

Toleranz gegen Nickel-Salze erfordert die Beteiligung von
NKT-Zellen und eines spezifischen Zytokinmilieus in
sekundären lymphoiden Organen.

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Kopp

aus Leverkusen

Düsseldorf, den 07.03.2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. E. Gleichmann
Korreferent: Prof. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2005

Für meine Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 BEDEUTUNG DER NICKELALLERGIE.....	9
1.1.2 Physiologische Rolle von Nickel.....	9
1.2 ENTSTEHUNG DER NICKELALLERGIE.....	10
1.2.1 Mechanismus der T-Zellaktivierung.....	10
1.2.2 Rolle der APZ bei der Induktion der Immunantwort.....	10
1.2.3 Bedeutung der Kostimulation.....	11
1.2.3.1 Aufregulierung der Kostimulation durch Gefahrensignale.....	11
1.2.3.2 Antigenerkennung ohne Kostimulation führt zur Anergie der T-Zellen.....	11
1.2.3.4 Aktivierende und inhibierende kostimulatorische Moleküle.....	12
1.2.4 Nickel: ein besonderes Antigen.....	12
1.2.5 Mechanismus der T-Zellaktivierung durch Nickel.....	14
1.2.6 Unterschiedliche T-Zellsubpopulationen tragen zur Nickelallergie bei.....	15
1.2.7 Bindung von Ni ²⁺ an Trägerproteine.....	16
1.2.8 Die Induktion von Toleranz.....	17
1.2.9 Eigenschaften und Funktion von Treg-Zellen.....	18
1.2.9.1 Entwicklung von Treg-Zellen.....	18
1.2.9.2 Oberflächenmoleküle von Treg-Zellen.....	18
1.2.9.2.1 CTLA-4.....	19
1.2.9.3 Funktion von Treg-Zellen.....	19
1.2.10 Eigenschaften und Funktion von NKT-Zellen.....	20
1.2.10.1 Die Entwicklung und die Effektorfunktionen von NKT-Zellen erfordern NF-κB.....	21
1.2.10.2 CD1d-Restriktion von NKT-Zellen.....	21
1.2.10.3 NKT-Zellen verschieben die Balance der Immunantwort von Th1 zu Th2.....	22
1.2.10.4 Gezielte Migration von NKT-Zellen.....	22
1.2.10.5 NKT-Zellen sind resistent gegen Apoptose.....	23
1.2.11 Funktion von IDO bei der Regulation von Immunreaktionen.....	24
1.2.11.1 Induktion von IDO durch pro-inflammatorische Zytokine.....	25
1.2.11.2 Funktionelle IDO-Expression erfordert die Aktivierung von DZ.....	26
1.2.11.3 Aufregulierung von IDO durch Liganden.....	26
1.2.11.3.1 Durch CTLA-4.....	26
1.2.11.3.2 Durch CD200.....	27
1.2.11.4 Wirkung von IDO.....	27
1.2.11.4.1 Verbrauch der essentiellen Aminosäure Tryptophan.....	27
1.2.11.4.2 Induktion der T-Zellapoptose durch Metabolite.....	28
1.2.12 Eigenschaften tolerogener DZ.....	28
1.2.12.1 DZ benötigen eine spezielle Mikroumgebung.....	29
1.2.12.2 Einfluß von Zytokinen auf die Funktion von DZ.....	30
1.2.12.3 Einfluß des Reifestadiums dendritischer Zellen.....	30
1.2.12.3.1 Unreife DZ.....	31
1.2.12.3.2 "Semi-mature" DZ.....	31
1.2.12.3.3 Reife DZ.....	31
1.2.12.4 Induktion tolerogener DZ durch Interaktion mit Treg-Zellen.....	32
1.1.12.5 Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigen induziert tolerogene DZ.....	32
1.2.13 Einfluß apoptotischer Zellen auf das Immunsystem.....	32
1.3 MÖGLICHE BEDEUTUNG VON UMWELTSTÄUBEN FÜR DIE SENSIBILISIERUNG GEGEN NICKEL.....	33
1.3.1 Unterteilung von PM.....	34
1.3.2 Quellen von PM.....	34
1.3.3 Umweltstäube als Adjuvans.....	34
1.3.4 Adjuvansfunktion der verschiedenen PM-Fractionen.....	35
1.3.4.1 Effekt der wasserunlöslichen PM-Fraktion.....	35
1.3.4.2 Effekt der wasserlöslichen PM-Fraktion.....	35
1.3.5 Verwendung von PM als Adjuvans zur Induktion der Nickelallergie.....	36
1.4 MAUSMODELL DER NICKELALLERGIE.....	36
1.4.1 Induktion der Hypersensitivität.....	36
1.4.2 Induktion der Toleranz gegen Nickel.....	37
1.4.3 Übertragung der Toleranz durch Zelltransfer.....	37
1.4.3.1 Beteiligung der "infektiösen Toleranz" am Transfer der Nickeltoleranz.....	38
1.4.3.2 Erfordernis von NKT-Zellen im Empfänger.....	38

FRAGESTELLUNGEN:	40
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 MÄUSE	41
2.2 SENSIBILISIERUNG, AUSLÖSUNG DER NICKELALLERGIE	41
2.3 MAUSOHRSCHWELLUNGSTEST (MEST)	41
2.4 INDUKTION DER TOLERANZ DURCH ORALE NICKELAPPLIKATION	41
2.5 PRÄPARATION VON LYMPHOZYTEN	42
2.5.1 Von Milzzellen	42
2.5.2 Von Lymphknotenzellen	42
2.5.3 Von Knochenmarkzellen	42
2.5.4 Bestimmung der Zellzahl	42
2.5.4.1 Neubauer-Zählkammer	42
2.5.4.2 CASYton®	43
2.6 MAGNETISCHE ZELLSEPARATION	43
2.6.1 Von T-Zellen durch negative Selektion	43
2.6.2 Von B-Zellen durch negative Selektion	43
2.7 GENERATION VON DZ AUS KNOCHENMARKZELLEN (BMDC)	43
2.8 STIMULATION VON BMDC	43
2.8.1 Stimulation von BMDC mit IFN- γ	43
2.8.2 Stimulation von BMDC durch UVB-Bestrahlung	43
2.8.3 Suspendierung der BMDC	44
2.9 ADOPTIVER TRANSFER VON SPENDERZELLEN	44
2.10 DURCHFLUßZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG VON ZELLEN	44
2.10.1 Verwendete Antikörper	44
2.10.2 Antikörperfärbung von Lymphozyten	44
2.10.3 Intrazelluläre Färbung	45
2.10.3.1 Von Zytokinen	45
2.10.3.2 Von IDO	45
2.10.4 CFSE-Färbung zur Beobachtung der Zellproliferation	45
2.10.5 Durchflußzytometrie	45
2.11 INDUKTION DER APOPTOSE DURCH GAMMA-BESTRAHLUNG	45
2.12 PRÄPARATION DER "APOPTOTIC BODIES" STERBENDER B-ZELLEN	45
2.13 PROTEINBESTIMMUNG VON "APOPTOTIC BODIES"	46
2.14 TRANSFER VON "APOPTOTIC BODIES"	46
2.15 ISOLATION VON TOTALER RNA	46
2.15.1 Extraktion mit TRIzol®-Prozedur	46
2.15.2 Bestimmung der RNA-Menge	47
2.15.3 Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese	47
2.16 CDNA-SYNTHESE MITTELS REVERSE TRANSKRIPTASE	47
2.17 ERSTELLUNG GENSPEZIFISCHER OLIGONUKLEOTID-PRIMER	47
2.18 PRIMERSEQUENZEN	48
2.19 SEMIQUANTITATIVE PCR	48
2.19.1 Durchführung der PCR	48
2.19.2 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte	48
2.19.3 Nachfärbung der Agarosegele	49
2.19.4 Auswertung mit Quantity One®	49
2.20 HERSTELLUNG VON STAUBSUSPENSIONEN ZUR <i>IN-VIVO</i> -ANALYSE	49
2.20.1 Verschiedene PM-Typen	49
2.20.2 Verwendete Filtertypen	49
2.20.3 Extraktion von PM von unterschiedlichen Filtertypen	49
2.20.3.1 NC-Filter	49
2.20.3.2 Teflon	50
2.20.3.3 Polyurethanschaum	50
2.21 APPLIKATION VON PM	50
2.21.1 In die Fußsohle	50
2.21.2 In die Flanke	50
2.22 PLN-ASSAY	50
2.23 PUFFER UND MEDIEN	51
3 ERGEBNISSE	53

3.1 LYMPHOZYTEN MIGRIEREN BEI SENSIBILISIERUNG IN LYMPHKNOTEN UND MILZ	53
3.2 VERGLEICH DER ZYTOKINEXPRESSION VERSCHIEDENER ARTEN VON B6-MÄUSEN	54
3.3 VERGLEICH DER ZYTOKINEXPRESSION NACH TRANSFER VON MILZZELLEN VERSCHIEDENER B6-MÄUSE... ..	57
3.4 MÖGLICHE AUSWIRKUNG DER ZYTOKINEXPRESSION AUF DENDRITISCHE ZELLEN	60
3.5 ROLLE DER APOPTOSE IN DER NICKELTOLERANZ	62
3.5.1 Sensibilisierung und Toleranzinduktion bei Fas-defizienten Mäusen	62
3.5.2 Sensibilisierung und Toleranzinduktion bei FasL-defizienten Mäusen	63
3.5.3 Übertragung der Toleranz durch Transfer von WT-Zellen in Fas und FasL defiziente Mäuse	65
3.5.3.1 Transfer der Toleranz durch Lymphozyten in Fas-defiziente Empfänger	65
3.5.3.2 Transfer der Toleranz durch Lymphozyten in FasL-defiziente Empfänger	66
3.5.3.3 Transfer von T-Zellen in FasL-Defiziente Mäuse	68
3.5.3.4 Transfer von B-Zellen in FasL-Defiziente Mäuse	69
3.5.4 Übertragung der Toleranz durch Zelltransfer von Fas und FasL defizienten Mäusen	71
3.5.4.1 Transfer von T-Zellen Fas-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger	71
3.5.4.2 Transfer von B-Zellen Fas-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger	72
3.5.4.3 Transfer von Milzzellen FasL-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger	73
3.5.4.4 Transfer von T-Zellen FasL-defizienter Tiere auf WT-Empfänger	74
3.6 ROLLE VON iNKT-ZELLEN IN DER NICKELALLERGIE	76
3.6.1 Transfer von B Zellen in iNKT-defiziente Empfänger	77
3.6.2 Übertragung der Nickeltoleranz durch Transfer von "apoptotic bodies" apoptotischer B-Zellen toleranter Spender – Funktion der iNKT-Zellen bei der Induktionsphase der Ni-Toleranz	79
3.6.2.1 Transfer von "apoptotic bodies" toleranter Spender-B-Zellen in WT-Empfänger	80
3.6.2.2 Transfer von "apoptotic bodies" in iNKT-Zell-defiziente Empfänger	82
3.7 PM ALS ADJUVANT	83
3.7.1 Vergleich verschiedener Filtermaterialien	84
3.7.2 Etablierung von Modellstaub SRM 1648	85
3.7.2.1 Vergleich des kommerziell erhältlichen Staubes SRM1648 mit einem gesammelten PM ₁₀ im PLN-Assay ...	85
3.7.2.2 Vergleich der Zytokinprofile nach Injektion von PM ₁₀ und Modellstaub SRM1648	87
3.7.3 Adjuvansfunktion von PM bei der Induktion der Nickelallergie	89
4 DISKUSSION	93
4.1 DER MECHANISMUS DER NICKELTOLERANZ	93
4.1.1 Die Induktionsphase der Nickeltoleranz	93
4.1.2 Aktivierung toleranter Zellen in den axillären Lymphknoten	93
4.1.3 Expression von IFN- γ während der Induktion der Toleranz	94
4.1.4 IFN- γ induziert die Expression des Tryptophan-abbauenden Enzyms IDO	95
4.1.5 Induktion der IDO-Expression durch UVB-Bestrahlung	97
4.1.6 Die Rolle der Apoptose in der Induktion der Nickeltoleranz	97
4.1.7 NKT-Zellen induzieren Apoptose während der Induktion der Nickeltoleranz	99
4.1.8 Die Übertragung der Toleranz durch "apoptotic bodies" erfordert NKT-Zellen	101
4.1.9 Weitere mögliche Funktionen von NKT-Zellen	103
4.1.10 Ausblick: Neue Möglichkeiten für künftige Transfers von "apoptotic bodies"	104
4.1.11 Hypothese der Toleranzinduktion unter Beteiligung des Tryptophankatabolismus	106
4.2 AUSWIRKUNGEN VON STÄUBEN AUF DAS IMMUNSYSTEM	108
4.2.1 In vivo Untersuchung von PM im PLN-Assay	108
4.2.2 Hintergrundreaktionen unterschiedlicher Filtermaterialien	108
4.2.3 Verwendung des Modellstaubes SRM1648 zur Etablierung des PLN-Assays	109
4.2.4 SRM1648 und PM ₁₀ induzieren vergleichbare Zytokinprofile	110
4.2.5 Adjuvansseffekt von PM bei der Induktion der Nickelallergie	110
ZUSAMMENFASSUNG	111
REFERENZEN	112

