscheidenden, limitierenden Faktor - die hohe Inzidenz von GvHD und deren schwerwiegenden Folgen. Versuche, die GvHD durch das Eliminieren von T-Zellen aus dem Spender-Knochenmark zu verhindern, blieben ohne Erfolg und hatten eine herabgesetzte Toleranz des Knochenmarks und die Wiederkehr der Grunderkrankung zur Folge. Hanash und Levy zeigten im Maus-Modell, dass polyklonale Tregs die Toleranz gegenüber allogenen hämatopoetische Stammzellen verstärken und eine GvHD ausbleibt [133].

Es ist schon seit längerem bekannt, dass ungefähr 10% der Zellen des adulten CD4+CD45RO+ T-Zell Repertoires mit allogenen MHC-Molekülen kreuzreagieren und dass in Kultur expandierte Tregs die gemischte Lymphozyten Reaktion *in vitro* effizient supprimieren [134]. Folglich haben Studien an Tieren eine vielversprechende Grundlage für die klinische Anwendung der antigenunspezifischen Tregs bei Knochenmarkstransplantationen geschaffen. Dies liegt vor allem an der

Tatsache, dass expandierte Tregs *in vivo* ihre Alloreaktivität, ihre Homing- und Expansionsfähigkeiten sowie ihre Effizienz beibehalten.

Obwohl es wahrscheinlich ist, dass die Prävention der GvHD die erste klinische Anwendung von Tregs sein wird, könnten auch andere Krankheiten von einer solchen Immuntherapie profitieren. Zum Beispiel könnten polyklonale Tregs zur Behandlung von systemischen Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Systemischen Lupus erythematodes [72] oder bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden.

Eine weitere Möglichkeit für den Einsatz von Tregs sind Infektionskrankheiten, bei denen die Pathogenität nicht direkt auf das Pathogen zurückzuführen ist, sondern auf den Gewebedefekt, der durch die Immunreaktion verursacht wird. In durch Viren verursachten Autoimmunerkrankungen könnte die Therapie mit antigenspezifischen Tregs eine einzigartige Möglichkeit darstellen, diese inflammatorischen Erkrankungen einzuschränken [135].

Neben den kurativen Ansätzen sollte man dennoch die technischen sowie medizinischen und ethischen Probleme nicht vernachlässigen. Wie bei allen Zelltherapien birgt auch die Anwendung von Tregs das Risiko der unkontrollierten Zellproliferation und die Entwicklung von unvorhersehbaren, funktionellen Aktivitäten.

Immer mehr Studien beschäftigen sich mit der therapeutischen Applikation von T-Zellen [136] und bisher wurden keine wesentlichen Zwischenfällen berichtet. Folglich könnte man sagen, dass es relativ sicher ist expandierte T-Zellen *in vivo* zu therapeutischen Zwecken zu nutzen, so lange man davon ausgehen kann, dass sich diese Zellen nicht zu Effektorzellen differenzieren. Um diesem Problem aus dem Weg zu gehen, ist es notwendig verlässliche Methoden zu entwickeln, die menschliche Tregs identifizieren sowie die Reaktion der Tregs *in vivo* so detailliert wie möglich vorhersagen können. Letztendlich ist stets zu bedenken, dass eine große Anzahl an Tregs das Risiko ein Krebsleiden zu entwickeln erheblich steigern könnten und dass der Betroffene nicht mehr in der Lage ist auf Infektionen in ausreichendem Maße zu reagieren.

In den letzten Jahren hat sich zunehmend die Kenntnis entwickelt, dass Tregs zu den Hauptregulatoren des Immunsystems gehören. Deshalb versucht man

Mittel und Wege zu finden, sie zur Therapie verschiedener Erkrankungen einsetzen zu können. Sollte es gelingen, diese Zellen unter Beibehaltung ihrer regulatorischen Eigenschaften *ex vivo* zu expandieren oder deren Proliferation *in vivo* zu induzieren, wäre eine neue hoch-potente Immuntherapie verfügbar. Diese Therapie könnte zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Infektionskrankheiten sowie in der Transplantationsmedizin eingesetzt werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Wichtigkeit regulatorischer T-Zellen bei der Immunregulation und der Entwicklung der immunologischen Toleranz ist unumstritten. Deshalb wird ihnen eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und allergischen Erkrankungen zugeschrieben.