Abkürzungsverzeichnis

AA	Anthranylsäure
ACAID	Anterior Chamber-Associated Immune Deviation Model
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cell (Knochenmark-abgeleitete Dendritische Zelle)
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region
CLA	Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen
CTACK	Cutaneous T Cell-Attracting Chemokine
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4
DEP	Diesel Exhaust Particle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
FcR	Fc-Receptor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GIT-R	Glucocorticoid-Induced TNFR family-Related Gene
3-HAA	3-Hydroxyanthranylsäure
His	Histidin
3-HK	3-Hydroxykynurenin
HLA	Human Leucocyte Antigen (humane Histokompatibilitätskomplexe)
HSA	Humanes Serum Albumin
HSV	Herpes Simplex Virus
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	IFN- γ -inducible Protein 10 kDA
ITAC	IFN- γ -inducible T cell α -Chemoattractant
kg	Kilogramm
KYN	L-Kynurenin
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans Zelle
MBP	Myelin Basic Protein
MEST	Mouse Ear Swelling Test (Mausohrschwellungstest)
MIG	Monokine induced by IFN- γ
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
Ni	Chemische Abk. für Nickel
NiSO ₄	Nickel(II)sulfat
NKT-Zelle	"Natural Killer" T-Zelle
NK-Zelle	"Natural Killer"-Zelle
NO	Nitric Oxide
PLN	Popliteal Lymph Node (Poplitealer Lymphknoten)
PM	Particulate Matter
PRR	Pattern Recognition Receptors

QUIN	Quinolinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ROFA	Residual Oil Fly Ash
RTE	Recent Thymic Emigrant
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
TDO	Tryptophandioxygenase
TGF	Transforming Growth Factor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumour Necrosis Factor
TNFR	TNF-Receptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TNP	Trinitrophenol
TZR	T-Zellrezeptor
WWW	World Wide Web
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Nickelallergie

Die Nickelallergie ist eine der am häufigsten vorkommenden Allergien der heutigen Zeit. Etwa 20% der weiblichen und etwa 4% der männlichen Bevölkerung weisen eine Überempfindlichkeit gegenüber diesem Metall auf. Über eine eventuelle genetische Prädisposition der Nickelallergie ist bisher nichts bekannt. Bei der Nickelallergie handelt es sich auch um eine der häufigsten Berufskrankheiten. Besonders im Friseurhandwerk ist die Nickelallergie weit verbreitet, da das Metall der Scheren einen hohen Anteil Nickel enthält, beim Bleichen der Haare kommt die Haut in Kontakt mit Wasserstoffperoxid, welches ein starkes Oxidationsmittel ist und zur Bildung von Radikalen führt. Hier sind die gleichen Bedingungen vorhanden, die auch in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Mausmodell der Nickelallergie zum Tragen kommen. Aber auch der Umgang mit ganz alltäglichen Dingen bringt uns in Kontakt mit Nickel, denn Nickel ist eines der häufigsten Metalle in unserer Umwelt. Dies macht es sensibilisierten Menschen besonders schwer, den Kontakt mit Nickel zu vermeiden. Es ist ein häufiger Bestandteil vieler Metallegierungen, es kommt nicht nur in medizinischem Gerät wie Kathetern, Nadeln, chirurgischen Implantaten oder Zahnspangen, sondern auch in ganz alltäglichen Dingen wie Schmuck, Uhren und Münzen vor, sowie in manchen Nahrungsmitteln (Basketter, 1993). So setzen zum Beispiel die neuen 1- und 2- Euromünzen bedeutende Mengen an Nickelionen frei (Nestle, 2002), und Nahrungsmittel wie Sojabohnen, Nüsse, Kakao (demzufolge also auch Schokolade), Hülsenfrüchte, Muscheln, manche Fischarten, verschiedene Getreide, sowie Tee und Kaffee enthalten bedeutende Mengen an Nickel (WWW: Allergieinfo). Lebensmittel mit mehr als 50 Mikrogramm Nickel pro 100 Gramm sollten von Allergikern nur in Maßen verzehrt werden. Studien über Menschen, die in Nickel-verarbeitenden Betrieben oder Raffinerien arbeiten, zeigen ein wesentlich häufigeres Vorkommen von Lungen- und Nasenkrebs. Nickel wird auch in Tabak gefunden, es ist möglicherweise einer der karzinogenen Bestandteile im Tabakrauch. Wie bei allen Schwermetallen kann es bei extremer Überdosierung, die allerdings sehr selten ist, zu diversen schweren Vergiftungserscheinungen kommen.

Somit besteht in der Untersuchung der Nickelallergie und speziell der Induktion der Nickeltoleranz nicht nur ein wissenschaftliches, sondern auch ein volkswirtschaftliches Interesse. In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Induktionsphase der Nickeltoleranz gerichtet, welche durch die Untersuchung von Zytokinprofilen in Nickel-sensibilisierten und -toleranten Mäusen näher erforscht wurde, da die Art des exprimierten Zytokinprofils während des Kontakts mit Nickel großen Einfluß auf die Entscheidung zwischen Allergie oder Toleranz besitzt. Besonderer Wert wurde auf die Untersuchung der Funktion der unterschiedlichen an der Induktion der Nickeltoleranz beteiligten Zellarten gelegt.

1.1.2 Physiologische Rolle von Nickel

Im Körper eines Erwachsenen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 70 kg findet man einige Milligramm Nickel, das vor allem in hormonbildenden Drüsen, Lunge, Leber und Nieren vorkommt. Nickel ist Bestandteil einer Reihe von Enzymen wie der Urease. Die Urease spaltet Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak. Außerdem enthalten die Enzyme, die DNA und RNA bearbeiten oder stabilisieren, relativ viel Nickel. Der Nickelbedarf ist von individuellen Gegebenheiten abhängig und liegt bei maximal 50 µg pro Tag. Ein Mangel an Nickel führt zu einer Störung der Atmungskette (Zitronensäurezyklus), weil Nickel Bestandteil einiger der beteiligten Enzyme ist. Außerdem kann es zu einer Störung des Stoffwechsels beim Glukoseabbau kommen. Durch die Beteiligung von Nickel an der Urease, dem Enzym, das Harnstoff (Urea) abbaut, kommt es bei Nickelmangel möglicherweise zu einer Urämie, also einer erhöhten Harnstoffkonzentration im Blut (WWW, Allergieinfo).

1.2 Entstehung der Nickelallergie

1.2.1 Mechanismus der T-Zellaktivierung

Wird ein Antigen vom Körper als fremd erkannt, so kann es zur Sensibilisierung kommen. Für die Sensibilisierung ist zunächst die Aufnahme und Prozessierung des Antigens durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) erforderlich, gefolgt von der Präsentation der prozessierten Peptide dieser Proteine durch MHC-Moleküle auf der Oberfläche der APZ. Diese Moleküle werden von einer Gruppe von Genen kodiert, die als "major histocompatibility complex" bezeichnet werden.

Die präsentierten Peptide werden durch den heterodimerischen T-Zellrezeptor (TZR), der auf den meisten T-Zellen sowohl des Menschen als auch der Maus exprimiert wird, erkannt. Der größte Teil dieser Rezeptoren besteht aus einer α und einer β -Kette (Davis, 1988; van den Elsen, 1995). Jeder dieser Rezeptoren ist spezifisch für bestimmte Peptide. Die demzufolge erforderliche hohe Diversität dieses Antigenrezeptors entsteht durch das Rearrangement bestimmter Genelemente während der T-Zellentwicklung (Petrie, 1995). Die komplementaritäts-bestimmenden Regionen (complementary-determining regions, CDRs) CDR1, CDR2 und CDR3 befinden sich in den variablen Regionen der TZR- α - und - β -Ketten und sind essentiell für die Erkennung antigener Determinanten, die den T-Zellen präsentiert werden (Chothia, 1988; Chien, 1993). Diese Determinanten werden vom TZR in Form von Peptiden erkannt, die in der Antigen-bindenden Furche von MHC Klasse I- oder MHC Klasse II-Molekülen gebunden sind (Jorgensen, 1992). In diesen Komplexen befinden sich die CDR3-Regionen beider TZR-Ketten über dem zentralen Teil des Peptids, während CDR1 und CDR2 sowohl mit dem Peptid als auch mit MHC-Determinanten in Kontakt kommen (Garboczi, 1996; Garcia, 1996; Fields, 1996).

Die aktivierten T-Zellen gehören entweder der $CD4^+$ - oder der $CD8^+$ -Subpopulation an, abhängig von der Art des exprimierten Korezeptors, und sind gekennzeichnet durch die Expression von Aktivierungsmarkern wie der IL-2-Rezeptor α -Kette (CD25), oder CD69. Die Zellen des $CD4$ -Typs werden auch T-Helferzellen genannt und liefern durch die Expression von Zytokinen wie IL-2, IL-4, IL-10 oder $IFN-\gamma$ Unterstützung bei der Aktivierung anderer naiver T-Zellen. Durch die Expression eines spezifischen Zytokinprofils entsteht eine spezielle Mikroumgebung, die die Entwicklung weiterer naiver T-Zellen und auch der antigenpräsentierenden Zellen beeinflusst. Abhängig von der Art des exprimierten Zytokinprofils können die entstehenden T-Zellen entweder dem Th1-Typ angehören, der durch die Expression von IL-2, TNF- α und $IFN-\gamma$ gekennzeichnet ist, oder dem Th2-Typ, wenn IL-4, IL-5 und IL-10 exprimiert werden.

1.2.2 Rolle der APZ bei der Induktion der Immunantwort

Stark ausschlaggebend für die Entwicklung einer Th1- oder Th2-Antwort ist die Art der beteiligten APZ, im besonderen der Dendritischen Zellen (DZ). Die DZ regulieren die Entwicklung bestimmter Th-Zellpopulationen und bewirken daher die Entwicklung der richtigen Art der Immunantwort auf unterschiedliche Antigene. In der Maus werden Subpopulationen von DZ anhand der Expression von $CD8\alpha$ unterschieden. Die Aktivierung von Th-Zellen durch DZ der unterschiedlichen Subpopulationen bewirkt eine unterschiedliche Ausprägung der Immunantwort. So induziert das Priming von Th-Zellen durch $CD8\alpha^+$ DZ eine Th1-Antwort. Bei Entstehung einer Th1-Antwort wird die zelluläre Immunantwort gefördert, es kommt zur Aktivierung von CTLs, NK Zellen und Makrophagen, und somit zur Ausbildung einer inflammatorischen Immunreaktion, wie bei Arthritis, Diabetes oder EAE. Die Th1-Antwort ist gekennzeichnet durch den Influx von Entzündungszellen wie Neutrophilen an den Entzündungsherd und das Auftreten von Antikörpern des IgG2a-Isotyps. Erfolgt die Aktivierung der Th-Zellen hingegen durch $CD8\alpha^-$ DZ, so entsteht eine Immunantwort vom Th2-Typ. Bei Ausprägung einer Th2-Antwort wird eine allergische Immunreaktion bevorzugt, wie bei Asthma oder Rhinitis. Charakteristisch für eine Th2-Antwort ist das Auftreten von Mastzellen und von Antikörpern des IgE- und IgG1-Isotyps (Yasumi 2004). Hierbei zeigte sich, daß weitere

kostimulatorische Moleküle für die Entwicklung der unterschiedlichen Antworten erforderlich sind, die hauptsächlich von den DZ geliefert werden (Kalinski 1999; Moser 2000). So ist für die Induktion der Th1-Antwort durch die $CD8\alpha^+$ DZ die Wechselwirkung von CD40 auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle mit CD154 (CD40L, der Ligand von CD40) auf der Oberfläche der T-Zelle erforderlich. Ohne diese Interaktion können die $CD8\alpha^+$ DZ keine Th1-Antwort mehr induzieren, während die Induktion von Th2-Antworten durch die $CD8\alpha^-$ DZ davon unbeeinflusst bleibt. Die Ligation von CD40 bewirkt die Reifung und Aktivierung der DZ (Caux, 1994) und induziert die Expression von Zytokinen wie IL-12 (Cella, 1996; Koch, 1996), die essentiell für die Entwicklung der Th1-Antwort sind (Hsieh, 1993; Manetti, 1993; Trinchieri, 1994; Macatonia, 1995).

Der wichtigste Parameter für den Einfluß der DZ auf die Aktivierung naiver T-Zellen ist der Reifegrad der DZ. Weder $CD8\alpha^+$ noch $CD8\alpha^-$ DZ sind dazu in der Lage, optimale T-Zellantworten zu induzieren, solange sie sich in ihrem unreifen Stadium befinden. Erst durch ihre Reifung werden sie zu potenten Aktivatoren naiver T-Zellen (De Smedt, 2001). Neuere Studien liefern Hinweise darauf, daß $CD8\alpha^+$ DZ an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind (Belz, 2002; Liu, 2002), ihr tolerogenes Potential aber durch die Gabe von agonistischen anti-CD40-Antikörpern überwunden werden kann und die Antwort zytotoxischer Lymphozyten (CTL) gegen Gewebe-assoziierte Antigene auslöst (Liu, 2002; Grohmann, 2001).

Auch B-Zellen sind wirkungsvolle APZ (Moulon, 2003; Lu, 2003; Glimcher, 1985) für Nickel-reaktive T-Zellen. Für die Untersuchung der MHC-Restriktion von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen, die bei der Entstehung und Unterhaltung der Nickelallergie eine Rolle spielen, aber auch $CD4^+$ Nickel-reaktiver T-Zellklone, können verschiedene B-Zelllinien als APZ dienen (Lu, 2003). Die untersuchten T-Zellen reagieren mit Proliferation und spezifischer Zytolyse der antigenpräsentierenden B-Zellen (Moulon, 1998), beziehungsweise mit der Produktion von IL-2 (Lu, 2003).

1.2.3 Bedeutung der Kostimulation

1.2.3.1 Aufregulierung der Kostimulation durch Gefahrensignale

Wie bereits eingangs erwähnt, ist für die Sensibilisierung gegen Nickel eine gleichzeitige Entzündung an der Aufnahmestelle erforderlich. Ein Kennzeichen der Entzündungsreaktion ist unter anderem die Bildung von Wasserstoffperoxid, welches auch in unserem Modell der Nickelallergie als Adjuvans eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei also um einen endogen vorkommenden Entzündungsmediator, der sehr reaktiv ist und schnell in Radikale zerfällt. Die Entzündungsreaktion sorgt für die Anwesenheit von weiteren Radikalen wie zum Beispiel NO, die ein Gefahrensignal für die Zellen darstellen. Dieses Gefahrensignal bewirkt die Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle, wie zum Beispiel der Glykoproteine CD80 und CD86 auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen. Nur bei gleichzeitigem Auftreten von Kostimulation (Signal 2) während der Antigenpräsentation durch dieselbe APZ (Signal 1) werden T-Zellen aktiviert und versehen ihre Funktion als Effektorzellen (Matzinger, 1994). Zunächst beginnen sie zu proliferieren (klonale Expansion) und durchlaufen dann ihre Differenzierung zu Effektorzellen. Dabei besitzen alle T-Zellen, die durch Proliferation aus einer Vorläuferzelle entstehen, genau die gleiche Antigen-spezifität, das bedeutet, sie erkennen alle das gleiche Antigen.

1.2.3.2 Antigenerkennung ohne Kostimulation führt zur Anergie der T-Zellen

Für eine erfolgreiche Stimulation von T-Zellen ist es erforderlich, daß die kostimulatorischen Signale von derselben antigenpräsentierenden Zelle stammen, die auch das Antigen präsentiert. Das bedeutet, daß nur professionelle antigenpräsentierende Zellen die T-Zellantworten auslösen. Dieser Mechanismus stellt sicher, daß autoreaktive T-Zellen, die der Selektion im Thymus entgangen sind, nicht durch Erkennung von Selbstantigenen in der Peripherie aktiviert werden und eine Autoimmunreaktion auslösen. Erfolgt die Antigenerkennung, also die Interaktion von einem Antigen-

tragenden MHC-Molekül mit dem T-Zellrezeptor einer naiven T-Zelle, in Abwesenheit kostimulatorischer Signale von der antigenpräsentierenden Zelle, so wird die T-Zelle nicht aktiviert, sondern geht in den Zustand der Anergie über. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch das Ausbleiben von Effektorfunktionen und Unempfindlichkeit gegenüber erneuter Aktivierung, sie produzieren kein IL-2 (Fraser, 1991; Lindsten, 1989) und zeigen keine IL-2-induzierte Proliferation. Außerdem ist die Produktion anderer Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β stark reduziert (Chai, 1999). Anergische T-Zellen vermindern in Gegenwart von Nickel die Expression von CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen und schwächen dadurch die erforderliche Kostimulation für die Aktivierung weiterer autoreaktiver T-Zellen, die somit ebenfalls anerg werden. Der Zustand der Anergie kann jedoch durch die Verabreichung von sehr großen Mengen IL-2 überwunden werden. Anergische T Zellen können die Proliferation anderer Antigen-spezifischer T Zellen unterdrücken. Diese Suppression ist unabhängig von der Expression von Zytokinen wie IL-4, IL-10 oder TGF- β , erfordert jedoch den direkten Kontakt zwischen den anergischen Zellen und den proliferierenden Zellen (Chai, 1999).

1.2.3.4 Aktivierende und inhibierende kostimulatorische Moleküle

Einer der Rezeptoren für CD80 und CD86 auf der Oberfläche der T-Zellen ist CD28, der ebenfalls wie seine Liganden zur Immunglobulinsuperfamilie gehört. Die Signalgebung über diesen Rezeptor bewirkt in Verbindung mit Signal 1 die Aktivierung der naiven T-Zelle, welche zunächst IL-2 produziert, proliferiert und sich dann zur Effektorzelle differenziert.

Ein weiterer Rezeptor für CD80 und CD86 auf T-Zellen ist CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; CD152). Dieser Rezeptor wird nach der Aktivierung exprimiert, hat jedoch eine entgegengesetzte Wirkung auf die T-Zelle. Die Signalgebung über diesen Rezeptor bewirkt die Übermittlung eines negativen Signals in die aktivierte T-Zelle und limitiert die Produktion von IL-2. Darüber hinaus hat CTLA-4 eine höhere Affinität zu CD80 und CD86 als CD28 und bindet daher vorrangig an diese Moleküle, was die aktivierende Signalgebung durch CD28-B7 beeinträchtigt, weshalb aktivierte T-Zellen weniger empfänglich für die Stimulierung durch APZ sind. Die Bindung von CTLA-4 spielt somit ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Begrenzung der Proliferation aktivierter T-Zellen. Ist die Expression von CTLA-4 gestört so kommt es zur massiven Proliferation von Lymphozyten, die schließlich zum Tod führt (Tivol, 1995; Waterhouse, 1995). Neuere Untersuchungen zufolge hat die Interaktion zwischen CTLA-4 und CD80 bzw. CD86 jedoch nicht nur einen immunsuppressiven Effekt auf die T-Zelle, sondern auch auf die beteiligte antigenpräsentierende Zelle, die Signalgebung erfolgt in beide Richtungen (Finger, 2002). Besondere Aufmerksamkeit verdient in diesem Zusammenhang auch die ausgesprochen hohe Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen, wo es eine bedeutende Rolle bei der regulatorischen Funktion dieser T-Zellpopulation spielt (Vasu, 2004; Kingsley, 2002; Sanchez, 2002; Takahashi, 2000).

1.2.4 Nickel: ein besonderes Antigen

In zunehmendem Maße werden TZR beschrieben, die Spezifität für Nicht-Peptid-Antigene wie Kohlenhydrate, Lipide oder reaktive Chemikalien, die sogenannten Haptene, aufweisen (Weltzien, 1996; Porcelli, 1996). Ein weiteres Beispiel für nicht-klassische Antigene stellen Metalle dar, die beim Menschen Kontakthypersensitivität durch die HLA (human leukocyte antigen: humane MHC-Moleküle)-restringierte Aktivierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen auslösen können (Sinigaglia, 1985; Sinigaglia, 1994). Trotz des verbreiteten Auftretens von Metallallergien ist die strukturelle Basis und der Mechanismus der MHC-restringierten Metallerkennung durch T-Zellen noch nicht verstanden. Obwohl die Kapazität dieser Metalle zur T-Zellaktivierung eingehend etabliert ist, so ist die Beschaffenheit der durch Metall-spezifische T-Zellen erkannten allergenen Epitope weitgehend unbekannt. Verschiedene Modelle kommen zur Erklärung in Frage: 1) Metall-spezifische T-Zellen erkennen antigene Determinaten, die aus einem Komplex von MHC-präsentierten Selbstpeptiden und

Metallionen bestehen, analog zu typischen Haptenen wie TNP oder Penicillin (Weltzien, 1996; Romagnoli, 1991); 2) der TZR erkennt durch die Metallionen veränderte Aminosäurereste oder durch die Metallionen ausgelöste Konformationsänderungen des MHC-Moleküls selbst (Poticchio, 1999); 3) die Metallionen beeinflussen die Prozessierung von Selbst-Antigenen, was zur Reaktion von T-Zellen gegen kryptische Selbst-Peptide führt (Griem, 1996; Griem, 1998). Keines dieser Modelle ist ausschließlich gültig, es ist eher wahrscheinlich, daß ein bestimmtes Metall mehrere dieser Mechanismen nutzt. Für die Kontakthypersensitivität gegen Nickel werden das erste (Romagnoli, 1991) und das dritte Modell (Griem, 1998) vorgeschlagen, wobei Nickel unter den Antigenen eine Sonderstellung einnimmt. Normalerweise muß ein Antigen von einer APZ aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden. Durch die Bindung des Metallions an ein Protein kommt es zu Konformationsänderungen, die zu einer alternativen Prozessierung führen, bei der kryptische Peptide gebildet und von MHC-Molekülen präsentiert werden, wie bereits für Gold(III) gezeigt (Griem, 1996). Nickel kann aufgrund seiner chemischen Valenzen jedoch auch erst nach der Prozessierung an bereits präsentierte Peptide, oder sogar an Histidinreste des MHC-Komplexes selbst binden (Gamerding, 2003).

Nickel ist der häufigste Auslöser der Kontakthypersensitivität beim Menschen. Für die Sensibilisierung gegen Nickel ist die Aufnahme durch die Haut, die Bindung an körpereigene Proteine, der Transport an die Orte der Antigenpräsentation in den lokalen Lymphknoten und die Aktivierung von Nickel-spezifischen T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) erforderlich (Rustemeyer, 2001; Bancheau, 1998). Entscheidend für die Entstehung der Nickelallergie ist offensichtlich die Art des Erstkontaktes (Artik, 1999; Artik, 2001). Die Sensibilisierung erfolgt, wenn es zum Kontakt mit Nickel in Bereichen entzündeter Haut kommt, welche durch das Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), und Entzündungsmediatoren gekennzeichnet sind (Moulon, 1995). In diesen Bereichen wird Ni^{2+} zu den höheren Oxidationsstufen Ni^{3+} und Ni^{4+} oxidiert, die eine weitaus höhere chemische Reaktivität besitzen (Oller, 1997; Christoskova, 1995). Aufgrund dieser Reaktivität können sie ein unspezifisches lokales Gefahrensignal liefern, welches zur Aktivierung von DZ führt (Matzinger, 1994).