Bei allgemein steigender Prävalenz allergischer Erkrankungen bleiben verfügbare Therapieoptionen derzeit auf symptomatische Regime begrenzt. Dies ist nicht zuletzt auf die unklare Genese dieser Erkrankungen zurückzuführen. Bei der AD handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die im Säuglingsalter beginnt und durch sehr starken Juckreiz gekennzeichnet ist. Um der AD zugrundeliegenden Mechanismen zumindest teilweise zu durchleuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit Frequenz, Funktion und Phänotyp der regulatorischen T-Zellen von Kindern zwischen drei und 16 Jahren, die an der schwersten Form der AD leiden, unter Anwendung spezieller Färbemethoden und eines Suppressionsassay mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen bei den Kindern mit AD gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv vorhanden war. Diese wiesen allerdings eine deutlich verminderte Suppressorfunktion auf. Die Analyse der Oberflächenmerkmale CD45RO und CD45RA zeigte, dass der Anteil CD25<sup>hi</sup> in der Population CD45RO+ T-Zellen bei den Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis signifikant höher war als im Kontrollkollektiv. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Anteil naiver Tregs in der Patientengruppe deutlich niedriger war als bei der Kontrollgruppe. Demgegenüber war der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen in der Patientengruppe signifikant höher als in der Vergleichsgruppe. Die Untersuchung des Todesrezeptors CD95 ergab, dass die Population CD95+CD4+CD25+ T-Zellen der Patienten signifikant geringer war als bei dem gesunden Kontrollkollektiv.

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass bei Patienten mit AD Tregs zwar in ausreichendem Maße produziert werden, sie aber funktionell insuffizient sind. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen auf genetischer Ebene sowie mögliche, involvierte Signaltransduktionswege gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen. Des Weiteren beschreiben die Resultate ein gestörtes Gleichgewicht zwischen naiven Tregs und Gedächtniszellen. Das heißt, dass der größere Anteil der Effektor-Tregs sich zu Effektor-Gedächtniszellen entwickelt, die in ihrer Funktion aber möglicherweise eingeschränkt sind. Die geringere Anzahl CD95 exprimierender regulatorischer T-Zellen in der Patientengruppe lässt eine Fehlregulation der Apoptose vermuten, was wiederum die erhöhte Anzahl dieser Zellen erklären könnte.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Studie Hinweise darauf, dass Tregs eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis spielen. Die zugrundeliegenden Mechanismen allerdings müssen in weiteren Studien untersucht und identifiziert werden, um sie zukünftig als Angriffsziel therapeutischer Ansätze nutzen zu können.





## 7. Literaturverzeichnis

1. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
2. Poulsen, L.K. and L. Hummelshoj, *Triggers of IgE class switching and allergy development*. Ann Med, 2007. **39**(6): p. 440-56.
3. Michie, A.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection*. Semin Immunol, 2002. **14**(5): p. 311-23.
4. von Boehmer, H., *Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development*. Adv Immunol, 2004. **84**: p. 201-38.
5. Surh, C.D. and J. Sprent, *Regulation of mature T cell homeostasis*. Semin Immunol, 2005. **17**(3): p. 183-91.
6. Sprent, J., et al., *T cell homeostasis*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 312-9.
7. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
8. Ojdana, D., et al., *Effector and memory CD4+ and CD8+ T cells in the chronic infection process*. Folia Histochem Cytobiol, 2008. **46**(4): p. 413-7.
9. Bushar, N.D. and D.L. Farber, *Recalling the year in memory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 212-25.
10. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity*. Arthritis Res Ther, 2008. **10 Suppl 1**: p. S3.
11. Maldonado, R.A., et al., *Control of T helper cell differentiation through cytokine receptor inclusion in the immunological synapse*. J Exp Med, 2009. **206**(4): p. 877-92.
12. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
13. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, *Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 349-56.

14. Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis, *CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 39-48.
15. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
16. Weninger, W., N. Manjunath, and U.H. von Andrian, *Migration and differentiation of CD8+ T cells*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 221-33.
17. De Panfilis, G., '*Activation-induced cell death*': a special program able to preserve the homeostasis of the skin? Exp Dermatol, 2002. **11**(1): p. 1-11.
18. Salmon, M., et al., *Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 439-46.
19. Gibbs, J.H., et al., *Histometric study of the localisation of lymphocyte subsets and accessory cells in human Mantoux reactions*. J Clin Pathol, 1984. **37**(11): p. 1227-34.
20. Kapsenberg, M.L., et al., *Functional subsets of allergen-reactive human CD4+ T cells*. Immunol Today, 1991. **12**(11): p. 392-5.
21. De Panfilis, G., et al., *Identification of Fas-L-expressing apoptotic T lymphocytes in normal human peripheral blood : in vivo suicide*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 387-91.
22. van der Burg, M., et al., *Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease?* Pediatr Res, 2000. **47**(3): p. 336-43.
23. Bader-Meunier, B., et al., *Dyserythropoiesis associated with a fas-deficient condition in childhood*. Br J Haematol, 2000. **108**(2): p. 300-4.
24. Bleesing, J.J., S.E. Straus, and T.A. Fleisher, *Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A human disorder of abnormal lymphocyte survival*. Pediatr Clin North Am, 2000. **47**(6): p. 1291-310.
25. Ahmadzadeh, M., S.F. Hussain, and D.L. Farber, *Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 926-35.

26. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
27. Hogan, R.J., et al., *Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1813-22.
28. Kallies, A., *Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 325-32.
29. Kalia, V., et al., *Differentiation of memory B and T cells*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 255-64.
30. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
31. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty, *CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 809-17.
32. Stemberger, C., et al., *Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(6): p. 399-405.
33. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Understanding the generation and function of memory T cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 326-32.
34. Hikono, H., et al., *Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1625-36.
35. Moulton, V.R., et al., *Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 869-76.
36. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
37. Woodland, D.L. and J.E. Kohlmeier, *Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 153-61.
38. Sprent, J. and C.D. Surh, *Generation and maintenance of memory T cells*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 248-54.

39. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 816-22.
40. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
41. Mason, D. and F. Powrie, *Control of immune pathology by regulatory T cells*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(6): p. 649-55.
42. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 28-50.
43. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
44. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
45. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
46. Walker, M.R., et al., *De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4103-8.
47. Chatenoud, L. and J.F. Bach, *Adaptive human regulatory T cells: myth or reality?* J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2325-7.
48. Vukmanovic-Stejic, M., et al., *Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2423-33.
49. Banham, A.H., F.M. Powrie, and E. Suri-Payer, *FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2832-6.
50. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
51. Schneider, M.A., et al., *CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 735-45.

52. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. Trends Mol Med, 2007. **13**(3): p. 108-16.
53. Huber, S., et al., *Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6526-31.
54. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
55. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
56. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
57. Bacchetta, R., E. Gambineri, and M.G. Roncarolo, *Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 227-35; quiz 236-7.
58. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(4): p. 735-46; quiz 747-8.
59. Ziegler, S.F., *FOXP3: of mice and men*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 209-26.
60. Allan, S.E., et al., *The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3276-84.
61. Piccirillo, C.A., *Regulatory T cells in health and disease*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 395-401.
62. Ochs, H.D., S.F. Ziegler, and T.R. Torgerson, *FOXP3 acts as a rheostat of the immune response*. Immunol Rev, 2005. **203**: p. 156-64.
63. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(4): p. 430-5.

64. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
65. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
66. Seddiki, N., et al., *Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2830-8.
67. Walker, M.R., et al., *Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1437-43.
68. Morgan, M.E., et al., *Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans*. Hum Immunol, 2005. **66**(1): p. 13-20.
69. Roncador, G., et al., *Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1681-91.
70. Valmori, D., et al., *A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1953-62.
71. Kriegel, M.A., et al., *Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II*. J Exp Med, 2004. **199**(9): p. 1285-91.
72. Crispin, J.C., A. Martinez, and J. Alcocer-Varela, *Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. J Autoimmun, 2003. **21**(3): p. 273-6.
73. Furuno, K., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease*. J Pediatr, 2004. **145**(3): p. 385-90.
74. Averbeck, M., et al., *Immunologic principles of allergic disease*. J Dtsch Dermatol Ges, 2007. **5**(11): p. 1015-28.
75. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.

76. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 961-8; quiz 969.
77. Jung, T. and G. Stingl, *Atopic dermatitis: therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(6): p. 1074-81.
78. Spergel, J.M. and A.S. Paller, *Atopic dermatitis and the atopic march*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6 Suppl): p. S118-27.
79. Kemp, A.S., *Atopic eczema: its social and financial costs*. J Paediatr Child Health, 1999. **35**(3): p. 229-31.
80. Eichenfield, L.F., et al., *Atopic dermatitis and asthma: parallels in the evolution of treatment*. Pediatrics, 2003. **111**(3): p. 608-16.
81. Kay, J., et al., *The prevalence of childhood atopic eczema in a general population*. J Am Acad Dermatol, 1994. **30**(1): p. 35-9.
82. Zuberbier, T., et al., *Patient perspectives on the management of atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 226-32.
83. Su, J.C., et al., *Atopic eczema: its impact on the family and financial cost*. Arch Dis Child, 1997. **76**(2): p. 159-62.
84. Reid, P. and M.S. Lewis-Jones, *Sleep difficulties and their management in preschoolers with atopic eczema*. Clin Exp Dermatol, 1995. **20**(1): p. 38-41.
85. Chamlin, S.L., *The psychosocial burden of childhood atopic dermatitis*. Dermatol Ther, 2006. **19**(2): p. 104-7.
86. Roth, N., et al., *Coincidence of attention deficit disorder and atopic disorders in children: empirical findings and hypothetical background*. J Abnorm Child Psychol, 1991. **19**(1): p. 1-13.
87. Moldofsky, H., *Evaluation of daytime sleepiness*. Clin Chest Med, 1992. **13**(3): p. 417-25.
88. Dahl, R.E., et al., *Sleep disturbances in children with atopic dermatitis*. Arch Pediatr Adolesc Med, 1995. **149**(8): p. 856-60.

89. Daud, L.R., M.E. Garralda, and T.J. David, *Psychosocial adjustment in preschool children with atopic eczema*. Arch Dis Child, 1993. **69**(6): p. 670-6.
90. Hanifin, J.M., et al., *The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis*. EASI Evaluator Group. Exp Dermatol, 2001. **10**(1): p. 11-8.
91. Barbier, N., et al., *Validation of the Eczema Area and Severity Index for atopic dermatitis in a cohort of 1550 patients from the pimecrolimus cream 1% randomized controlled clinical trials programme*. Br J Dermatol, 2004. **150**(1): p. 96-102.
92. Rhodes, H.L., et al., *A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 176-80.
93. Rhodes, H.L., et al., *Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 720-5.
94. Gustafsson, D., O. Sjoberg, and T. Foucard, *Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis--a prospective follow-up to 7 years of age*. Allergy, 2000. **55**(3): p. 240-5.
95. Akdis, C.A., et al., *Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report*. Allergy, 2006. **61**(8): p. 969-87.
96. Boguniewicz, M., P. Schmid-Grendelmeier, and D.Y. Leung, *Atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 40-3.
97. Romagnani, S., *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 395-400.
98. Robinson, D.S., M. Larche, and S.R. Durham, *Tregs and allergic disease*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1389-97.
99. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *The role of regulatory T cells in allergy*. Springer Semin Immunopathol, 2004. **25**(3-4): p. 295-310.