Die Kontakthypersensitivität gegen Nickel ist eine klassische Typ IV Reaktion vom verzögerten Typ (DTH-Reaktion: delayed type hypersensitivity). Im Gegensatz zu den Hypersensitivitätsreaktionen vom Soforttyp, die durch Antikörper verursacht werden, liegt denen vom verzögerten Typ (Typ IV) die Aktivierung spezifischer T-Zellen zugrunde. Typ-IV-Reaktionen lassen sich in zwei Klassen einteilen: Bei der ersten Klasse beruht die Gewebeschädigung auf der Aktivierung von Entzündungsreaktionen durch Th1-Zellen, die hauptsächlich durch Makrophagen vermittelt werden, bei der zweiten Klasse wird die Schädigung direkt durch zytotoxische T-Zellen (CTL) verursacht. Bei sensibilisierten Personen entwickelt sich innerhalb von 24 bis 72 Stunden an der Kontaktstelle mit dem Antigen, meist die Epidermis der Haut, eine lokale Entzündungsreaktion, die durch inflammatorische CD4-T-Zellen (Th1) vermittelt wird. Diese Zellen dringen ins Gewebe ein, erkennen Antigen, welches von APZ präsentiert wird, und setzen inflammatorische Zytokine frei. Dadurch erhöht sich lokal die Durchlässigkeit der Blutgefäße, was einen verstärkten Zustrom von Flüssigkeit und Proteinen nach sich zieht, der wiederum inflammatorische Zellen, hauptsächlich Makrophagen, anlockt. Die Antigenpräsentation durch die Makrophagen verstärkt die Reaktion. An der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV können auch CD8-T-Zellen beteiligt sein, die durch Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen aktiviert werden und das Gewebe durch zellvermittelte Zytotoxizität schädigen oder Zytokine wie $IFN-\gamma$ freisetzen. Die Folgen dieser Vorgänge äußern sich in einer lokalen epidermalen Reaktion, wie der Bildung eines Erythems (Rötung), Schwellung und Jucken, und somit der Ausbildung der Kontaktdermatitis (Moulon, 1995).

1.2.5 Mechanismus der T-Zellaktivierung durch Nickel

Der Mechanismus der Aktivierung von Nickel-spezifischen T-Effektorzellen weist noch viele Unklarheiten auf. Unumstritten ist nach wie vor, daß die Kontaktallergie gegen Nickel durch T-Zellen vermittelt wird (Budinger, 2000; Girolomoni, 2001; Grabbe, 1998), wobei IFN- γ -produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowohl für die Sensibilisierung als auch für die Hautreaktionen verantwortlich sind (Traidl, 2000; Moulon, 1998), während IL-10- und TGF- β -produzierende CD4⁺ regulatorische T-Zellen für die negative Modulierung der Immunantwort sorgen (Girolomoni, 2001). Bemerkenswert dabei ist, daß Nickel-reaktive T-Zelllinien und T-Zellklone des CD4- und CD8-Phänotyps durch Stimulation von T-Zellen mit NiSO₄ aus peripherem Blut oder Hautläsionen von allergischen und sogar aus nicht-sensibilisierten Personen isoliert werden können (Budinger, 2000; Cavani, 2001; Cavani, 1998; Kimber, 2002). Die Aktivierung dieser Zellen *in vivo* erfordert die Translokation der Ni²⁺-Ionen von der Hautoberfläche in tiefere Schichten der Haut, wo sie von Langerhans-Zellen (LZ) aufgenommen werden. Bei diesen Zellen wird die Reifung ausgelöst und sie wandern in die lokalen Lymphknoten, wo sie Nickel-MHC-Epitope an T-Zellen präsentieren (Rustemeyer, 2001; Banchereau, 1998). Erneuter Kontakt mit Nickel initiiert die Effektorphase der Nickelallergie, die sich in den charakteristischen Hautläsionen manifestiert. Diese Symptome sind gekennzeichnet durch die massive Infiltration von Antigen-spezifischen, CLA⁺ (cutaneous lymphocyte-associated antigen) und CCR4⁺ (CC Chemokin-Rezeptor) T-Zellen in die Dermis und Epidermis an der Stelle des Nickel-Kontakts (Grabbe, 1998; Cavani, 2001). Diese Effektor-T-Zellen benötigen für ihre weitere Funktion keine Unterstützung mehr durch Langerhans-Zellen. Widersprüchliche Ergebnisse gibt es jedoch hinsichtlich der Aktivierung der Nickel-reaktiven T-Zellen. Aktuelle Daten, die aus *In vitro*-Untersuchungen an Nickel-spezifischen T-Zellhybridomen stammen, deuten darauf hin, daß Ni²⁺-Ionen den Kontakt zwischen TZR und MHC durch die Bildung von Komplexen mit Aminosäuren beider Rezeptoren als Koordinationspartner vermitteln können (Lu, 2003; Gamerdinger, 2003; Loh, 2003). Für die Erkennung von Nickel durch den TZR werden verschiedene Möglichkeiten postuliert. Eine dieser Möglichkeiten beinhaltet die Erkennung eines Koordinationskomplexes zwischen dem prozessierten Peptid, Nickel und der TZR- β -Kette (Vollmer, 1997; Vollmer, 1999; Zollner, 1998). In diesem speziellen Fall ist die Aktivierung der T-Zellen auch vom prozessierten Peptid selbst abhängig, welches speziell von B-Zellen, aber eventuell auch von anderen professionellen APZ, gebildet wird (Lu, 2003).

Für die Stimulation anderer Nickel-reaktiver T-Zellklone sind jedoch nicht unbedingt Peptide erforderlich, die aus der Prozessierung durch APZ stammen (Nasorri, 2002). Am Beispiel eines anderen T-Zellklons konnte gezeigt werden, daß die TZR- α -Kette bei der Bestimmung der Antigenspezifität eine dominante Rolle spielt. Der Austausch gegen die identische V α -Region eines Nickel-unspezifischen TZR hat den Verlust der Nickelerkennung zur Folge (Vollmer, 2000). Die MHC-Restriktion bleibt jedoch erhalten, auch bei Kombination mit verschiedenen TZR- β -Ketten. Bereits frühere Arbeiten zeigen, daß die TZR- α -Ketten für die MHC-Restriktion verantwortlich sind (Brawley, 1996; Garcia, 1998; Sim, 1998). In diesem speziellen Fall ist die Nickel-Spezifität nicht von der Art des präsentierten Peptids abhängig (Gamerdinger, 2003). Obwohl die Mehrheit der Nickel-reaktiven T-Zellklone keine Antigenprozessierung benötigt, sind die Übrigen (etwa 40%) strengstens darauf angewiesen (Moulon, 1995; Budinger, 2000).

Für die Aktivierung aller bisher untersuchten Nickel-spezifischen TZR ist die Existenz eines Histidins an der Position 81 der MHC- β -Kette erforderlich. Da der Austausch von His⁸¹ mit dem Verlust der Aktivierung einhergeht, und dies auch für Peptid-unabhängige Nickel-spezifische T-Zellklone gilt (Gamerdinger, 2003), liegt eine Rolle dieser Aminosäure bei der Ni²⁺-Koordination nahe. Aufgrund der bisher beschriebenen Daten ist es sehr wahrscheinlich, daß andere Nickel-spezifische T-Zellklone möglicherweise auch α - und β -Kette ihres TZR einsetzen, um ähnliche Peptid-unabhängige Komplexe zu bilden. Bei den Nickel-reaktiven T-Zellen handelt es sich vornehmlich um CD4⁺ Zellen. Die Beobachtung, daß sie auch in Abwesenheit von CD4 auf Nickel reagieren, ist ein deutliches

Anzeichen für eine erhöhte Stabilität des MHC-TZR-Komplexes in Anwesenheit von Ni^{2+} (Vollmer, 1999).

Die Bedeutung solcher Zellen für die weite Verbreitung der Nickelallergie liegt auf der Hand: APZ präsentieren wesentlich mehr Ni-Epitope an Peptid-unabhängige als an Peptid-abhängige T-Zellen, von denen ein Teil wiederum Nickel auch in Verbindung mit verschiedenen MHC-Molekülen erkennen kann, die MHC-Restriktion ist also eingeschränkt. Auch wenn diese Beobachtungen nur für einen kleinen Teil des gesamten TZR-Repertoires gelten, können diese wenigen Zellen für eine deutliche Amplifikation der Symptome der Nickelallergie sorgen (Thierse, 2004).

1.2.6 Unterschiedliche T-Zellsubpopulationen tragen zur Nickelallergie bei

Wie bereits beschrieben, reagieren T-Zellen von Nickel-sensibilisierten Individuen auf Nickelsalze in der Gegenwart von APZ mit passenden MHC-Molekülen mit Proliferation und der Sekretion von Interleukinen (Sinigaglia, 1985; Kapsenberg, 1987). Die Mehrzahl der Nickel-reaktiven Zellen exprimiert das kostimulatorische Molekül CD4, jedoch etwa 20% der reaktiven Zellen exprimieren CD8 (Werfel, 1997; Cavani, 1998; Moulon, 1998). Aus diesem Grund befassen sich die meisten Studien mit klonierten CD4^+ Nickel-reaktiven T-Zellen, obwohl von Tierexperimenten mit Kontaktallergenen wie Trinitrochlorobenzen oder Dinitrochlorobenzen bekannt ist, daß die CD8^+ T-Zellen für die Auslösung und Unterhaltung der Hautreaktionen bei Kontakt mit dem Allergen verantwortlich sind (Bour, 1995; Martin, 2000). Auch in der Nickelallergie wird den CD8^+ T-Zellen eine dominante Rolle zugeschrieben (Cavani, 1998; Cavani, 2001). Die Mehrheit der für Studien verwendeten humanen CD8^+ zytotoxischen T-Zelllinien (Cavani, 1998; Moulon, 1998) weist die typische Restriktion für MHC Klasse I-Moleküle auf.

Es existieren jedoch auch Nickel-spezifische CD8^+ zytotoxische T-Zellklone, die weder von MHC I noch von MHC II abhängig sind (Moulon, 1998). Solche Zellen lassen sich aus verschiedenen Nickel-sensibilisierten Spendern isolieren, was eine funktionelle Bedeutung für diese Zellen nahelegt. Die Stimulation dieser CD8^+ T-Zellen induziert zum einen die Sekretion von Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$ und/oder IL-4, abhängig vom Subtyp der zytotoxischen T-Zelle (Moulon, 2003). Zum anderen bewirkt die Stimulation das Töten der Zielzelle durch Perforin-vermittelte Lyse, wobei hier eine Beteiligung anderer löslicher Faktoren wie $\text{TNF-}\alpha$ nicht ausgeschlossen werden kann (Kataoka, 1994; Kataoka, 2000), die Fas/FasL-vermittelte Lyse spielt jedoch keine Rolle. Die Nickel-Reaktivität dieser humanen Zellen ist deutlich vom $\alpha\beta$ -TZR abhängig, jedoch nicht von MHC I oder MHC II. Der TZR allein ist bereits ausreichend für die Nickel-Spezifität. Anstelle des MHC-Moleküls scheinen noch andere Faktoren auf der Oberfläche der Zielzellen eine Rolle zu spielen, da die beschriebenen CD8^+ T-Zellklone keine Zelllinien der Maus lysieren können, selbst dann nicht, wenn sie mit humanen MHC I-Genen transfiziert werden. Dies deutet auf die Beteiligung bislang unbekannter Strukturen auf der Oberfläche humaner Zellen hin, die weder zu den MHC II- noch zu den MHC I-Molekülen, einschließlich des MHC I-artigen Moleküls CD1, gehören.

Für die Reaktivität dieser Zellen ist die ständige Anwesenheit von Nickelionen erforderlich (Moulon, 1998). Die Art der von diesen zytotoxischen T-Zellen erkannten Epitope ist bisher nicht identifiziert, die fehlende Beteiligung von MHC-Molekülen spricht jedoch gegen eine Rolle für sogenannte kryptische Peptide (Griem, 1996). Auch die Bildung stabiler Epitope durch Nickelionen auf den APZ läßt sich aufgrund der erforderlichen ständigen Anwesenheit von Nickel ausschließen (Moulon, 1998). Möglicherweise können Nickelionen lose Kontakte zwischen dem TZR und bisher nicht identifizierten Oberflächenproteinen auf den APZ stabilisieren. Die Expression von CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) durch diese nicht-MHC-restringierten CD8^+ T-Zellen läßt vermuten, daß diese Zellen in die Haut wandern, wo sie von vielen verschiedenen Zellen aktiviert werden können, sobald Nickelionen anwesend sind (Moulon, 1998). Da diese Zellen nicht von bestimmten APZ abhängig sind, könnten sie Bestandteil eines Verstärkungsmechanismus sein, der eine wichtige Rolle in der Pathologie der Nickelallergie spielt. Diese bei anderen Haptenen nicht zu beobachtenden

Eigenschaften könnten der Grund für die außerordentlich effektive Sensibilisierung des Menschen durch Nickel sein (Moulon, 2003).

1.2.7 Bindung von Ni^{2+} an Trägerproteine

Nickel hält sich bemerkenswert lange in der Umgebung der Sensibilisierungsstelle (Hostynek, 2001), was auf Komplexierung, zum Beispiel mit Histidin-reichen Proteinen wie Filaggrin oder ihren metabolischen Abbauprodukten, in den äußeren verhornten Schichten der Haut zurückzuführen ist (Kanitakis, 1988; Laplante, 2001). Jede Translokation in tiefere Schichten der Haut erfordert somit den Transfer der Ni^{2+} -Ionen auf mobile Trägerproteine oder –peptide. Nickel bildet hauptsächlich quadratisch-planare oder tetragonale Koordinationskomplexe mit den Aminosäureseitenketten oder den Hauptketten von Peptiden oder Proteinen (Pettit, 1991; Basketter, 1995; White, 1998). Durch nicht-kovalente Wechselwirkungen können Ni^{2+} -Ionen mit MHC-präsentierten Peptiden ein Neoantigen für Nickel-reaktive T-Zellen bilden (Romagnoli, 1991; Griem, 1998).

Ein altbekanntes Beispiel für ein mit Nickel interagierendes Protein, das diese Funktion übernehmen kann, ist HSA (humanes Serumalbumin) (Bal, 1998; Peters, 1996; Sadler, 1994). HSA ist das am weitesten verbreitete Plasmaprotein und ist ein Träger für eine große Vielfalt von Molekülen, darunter Fettsäuren, Lipide, Vitamine sowie diverse Metalle und Arzneien (Peters, 1996). Für viele dieser Moleküle bildet Albumin ein Depot, was eine Verfügbarkeit dieser Moleküle in einer Menge weit jenseits ihrer Löslichkeit im Plasma ermöglicht. Außerdem kann es Toxine binden und zu den Orten ihrer Entsorgung bringen. Auch kann es durch die Bindung eines Liganden selbst zu einem aktiven Protein-Ligand-Komplex werden, indem es ansonsten eher kurzlebige Funktionen des Liganden stabilisiert (Marley, 2001; Stamler, 1992). Für Nickel und andere Schwermetalle versieht HSA eine Entgiftungsfunktion, die das Ausscheiden der Schwermetalle über die Nieren ermöglicht.

Ebenso ist Albumin dazu in der Lage, Ni^{2+} -Ionen an APZ wie Langerhans-Zellen in der Haut zu liefern. HSA ist in der Haut, dem größten immunologischen Organ, besonders reich vertreten (Peters, 1996). Es dient der Versorgung von Epithelzellen mit essentiellen Nährstoffen in Bereichen, die nicht durch Blutgefäße erreicht werden, und kann höchst effizient die Basalmembran der Epidermis überqueren (Rabilloud, 1988). Die Vermutung liegt nahe, daß HSA die Basalmembran auch in umgekehrter Richtung überqueren kann. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß Ni^{2+} im Komplex mit HSA (HSA-Ni) humane Nickel-reaktive T-Zellklone stimulieren kann (Moulon, 1998; Vollmer, 1997), und dies gilt ebenso für T-Zellen der Maus (Artik, 2001). Die Stimulierung durch HSA-Ni *in vitro* verläuft ähnlich effektiv wie mit freiem ungebundenem Nickel, was zeigt, daß Nickel sehr leicht aus diesem Komplex freigesetzt werden kann. Bei Entfernen des Serums aus dem Medium wird die Effektivität von $NiSO_4$ bei der Stimulation des TZR vermindert, was auf die Erfordernis der Komplexierung mit HSA oder anderen Serumproteinen hindeutet. Wird jedoch Ni-freies Serum hinzugefügt, wird die stimulatorische Kapazität von HSA-Ni ebenfalls reduziert, hervorgerufen durch Verdünnung des HSA-Ni mit Nickel-freiem Albumin.

Der Komplex aus Albumin und Ni^{2+} dient als intermediärer Reaktionspartner bei der T-Zellstimulierung durch Nickel, wobei das HSA-Protein selbst nicht zu der Festlegung der Epitop-Spezifität beiträgt, sondern offenbar nur eine Trägerfunktion versieht. So ist humanes Albumin im Komplex aus Ni und HSA durch das Albumin anderer Spezies ersetzbar. Wichtig für die Funktion ist bei diesem Austausch das Vorhandensein eines Histidinrests an einer bestimmten Position in der Aminosäuresequenz des Albumins (Mohanakrishnan, 1985; Glennon, 1982), beziehungsweise einer zweiten Bindestelle, die für humanes und bovines Albumin (BSA) postuliert wird (Zhang, 2002; Bal, 1998; Zhou, 1994). In Nickel-Peptid-Komplexen ist Histidin zwar der bevorzugte, aber bei weitem nicht der einzige Bindungspartner für Ni^{2+} (Sadler, 1994; Zhang, 2000; Hartwig, 2001; Kozłowski, 1999). Um einen effektiven Transfer von Ni^{2+} auf andere Proteine oder Peptide zu gewährleisten, ist es erforderlich, daß Bindestellen mit gleicher oder höherer Affinität vorhanden sind. Dies bedeutet

gleichzeitig, daß die Affinität von HSA für Nickel niedrig genug sein muß, um einen effektiven Austausch zu ermöglichen.

In Analogie zu anderen Haptenen liegt die Vermutung nahe, daß HSA-Ni von APZ aufgenommen und prozessiert wird, und das Ni komplexiert mit dem HSA-Peptid auf MHC-Molekülen an T-Zellen präsentiert wird. In der Tat wird HSA effektiv von APZ wie peripheren B-Zellen oder auch *in-vitro*-generierten humanen DZ in einem temperaturabhängigen Vorgang aufgenommen, wobei unreife DZ eine deutlich höhere Rate zeigen als reife DZ, was auf die Aufnahme durch Endozytose hinweist. Obwohl sich HSA-Ni in den Zellen ansammelt, lassen sich jedoch keine funktionellen Determinanten auf der Oberfläche nachweisen, was die Beobachtung unterstreicht, daß für die Nickel-Präsentation an T-Zellen keine intrazelluläre Prozessierung erforderlich ist. Selbst fixierte APZ sind bei Anwesenheit von HSA-Ni im Medium dazu in der Lage, effektiv T-Zellen zu stimulieren, ein Effekt, der durch das Waschen der Zellen aufgehoben wird (Artik, 1999; Thierse, 2004). Das deutet auf instabile, nicht-kovalente TZR-MHC-Kontakte hin, denn die MHC-Ni-Determinanten, die von den TZR Strukturen erkannt werden, sind weder das Resultat intrazellulärer Prozessierung, noch der Übertragung nennenswerter Ni^{2+} -Mengen von HSA-Ni auf Bindestellen des MHC, obwohl solche Bindungsstellen existieren, wie die Stimulation von APZ mit NiSO_4 demonstriert. Möglicherweise besitzen MHC-Moleküle nur einige der erforderlichen Koordinationsstellen für Ni^{2+} , die daher eine geringere Affinität für Ni^{2+} aufweisen als die komplette Bindungsstelle in HSA. Die fehlenden Koordinationsstellen können allerdings vom TZR zur Verfügung gestellt werden, wodurch sich aus der Kombination von TZR und MHC eine vollständige Bindestelle für Ni^{2+} ergibt (Lu, 2003; Gamedinger, 2003; Loh, 2003), die eine ausreichend große Affinität besitzt, um Ni^{2+} aus dem HSA-Ni-Komplex zu übernehmen. Dabei überbrückt Ni^{2+} MHC und TZR und sorgt somit für eine Stabilisierung der ansonsten kurzlebigen und unproduktiven Wechselwirkungen zwischen TZR und MHC, die auch in Abwesenheit von Antigen zustande kommen. Die Stabilisierung dieser Wechselwirkungen führt zur T-Zellaktivierung (Thierse, 2004).

1.2.8 Die Induktion von Toleranz

Für die Induktion einer Immunreaktion ist die Art des Erstkontakts mit dem jeweiligen Antigen entscheidend, beziehungsweise die Route, über die es in den Organismus gelangt. (Sonoda, 1999). Die Aufnahme von Antigenen über die Mukosa, wie die Mundschleimhaut, die Magenschleimhaut oder den Darm, sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen. Ohne diese Funktion würden fremde Antigene aus der Nahrung zu Immunreaktionen führen.

Indizien für die Induktion oraler Toleranz gegen Nickel liefert das verminderte Auftreten von Nickelallergien bei Menschen, die als Kinder Zahnschienen getragen haben (Kerosuo, 1996), sowie das verminderte Auftreten von Nickelallergien bei Populationen, die mit einem hohen Gehalt von Nickel in ihrer Umwelt konfrontiert werden (Smith-Sivertsen, 2002; Van Hoogstraten, 1991). Dazu paßt die Tatsache, daß ein größerer Anteil der Mädchen eine Nickelallergie ausbildet als Jungen, da Mädchen im allgemeinen Ohr-piercings in einem Alter erhalten, bevor sie eine Zahnspange tragen. Dadurch sind sie bereits für Nickel sensibilisiert, bevor orale Toleranz entstehen kann (Kerosuo, 1996).

Wird ein Antigen zum Beispiel subkutan appliziert, wie auch beim Ohrlochstechen (Schubert, 1987), so kommt es zur Ausbildung einer lokalen Inflammation, die mit der Aufregulierung von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von DZ einhergeht. Präsentieren diese DZ das prozessierte Antigen an naive T-Zellen, so werden diese aktiviert und versehen ihre Effektorfunktionen, es kommt zur Ausbildung einer Allergie. Werden Antigene jedoch über die Mukosa resorbiert, so bleibt eine Entzündungsreaktion aus. Wird das Antigen von DZ jedoch in Abwesenheit von Entzündungsmediatoren, also in Abwesenheit eines Gefahrensignals aufgenommen, unterbleibt die Aufregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40. Die Signalübermittlung über CD40 ist allerdings erforderlich, um die Reifung der DZ einzuleiten (Caux, 1994). Nur im reifen Zustand sind DZ dazu in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Unreife DZ bewirken

hingegen, daß T-Zellen durch die Interaktion mit ihnen zu regulatorischen T-Zellen (Treg) werden (Mahnke, 2003).

Auch das Immunsystem von Nichtallergikern setzt sich mit Nickel aus der Umwelt auseinander, jedoch vornehmlich durch die Bildung von T-Regulatorzellen (Treg-Zellen). Die Mechanismen, die zur Bildung Nickel-spezifischer Treg-Zellen führen, sind weitgehend unbekannt. Die Vorarbeiten, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Gleichmann an einem Mausmodell für die Induktion der Kontakt-hypersensitivität gegenüber Nickel geleistet wurden, zeigen, daß die orale Zufuhr von Ni^{2+} -Ionen Immuntoleranz induziert, die wie beim Menschen auf der Bildung Nickel-spezifischer Treg-Zellen beruht. Dabei ist die Bildung der Treg-Zellen umgekehrt proportional zur oralen Nickel-Zufuhr. So sind Mäuse, die unter weitgehend Nickel-freien Bedingungen gehalten werden, sehr viel anfälliger für die Sensibilisierung gegen Nickel und die Ausbildung der Hypersensitivität als solche, denen über mehrere Wochen oral mit dem Trinkwasser Ni^{2+} -Ionen verabreicht werden (Wu, persönliche Kommunikation, Veröffentlichung in Vorbereitung).