100. Lee, Y.A., et al., *A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 470-3.
101. Bradley, M., et al., *Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(13): p. 1539-48.
102. Romagnani, S., *Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(6): p. 1511-3.
103. Bellinghausen, I., et al., *Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 862-8.
104. Tiemessen, M.M., et al., *CD4 CD25 regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6): p. 934-6.
105. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1679-88.
106. Jartti, T., et al., *Association between CD4(+)CD25(high) T cells and atopy in children*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 177-83.
107. Santner-Nanan, B., et al., *Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype*. Int Immunol, 2008. **20**(3): p. 375-83.
108. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
109. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
110. Kukreja, A., et al., *Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 131-40.
111. van Amelsfort, J.M., et al., *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function*

- between peripheral blood and synovial fluid. Arthritis Rheum, 2004. 50(9): p. 2775-85.*
112. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J Exp Med, 2004. 200(3): p. 277-85.*
  113. Huang, Y.M., et al., *Circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis and in relation to thymectomy. Scand J Immunol, 2004. 59(4): p. 408-14.*
  114. Putheti, P., et al., *Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. J Clin Immunol, 2004. 24(2): p. 155-61.*
  115. Sadlack, B., et al., *Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell, 1993. 75(2): p. 253-61.*
  116. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. J Exp Med, 1995. 181(4): p. 1519-26.*
  117. Ou, L.S., et al., *T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(4): p. 756-63.*
  118. Orteu, C.H., et al., *The inhibition of cutaneous T cell apoptosis may prevent resolution of inflammation in atopic eczema. Clin Exp Immunol, 2000. 122(2): p. 150-6.*
  119. Krammer, P.H., et al., *Regulation of apoptosis in the immune system. Curr Opin Immunol, 1994. 6(2): p. 279-89.*
  120. Akbar, A.N. and M. Salmon, *Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. Immunol Today, 1997. 18(2): p. 72-6.*
  121. Braun Hashemi, C.A., et al., *Serum immunologic markers in multiple sclerosis patients on continuous combined therapy with beta-interferon 1a, prednisone and azathioprine. Mult Scler, 2006. 12(5): p. 652-8.*
  122. Akdis, C.A., et al., *Immune regulation in atopic dermatitis. Curr Opin Immunol, 2000. 12(6): p. 641-6.*

123. Akdis, M., et al., *Life span of skin homing T cells in atopic dermatitis: survival in skin, activation induced apoptosis in peripheral blood.* . J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(167).
124. Morales, J., et al., *CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14470-5.
125. Sohn, M.H., et al., *Staphylococcal enterotoxin B upregulates fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in childhood atopic dermatitis.* Scand J Immunol, 2003. **57**(1): p. 62-7.
126. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.* J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
127. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.* Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
128. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells.* Blood, 2004. **104**(3): p. 895-903.
129. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3493-9.
130. Bluestone, J.A., *Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic?* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 343-9.
131. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.* J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
132. Hanash, A.M. and R.B. Levy, *Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1828-36.
133. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia.* J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1688-96.

134. Godfrey, W.R., et al., *In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures*. Blood, 2004. **104**(2): p. 453-61.
135. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4123-32.
136. Levine, B.L., et al., *Adoptive transfer of costimulated CD4+ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 47-53.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig bedanken, dass er mir ermöglicht hat den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit in Sydney, Australien zu absolvieren. Ganz besonders möchte ich mich für die ausdauernde wissenschaftliche Beratung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Hamm danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Ralph Nanan für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die Unterstützung bei der praktischen und theoretischen Umsetzung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Brigitte Santner-Nanan für die ausgezeichnete Betreuung im Labor während meines Aufenthalts in Sydney.

Mein größter Dank gilt meiner gesamten Familie, die auf ihre Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Schwester Annalena bedanken, die mich unermüdlich und uneingeschränkt unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium sowie den Auslandsaufenthalt in Australien ermöglicht haben und mir mit ihrem Verständnis, ihrer Kraft und ihrer Ausdauer liebevoll zur Seite standen.

Meinem lieben Mann Johannes danke ich von ganzem Herzen für seine Unterstützung, seine Liebe und Motivation.