1.2.9 Eigenschaften und Funktion von Treg-Zellen

1.2.9.1 Entwicklung von Treg-Zellen

Die Selbst-Toleranz von T-Zellen basiert klassischerweise auf klonaler Deletion und T-Zellanergie. Beweise für einen aktiven Mechanismus zeigen sich jedoch in der Tatsache, daß in vielen experimentellen Systemen die Regression spontaner oder auch induzierter Immunkrankheiten durch die Rekonstitution dieser Tiere mit T-Zellen eines bestimmten Phänotyps möglich ist. Diverse Studien haben gezeigt, daß für die Generation solcher regulatorischen T-Zellen bestimmte Ereignisse innerhalb und außerhalb des Thymus erforderlich sind (Seddon, 1999). Die Zellen des Thymus sind heterogen, die Hauptpopulation bildet die Vorläuferzellen der peripheren Effektorzellen, aber eine zweite Population dient der Kontrolle der Autoimmunität (Saoudi, 1996; Modigliani, 1996). Diese Thymozyten exprimieren CD4, den $\alpha\beta$ -TZR und L-Selektin (Seddon, 1996; Herbelin, 1998), sowie CD25, welches als Erkennungsmerkmal der regulatorischen CD4^+ T-Zelllinie im Thymus dient (Itoh, 1999). Für ihre Entwicklung ist es erforderlich, daß sie die relevanten Selbst-Antigene, die sie später in der Peripherie erkennen, präsentiert bekommen. Diese Selbst-Antigene werden von den Zellen des Thymusepithels präsentiert, darunter auch viele Gewebe-spezifische Selbst-Antigene, wie zum Beispiel Insulin oder MBP (Myelin basic protein), die als Ziele bei späteren Autoimmunreaktionen bekannt sind (Hanahan, 1998). Nach ihrer Selektion ist außerdem noch eine Phase außerhalb des Thymus für die funktionale Entwicklung dieser Zellen von Bedeutung, in der sie ihren relevanten Selbst-Antigenen begegnen. Die Reifung dieser Zellen erfordert kurze Zeit nach ihrem Export aus dem Thymus den Kontakt mit ihrem Antigen, das von APZ, wie dendritischen Zellen, präsentiert wird. Nur sogenannte "recent thymic emigrants" (RTE), jedoch keine reifen T-Zellen können sich in der Peripherie zu funktionalen Treg differenzieren (Modigliani, 1996). Nicht klar ist, ob die Reifung der Treg in der Peripherie die Vermehrung durch klonale Expansion beinhaltet, oder ob weitere regulatorische Zellen durch "infektiöse Toleranz" rekrutiert werden (Seddon, 2000), oder beides. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Professor Gleichmann zeigen jedoch am Mausmodell der Nickel-toleranz, daß die Toleranz von Treg-Zellen "infektiös" an APZ übergeben wird und umgekehrt tolerogene APZ neue Treg-Zellen induzieren (Roelofs-Haarhuis, 2003).

1.2.9.2 Oberflächenmoleküle von Treg-Zellen

Bisher wurden im Zusammenhang mit regulatorischen Funktionen hauptsächlich T-Zellen der CD4^+ Subpopulation beschrieben (Sakaguchi, 1994). Diese Treg-Zellen sind charakterisiert durch die Expression von CD25, der IL-2-Rezeptor α -Kette (Sakaguchi, 1995; Suri-Payer, 1998; Kuniyasu, 2000; Itoh, 1999; Thornton, 1998; Takahashi, 1998), und CTLA-4 (Tang, 2004; Eagar, 2004), einem Liganden von CD80 und CD86 (Chambers, 1999; Brunner, 1999; Finger, 2002). $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-

Zellen sind anerg (Itoh, 1999; Takahashi, 1998; Thorstenson, 2001; Vendetti, 2000; Frasca, 2002). Diese Zellen bilden einen Anteil von etwa 10% an den CD4⁺ T-Zellen der Milz und der Lymphknoten (Cederbom, 1998). Weitere Moleküle, die ebenfalls im Zusammenhang mit toleranten T-Zellen beschrieben werden, sind GIT-R (Shimizu, 2002; McHugh, 2002) und $\alpha_E\beta_7$ (Lehmann, 2002). Außerdem werden diese Zellen charakterisiert durch die intrazelluläre Expression von Scurfin, dem Genprodukt des Foxp3-Gens, welche exklusiv T-Zellen mit regulatorischer Funktion vorbehalten ist. Scurfin ist direkt an der Generation von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen beteiligt. Foxp3-defiziente Tiere besitzen keine CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen. Wird dieses Gen jedoch überexprimiert, steigt der Anteil dieser Zellen an, durch seine Expression in CD4⁺CD25⁻ sowie in CD8⁺ T-Zellen entwickeln diese Zellpopulationen ebenfalls suppressorische Aktivität (Khattry, 2003).

1.2.9.2.1 CTLA-4

Unter den Molekülen, die von Treg-Zellen exprimiert werden, nimmt CTLA-4 wahrscheinlich den bedeutendsten Rang ein. CTLA-4 ist ein kostimulatorisches Zelloberflächenmolekül, welches anstelle von CD28 mit B7-1 und B7-2 (CD80 und CD86) auf APZ interagieren kann (Finger, 2002). Kostimulation ist ein komplizierter Vorgang, der sowohl aktivierende als auch inhibierende Vorgänge umfaßt (Thompson, 1997; Oosterwegel, 1999; Salomon, 2001). CTLA-4 ist zu 76% homolog zu CD28, bindet aber mit 20-fach höherer Affinität an dieselben Liganden, CD80 und CD86 (Chambers, 1999; Brunner, 1999). CTLA-4 und CD28 haben jedoch entgegengesetzte Funktionen in der Regulation der Immunantwort. Während CD28 das erforderliche zweite Signal für die T-Zellaktivierung liefert, wird CTLA-4 als negativer Regulator der T-Zellaktivierung betrachtet (Alegre, 2001; Chambers, 1999) und ist erforderlich für die Entwicklung der peripheren Toleranz (Tivol, 1995; Perez, 1997; Karandikar, 1996). Außerdem ist CTLA-4 an der Regulation der T-Zellenergie beteiligt (Greenwald, 2001).

CTLA-4 unterdrückt zum einen die aktivierende Signalgebung durch CD28, da es die Liganden auf den DZ bindet (kompetitiver Effekt, Ligandenhemmung), zum anderen erfolgt eine negative Signalgebung in die exprimierende T-Zelle (Lin, 1998; Fallarino, 1998; Fecteau, 2001). Neuere Veröffentlichungen beschreiben zusätzlich eine negative Signalgebung auch an die DZ durch Interaktion von CTLA-4 mit CD80 und CD86, bei der auch die Liganden als Rezeptor fungieren. Diese Interaktion führt zur Suppression von Immunantworten, die von der Modulation des Tryptophankatabolismus durch die Induktion vonIDO vermittelt wird (Finger, 2002; Grohmann, 2002; Fallarino, 2002, Fallarino, 2003). Auch bei der UVB-induzierten Toleranz spielen Treg-Zellen und deren Expression von CTLA-4 eine entscheidende Rolle. Sie ist für die Expression von immunsuppressiven Zytokinen erforderlich (Schwarz, 2004; Schwarz, 2000).

1.2.9.3 Funktion von Treg-Zellen

Zur Aufklärung der Funktionsweise der Treg muß zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Systemen unterschieden werden, da sich hier teilweise widersprüchliche Ergebnisse einstellen. Daten, die anhand von *In-vitro*-Systemen generiert wurden, deuten einen Funktionsmechanismus an, der durch Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird, weniger durch lösliche Faktoren (Frasca, 1997; Taams, 1998). Die CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen sind anergisch (Itoh, 1999; Takahashi, 1998; Thorstenson, 2001; Vendetti, 2000; Frasca, 2002). Dendritische Zellen, die zusammen mit anergischen CD4⁺ T-Zellen kultiviert werden, weisen eine verminderte Expression von MHC II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf (Vendetti, 2000; Cederbom, 2000). Anergische CD4⁺ T-Zellen beeinflussen das Überleben von DZ durch die Expression von FasL (CD95L), was ohne gleichzeitige Signalgebung über CD40-CD40L (CD154) die Apoptose reifer DZ auslöst (Frasca, 2002). Die orale Applikation hoher Antigen Dosen bewirkt die Induktion einer speziellen Population von CD4⁺CD95L⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften in der Leber, die ihre suppressorische Funktion ebenfalls über die Induktion der Apoptose ausüben (Watanabe, 2002). Darüber hinaus inhibieren anergische T-Zellen die

Antigen-spezifische Proliferation von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen (Chai, 1999; Dieckmann, 2001), sowie deren Effektorfunktionen (Olsen Saraiva Câmara, 2003).

Im Gegensatz dazu belegt eine Fülle von *In-vivo*-, aber auch *In-vitro*-Daten die Beteiligung der Zytokine IL-4 (Interleukin-4), IL-10 und TGF- β (transforming growth factor β) an der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen (Seddon, 1999; Bridoux, 1997; Han, 1996) und Antigenen, die zum Beispiel mit der Nahrung über die Mukosa aufgenommen werden (Powrie, 1996; Weiner, 1997; Groux, 1997). Diese Beobachtungen decken sich mit den Daten, die belegen, daß die transgene Expression von IL-4, IL-10 oder TGF- β Mäuse gegen EAE und Diabetes schützen kann (Cua, 1999; Mueller, 1996; King, 1998). Auch für die durch UVB-Bestrahlung induzierte Toleranz ist die Expression dieser Zytokine durch Treg-Zellen Voraussetzung (Schwarz, 2000). Bereits die Injektion des jeweiligen Zytokins übt einen protektiven Effekt aus (Rapoport, 1993; Cameron, 1997; Piccirillo, 1998). Das Auftreten multipler Autoimmunerkrankungen bei Tieren, die eine Gendefizienz für diese Zytokine aufweisen, liefert weitere Argumente für deren Bedeutung bei der Kontrolle autoreaktiver T-Zellantworten (Shull, 1992). Ein immer wiederkehrendes Motiv dieses Mechanismus besteht in der Verschiebung der Ausprägung der Immunantwort vom zerstörerischen inflammatorischen Th1-Typ zum milderen Th2-Typ (Powrie, 1996; Powrie, 1994). T-Zellen, die *in vitro* in Anwesenheit von IL-10 stimuliert werden, beginnen selbst mit der Produktion von IL-10 und TGF- β (Groux, 1997). Dendritische Zellen, die in Gegenwart von Treg-Zellen bzw. anti-inflammatorischer oder immunsuppressiver Zytokine, wie IL-10 oder TGF- β , aktiviert werden (Misra, 2004) entwickeln selbst wiederum einen tolerogenen Phänotyp (Link, 2001), was die Grundlage für einen effektiven inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus der Toleranz bildet (Min, 2003). Für dieses Phänomen sind sowohl lösliche Faktoren als auch direkter Zell-Zell-Kontakt erforderlich.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß Treg-Zellen *in vivo* die Immunantwort auf zwei Arten kontrollieren können: zum einen mittels direktem Zell-Zell-Kontakt mit anderen T-Zellen und APZ, zum anderen durch die Sekretion der inhibitorischen Zytokine IL-4 und IL-10. IL-4 wirkt über den IL-4R-STAT6-Signalweg und bindet nicht an T-Zellen. Daher muß es auf andere Zellen wirken, die den IL-4R-Rezeptor und den STAT6-Signalweg besitzen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen (Terabe, 2000). Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Zytokine die stimulatorische Aktivität der APZ dämpfen (D'Andrea, 1993; Koch, 1996; De Smedt, 1997; Ria, 1998). Ohne diese Zytokine könnte die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch die APZ zu stark sein, um durch den Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus kontrolliert zu werden (Seddon, 2000). Eine alternative Hypothese besagt, daß Treg-Zellen die Toleranz "infektiös" auf andere Zellen übertragen können, die dann ihrerseits regulatorisch wirken (Waldmann, 1998), wie auch im Modell der Nickelallergie gezeigt (Roelofs-Haarhuis, 2003; Roelofs-Haarhuis, 2004). IL-4, IL-10 und TGF- β bewirken die Differenzierung von T-Zellen, die die gleichen Zytokine produzieren (Groux, 1997; Seder, 1998). Diese Befunde stützen die Hypothese, daß diese Zytokine essentiell für die Induktionsphase der infektiösen Toleranz sind (Cobbold, 1998), während sie zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die Toleranz durch Treg-Zellen bereits etabliert ist, von geringerer Bedeutung sind.

1.2.10 Eigenschaften und Funktion von NKT-Zellen

NKT-Zellen sind eine besondere Lymphozyten-Subpopulation, die eine bedeutende Rolle in der Regulation der Autoimmunität spielt, aber auch wichtige Funktionen bei der Kontrolle verschiedener anderer Immunantworten ausübt, unter anderem bei mikrobiellen und viralen Infektionen (Kawakami, 2001; Hansen, 2003). Von entscheidender Bedeutung sind sie in den frühen Phasen der Immunantwort auf HSV (Grubor-Bauk, 2003), Hepatitis B (Kakimi, 2000), Salmonellen (Ishigami, 1999) und Malaria (Pied, 2000; Gonzalez-Aseguinolaza, 2000). Sie sind dazu in der Lage adaptive Immunantworten wie die Tumorabstoßung zu verstärken (Crowe, 2002; Smyth, 2002), können im Gegensatz dazu jedoch ebenfalls Immunreaktionen unterdrücken, wie beispielsweise durch die Induktion von Toleranz (Sonoda, 2002; Higuchi, 2002) oder die Suppression von anti-Tumor

Antworten (Terabe, 2000). Sie scheinen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität zu bilden (Grubor-Bauk, 2003). Patienten, die an verschiedenen Autoimmunerkrankungen leiden, weisen verringerte NKT-Zellzahlen auf, wie zum Beispiel bei Diabetes (Wilson, 1998; Kukreja, 2002), MS (Illes, 2000; Araki, 2003; Van Der Vliet, 1999; Gausling, 2001), Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) (Van der Vliet, 2001; Kojo, 2001; Oishi, 2001) oder Rheumatoider Arthritis (Van der Vliet, 2001; Kojo, 2001). NOD (non-obese diabetic) Mäuse entwickeln eine Form der Diabetes, bei der die β -Zellen des Pankreas in einem Prozeß zerstört werden, der durch die Infiltration von Th1-Zytokin-exprimierenden Zellen gekennzeichnet ist. In diesem Mausstamm ist die Zahl der $V\alpha 14i$ NKT-Zellen in Thymus, Milz, Knochenmark und Leber reduziert (Poulton, 2001; Matsuki, 2003; Gombert, 1996). Durch Erhöhung der Zahl von $V\alpha 14i$ NKT-Zellen in NOD Mäusen mittels adoptivem Zelltransfer (Baxter, 1997), oder durch die Einführung eines $V\alpha 14J\alpha 18$ -Transgens (Lehuen, 1998), sowie die Stimulation der iNKT-Zellen mittels des Liganden α -Galactosylceramid (Hong, 2001), kann das Fortschreiten der Krankheit jedoch aufgehalten werden. Neueren Arbeiten zufolge konnten bei der Maus vier verschiedene NKT-Zelltypen unterschieden werden, die sich durch ihre CD1d-Restriktion, die Lokalisation im Körper, die Zusammensetzung ihres T-Zellrezeptors, ihre Reaktivität gegenüber α -GalCer und die differentielle Expression von NK-Zell-typischen Molekülen wie CD49 unterscheiden (Kronenberg, 2002; Ortaldo, 2001; Ortaldo, 2004). Während bei der Maus die funktionalen Unterschiede der verschiedenen Subpopulationen der $V\alpha 14i$ NKT-Zellen noch nicht geklärt werden konnten, zeigen sich beim Menschen Zusammenhänge zwischen der Expression von CD4 durch $V\alpha 24i$ NKT-Zellen und der Expression von IL-4 sowie bestimmter Chemokinrezeptoren (Gumperz, 2002; Kim, 2002).

1.2.10.1 Die Entwicklung und die Effektorfunktionen von NKT-Zellen erfordern NF- κ B

Die späteren Effektorfunktionen von Lymphozyten werden maßgeblich durch Instruktionsprozesse während ihrer Entwicklung bestimmt, somit müssen besondere molekulare Kontrollen die Entwicklung funktionaler iNKT-Zellen regulieren. Hierbei unterscheidet sich die Entwicklung der iNKT-Zellen, im Gegensatz zu der konventioneller T-Lymphozyten, dahingehend, daß sie zwingend eine sensible Signalgebung durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B erfordert (Stanic, 2004; Elewaut, 2003; Sivakumar, 2003). NF- κ B reguliert die Entwicklung der iNKT-Zellen durch die Unterdrückung der Apoptose (Stanic, 2004), nicht aber der Proliferation (Sivakumar, 2003). Die Inhibition des NF- κ B-Signalweges oder die gezielte Disruption des NF- κ B-Gens resultiert in einer starken Verminderung der iNKT-Zellzahl, zum Beispiel in der Milz. Die Überexpression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl- x_L hingegen bewirkt die vollständige Wiederherstellung der iNKT-Zellentwicklung und -differenzierung, wie an NF- κ B-defizienten Thymozyten gezeigt wurde. Der NF- κ B-Signalweg ist jedoch darüber hinaus für die Antwort auf Antigen und die Expression von Zytokinen erforderlich, da die iNKT-Zellen NF- κ B-defizienter Tiere, deren Zahl durch Bcl- x_L wiederhergestellt wurde, nicht durch α -GalCer stimuliert werden können und keine Zytokine produzieren (Stanic, 2004).

1.2.10.2 CD1d-Restriktion von NKT-Zellen

NKT-Zellen wurden ursprünglich als T-Lymphozyten entdeckt, die den NK-Rezeptor NK1.1 (CD161) und einen CD1d-restringierten T-Zellrezeptor exprimieren. Sie sind essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegenüber Selbstantigenen. Sie sammeln sich in der marginalen Zone der Milz an und sind für die Induktion von regulatorischen T-Zellen erforderlich, die die periphere Toleranz nach intraokulärer Exposition mit Antigen bewirken (Sonoda, 1999). Die Mehrheit der NKT-Zellen der Maus erkennt ein bestimmtes Glykolipid, α -GalCer (α -Galactosylceramid), welches auf CD1d präsentiert wird (Bendelac, 1995; Gumperz, 2000), einem MHC-Klasse I-ähnlichen (MHC-Klasse Ib), nicht-klassischen Antigen-präsentierenden Molekül (Melian, 1996). Dieses aus CD1 und β_2 -Mikroglobulin (β_2M) bestehende Heterodimer (Mempel, 2002) wird von einer Familie von Genen außerhalb der klassischen MHC-Loci codiert (Porcelli, 1999). Die hydrophobische

MHC-Bindefurche des CD1 bindet die Lipidanteile des Antigens, wodurch der hydrophile Anteil auf der MHC-Oberfläche präsentiert wird (Zeng, 1997). Abgesehen von Glykolipiden wie α -GalCer, welches aus einem marinem Schwamm isoliert wurde (Kawano, 1997; Kobayashi, 1995), erkennen NKT-Zellen Lipide (Bendelac, 2002) und Phospholipide wie Phosphatidylinositol, welche in normalen und Tumorzellen produziert werden (Gumperz, 2000). Ein geringer Anteil der NKT-Zellen ist dazu in der Lage, mikrobielle Antigene auf CD1d zu erkennen (Fischer, 2004). Erst kürzlich konnte ein natürliches Glykolipid, Isoglobotrihexosylceramid (iGb3), identifiziert werden, welches ähnlich wie α -GalCer eine Vielzahl von NKT-Zellen sowohl der Maus als auch des Menschen stimulieren kann (Zhou, 2004). Dies ist sehr wahrscheinlich nicht der einzige endogene Ligand, wie die Reaktion einer NKT-Subpopulation auf das Disialogangliosid GD3 zeigt (Wu, 2003). Darüber hinaus sind bisher noch keine weiteren Antigene bekannt, die die Mehrheit der NKT-Zellen stimulieren können. Die NKT-Zellen der Maus sind in der Diversität ihres T-Zellrezeptors beschränkt, sie weisen ein invariables Rearrangement der variablen und der Verbindungsregion der TCR- α -Kette auf (V α 14-J α 18, vormals J α 281 oder J α 15). Zusammen mit diversen V β 8.2-, bzw. zu einem geringeren Anteil mit V β 7- oder V β 2-Rearrangements, bilden sie den invariablen NKT-Zellrezeptor (Hammond, 2003, Bendelac, 1997). iNKT-Zellen der Maus und des Menschen besitzen ähnliche Phänotypen und erkennen beide α -GalCer, das von CD1d präsentiert wird (Hammond, 2003). Humane NKT-Zellen exprimieren variable Regionen, die ortholog zu den Regionen bei der Maus sind und ebenfalls ein invariables Rearrangement beinhalten (V α 24-J α 18).

1.2.10.3 NKT-Zellen verschieben die Balance der Immunantwort von Th1 zu Th2

In vielen Studien ist der Schutz vor Autoimmunerkrankungen durch V α 14i NKT-Zellen mit der Induktion einer Th2-Antwort gegen die Autoantigene und der Expression von Th2-Zytokinen verknüpft. Transferierte V α 14i NKT-Zellen üben ihren Schutzmechanismus gegen Diabetes über einen IL-4 und/oder IL-10-abhängigen Mechanismus aus (Hammond, 1998). Diese Th2-Polarisation der Immunantwort, die auch in V α 14i TCR-transgenen Mäusen beobachtet wird (Laloux, 2001), stellt sich nach wiederholter Behandlung mit α -GalCer auch in NOD- sowie in normalen Mäusen ein (Burdin, 1999; Singh, 1999). Auch im EAE-Modell wird eine schützende Th2-Verschiebung der Immunantwort gegen Antigene des zentralen Nervensystems durch iNKT-Zellen beobachtet (Jahng, 2001; Singh, 2001). Darüber hinaus sind V α 14i NKT-Zellen dazu in der Lage, die Differenzierung von T-Zellen in IFN- γ -produzierende Zellen zu verhindern, indem sie ihre Expansion und Proliferation unterdrücken, also bei diesen Zellen Anergie induzieren (Beaudoin, 2002). Ein Mangel an NKT-Zellen scheint auch eine Rolle bei der Entwicklung der Autoimmunität in CD95- und CD95L-defekten Mäusen (lpr/lpr und gld/gld) zu spielen, da beim Auftreten der Symptome ein Rückgang der NKT-Zellen beobachtet wird (Takeda, 1993; Mieza, 1996). Ein Widerspruch zu diesen Erkenntnissen scheint in der Tatsache zu bestehen, daß V α 14i NKT-Zellen sofort nach ihrer Stimulierung durch den T-Zellrezeptor große Mengen von sowohl IL-4 als auch IFN- γ produzieren können (Yoshimoto, 1994; Chen, 1997). In der Tat sind die V α 14i NKT-Zellen der Maus bereits vor ihrer Aktivierung vorprogrammiert, die Gene für beide Zytokine zu exprimieren, und diese Zytokinantwort ist schwer zu polarisieren (Matsuda, 2003). Die langfristige Zytokinexpression kann durch die Einwirkung weiterer Zytokine (Vicari, 1996; Hameg, 1999) oder die Kostimulation durch CD40L, die die Expression von IFN- γ fördert (Hayakawa, 2001), beeinflusst werden. Wird die CD40-CD40L Interaktion jedoch blockiert, bleibt die IFN- γ Produktion aus, während die Expression von IL-4 unbeeinflusst bleibt (Hayakawa, 2001). Darüber hinaus ist auch die Interaktion mit CD86 auf APZ für die Produktion von IFN- γ durch V α 14i NKT-Zellen erforderlich (Pal, 2001).

1.2.10.4 Gezielte Migration von NKT-Zellen

NKT-Zellen kommen in geringen Zahlen im Blut und den Lymphknoten vor, akkumulieren aber in höherem Maße in der Leber, dem Knochenmark und der Milz. Nach Aufnahme von mikrobiellem Material sammeln sich NKT-Zellen in den infizierten Geweben an (Apostolou, 1999; Mempel, 2002;

Kawakami, 2001; Matsuzaki, 1995; Naiki, 1999). Für diese Vorgänge ist eine gezielte Adressierung und Migration dieser Zellen erforderlich, die durch Chemokine vermittelt wird und das "Homing" spezifischer Subpopulationen in normales oder entzündetes Gewebe ermöglicht. Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus beruht auf der differentiellen Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren (Johnston, 2002; Moser 2001). Bei der Untersuchung der Chemokinrezeptor-expression von TCR $\alpha\beta$ -NKT-Zellen in der Milz, der Leber, dem Knochenmark und dem Blut stellte sich heraus, daß sich das chemotaktische Profil dieser Zellen deutlich von dem konventioneller NK-Zellen und T-Zellen unterscheidet (Eberl, 1999; Hammond, 1999). Die NK1.1⁺TCR β ⁺NKT-Zellen aus der Milz, die sowohl V α 14i-positive als auch –negative NKT-Zellen beinhalten, migrieren in Reaktion auf die Liganden der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR3, CXCR4 und CXCR5, zeigen jedoch keine Reaktion auf die Liganden anderer Chemokinrezeptoren (Johnston, 2003). Die deutliche Migration der meisten NKT-Zellen zu den inflammatorischen Chemokinen MIG/CXCL9 und IP-10/CXCL10, die ihre Hauptfunktion beim "Homing" aktivierter Memory/Effektor-T-Zellen in entzündete nicht-lymphoide Gewebe versehen (Dufour, 2002; Liu, 2000; Hancock, 2000; Agostini, 2001), reflektiert ihre Rekrutierung in Entzündungsherde. Die chemotaktische Reaktion der NKT-Zellen auf SLC/CCL21, das Lymphozyten in lymphoide Gewebe rekrutiert (Warnock, 2000; Stein, 2000; Forster, 1999), und BCA-1/CXCL13, das B-Zellen und spezialisierte CXCR5⁺ Th-Zellsubpopulationen in die folliculären Zonen der Lymphknoten und der Milz dirigiert (Forster, 1996; Reif, 2002; Campbell, 2001; Kim, 2001), ist hingegen relativ gering, verglichen mit der Antwort von T-Zellen, beziehungsweise von B-Zellen. Das läßt darauf schließen, daß nur kleine NKT-Zellsubpopulationen CCR7 oder CXCR5 exprimieren (Johnston, 2003). Während nahezu alle NKT-Zellen deutliche Chemotaxis als Antwort auf MIG zeigen, sind NKT-Zellen, die auf BCA-1 reagieren, ausschließlich in der Milz anzutreffen. Gleiches gilt für die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, der von einem Teil der NK1.1⁺TCR β ⁺NKT-Zellen exprimiert wird (Johnston, 2003). Dieses Merkmal scheint exklusiv den NKT-Zellen der Milz vorbehalten zu sein und ermöglicht ihnen, in B-Zellbereiche zu migrieren und so in Interaktion mit B-Zellen zu treten. Während der Toleranzinduktion gegen intraokulär applizierte Antigene (anterior chamber-associated immune deviation model: ACAID) wandern NKT-Zellen in die marginalen Zonen der Milz, wo es zur Ausbildung von Zell-Clustern aus F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen, NKT-Zellen und konventionellen T-Zellen kommt (Faunce, 2001). Dafür ist das Chemokin MIP-2, sowie sein Rezeptor CXCR2 auf den NKT-Zellen, von Bedeutung (Sonoda, 1999). Bleibt diese Interaktion aus, entsteht keine Antigen-spezifische Toleranz mehr, was durch das Fehlen von Treg-Zellen begründet werden kann (Faunce, 2001).

1.2.10.5 NKT-Zellen sind resistent gegen Apoptose

Eine weitere Eigenschaft der CD1d-restringierten NKT-Zellen ist ihre Resistenz gegenüber der Apoptose. Periphere NKT-Zellen reagieren bei starker Antigenstimulierung nicht mit Sterben durch AICD (activation-induced cell death), sondern mit einer signifikanten Herunterregulation ihres Antigenrezeptors, gefolgt von einer ausgeprägten Expansion. Sie behalten jedoch ihre funktionellen Eigenschaften, also die Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen, bei (Wilson, 2003; Crowe, 2003; Harada, 2004). Die anti-apoptotische Natur dieser Zellpopulation wird durch die Tatsache demonstriert, daß ihre Apoptosefrequenz relativ gering ist, verglichen mit konventionellen T-Zellen, obwohl sie durch dieselben Stimuli aktiviert werden (Crowe, 2003; Harada, 2004). In aktivierten NKT-Zellen werden verschiedene anti-apoptotische Gene aufreguliert, darunter Mitglieder der Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAP), anti-apoptotische Proteine, die die Empfindlichkeit von Lymphozyten für die Fas-vermittelte Apoptose kontrollieren. Darüber hinaus ist die Apoptoseresistenz an die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren gebunden (Yusuf, 2003). Eine gewisse Zeit nach der Expansion (5-7 Tage) kehrt die Zahl der NKT-Zellen *in vivo* jedoch wieder auf ein normales Maß zurück. Dies legt die Vermutung nahe, daß NKT-Zellen einer homöostatischen Regulation unterliegen, die sich eines anderen Mechanismus als der Apoptose bedient. Diese speziellen anti-apoptotischen Fähigkeiten stehen möglicherweise in Verbindung mit der regulatorischen Rolle der

NKT-Zellpopulation, denn interessanterweise sind auch $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen relativ resistent gegen AICD (Banz, 2002). Auch in diesem Zelltyp wird die Apoptoseresistenz begleitet von der Aufregulation verschiedener Gene, die mit dem Zell-Survival in Verbindung stehen, darunter Mitglieder der TNFR (TNF-receptor)-NGFR (nerve growth factor receptor)-Superfamilie, wie OX40, 4-1BB und GIT-R (Gavin, 2002), die häufig in Verbindung mit Toleranz und Immunregulation erwähnt werden. Die TNFR-NGFR-Signalgebung induziert die Aktivierung von NF- κ B, die der Fas-vermittelten Apoptose entgegenwirkt. Ähnlich wie NKT-Zellen exprimieren auch Treg-Zellen einen aktivierten Memory-Phänotyp und entstammen dem Thymus (Jordan, 2001). Es existieren noch weitere Subpopulationen von B- und T-Zellen, die wie NKT-Zellen ein beschränktes Repertoire von semi-invarianten, autoreaktiven Antigenrezeptoren exprimieren und einen aktivierten Memory-Phänotyp besitzen, darunter B-1 B-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen, die als "innate lymphocytes" eine ganze Reihe von Immunreaktionen regulieren (Bendelac, 2001).

Die NKT-Zellen bilden eine zweite Sorte regulatorischer T Zellen, auch sie sind Teil des konstitutiven T-Zellrepertoires (Hong, 2001; Sharif, 2001; Miyamoto 2001). In ihrer Hauptfunktion sind sie Teil des "Innate immune system" und regulieren hier die Differenzierung von T-Zellen durch die Freisetzung von Zytokinen (Shi, 2001). Die Funktion der NKT-Zellen kann zwischen aggressiv während der Immunreaktion gegen Tumore und suppressiv während der Autoimmunität variieren. Die kontroversen Immunfunktionen können auf die gleichzeitige Expression von IFN- γ , welches die Produktion von IL-12 durch APZ induziert (Yang, 2000), und die Produktion von Th2-Zytokinen (Matsuda, 2003), sowie die Generierung von tolerogenen dendritischen Zellen zurückgeführt werden (Vincent, 2003). Das Zytokinprofil der NKT-Zellen ist von der Art der Stimulation ihres TZR abhängig. Verschiedene Analoga des α -GalCer können entweder die Stimulation von Th1-Antworten (Schmieg, 2003) oder aber Th2-Antworten (Miyamoto, 2001) zur Folge haben. Der Ausgang der Aktivierung ist vermutlich abhängig von der reziproken Interaktion zwischen den NKT-Zellen und dendritischen Zellen, die das exprimierte Zytokinprofil beider Zelltypen bestimmt und somit den Th-Zellphänotyp und das Ausmaß der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten beeinflusst (Wilson, 2003). Auch die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen könnte eine Erklärung liefern, wie zum Beispiel die variable Expression von CD4 durch humane NKT-Zellen verdeutlicht (Gumperz, 2002; Lee, 2002). Verschiedene Subpopulationen könnten eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen. Eine weitere Möglichkeit besteht natürlich darin, daß NKT-Zellen nach ihrer Stimulation immer die gleiche Art von Faktoren produzieren, deren Wirkung aber abhängig vom jeweiligen verwendeten experimentellen System oder Mausstamm unterschiedliche Ausprägungen zeigt. Auch die Zeit kann hierbei eine Rolle spielen (Godfrey, 2004).

1.2.11 Funktion vonIDO bei der Regulation von Immunreaktionen

Betrachtet man das Phänomen der Immuntoleranz, so werden verschiedene Mechanismen beschrieben, die letztendlich alle in der Unterdrückung von Effektorantworten gipfeln. Dazu gehört die Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen durch Treg-Zellen, die Unterdrückung von Immunreaktionen auf der Ebene der APZ, sei es durch DZ oder auch durch Makrophagen, oder die Beeinflussung der Immunantwort durch die Expression von Zytokinen durch die unterschiedlichsten Zelltypen, die die Ausbildung einer ganz speziellen "Mikroumgebung" zur Folge hat. Es scheint jedoch, daß kein einziger dieser Mechanismen das Phänomen der Immuntoleranz in jeder erdenklichen Situation erklären kann. Nur in der Summe all ihrer Eigenschaften haben diese verschiedenen Mechanismen die Ausbildung der Toleranz zur Folge. Ein weiterer Mechanismus der Immunsuppression beeinflusst den Tryptophankatabolismus. Im Mittelpunkt der Regulation steht die essentielle Aminosäure Tryptophan. Auf den ersten Blick hat der Tryptophankatabolismus keinerlei Verbindung mit immunregulatorischen Prozessen, und bei der Prozessierung des Tryptophans spielen Interaktionen zwischen Liganden und Zelloberflächenmolekülen keine Rolle. Dennoch deutet eine Fülle von Daten auf einen Zusammenhang zwischen Tryptophanabbau und aktiver Immuntoleranz hin (Mellor, 2003). Erste Hinweise zeigen sich in der Inhibition der T-Zellproliferation durch humane

Makrophagen, die mit einem Verbrauch des anwesenden Tryptophans einhergeht (Munn, 1999). Säuger besitzen zwei intrazelluläre Häm-Gruppen-tragende Enzyme, die den oxidativen Katabolismus von Tryptophan katalysieren, zum einen Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), zum anderen Tryptophandioxygenase (TDO) (Taylor, 1991). TDO wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, es erfährt keine Regulation durch das Immunsystem. IDO hingegen wird in vielen Geweben exprimiert (Takikawa, 1986), so zum Beispiel im Thymus, den Lymphknoten, der Milz, dem Darm, der Lunge und den Kontaktbereichen zwischen Foetus und dem Gewebe der Mutter während der Schwangerschaft, alles potentielle Kontaktflächen zu fremden Antigenen bzw. wichtige Bereiche für die Entwicklung des Immunsystems. Dies deutet darauf hin, daß die Expression von IDO als natürlicher immunregulatorischer Mechanismus dient (Mellor, 1999). Auch die Stimulation von APZ, und hier speziell der DZ, in Folge von Infektionen und Gewebeentzündungen führt unter anderem zur Expression von IDO, das eine wichtige Rolle im Tryptophankatabolismus spielt. Die immunsuppressiven Konsequenzen der Aktivierung von IDO in DZ bestehen in einer verringerten Proliferation von T-Zellen, erhöhter Apoptose und einer Abschwächung von Immunantworten *in vivo* (Munn, 1999; Munn, 2002; Hwu, 2000; Fallarino, 2002). Durch Zugabe des spezifischen IDO-Inhibitors 1-Methyltryptophan (1-MT) jedoch kann die T-Zellproliferation wiederhergestellt werden (Munn, 2002; Hwu, 2000), und T-Zellreaktionen, die ohne Inhibitor regulatorischen Prozessen unterliegen, werden gefördert und führen zur Verstärkung von EAE (Sakurai, 2002), Abstoßung von Lebertransplantaten (Miki, 2001) und zum Verlust des Foetus während der Schwangerschaft bei der Maus (Munn, 1998). Älteren Arbeiten zufolge besteht die biologische Rolle von IDO in der Suppression mikrobieller Infektionen durch die Verminderung der Tryptophanmenge in entzündeten Geweben (Taylor, 1991, Thomas, 1993; Carlin, 1989).

1.2.11.1 Induktion von IDO durch pro-inflammatorische Zytokine

IDO wird von verschiedenen Zelltypen nach Stimulation mit IFN- γ exprimiert, darunter bestimmte Abkömmlinge der myeloiden Linie (Makrophagen und DZ), Fibroblasten, Endothelzellen und einige Tumorzelllinien (Burke, 1995; Varga, 1996; Munn, 1999; Hwu, 2000). Abgesehen von Makrophagen besitzen auch murine dendritische Zellen eine hohe IDO-Aktivität, welche für die Unterdrückung von DTH-Reaktionen durch die CD8 α^+ Subpopulation, insbesondere nach Aktivierung durch IFN- γ , verantwortlich sein könnte (Grohmann, 2000; Grohmann 2001). Außerdem vermitteln CD8 $^+$ DZ *in vitro* sehr effektiv die IDO-abhängige Apoptose von T-Zellen (Fallarino, 2002). Sowohl die Inhibition der T-Zellproliferation durch Tryptophandepletion, als auch die Induktion der T-Zellapoptose repräsentieren wichtige Grundlagen der allgemeinen immunregulatorischen Eigenschaften des Enzyms. Somit stellt die Expression von IDO durch DZ und ihre Modulation durch Zytokine einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der T-Zellhomöostase und der Selbsttoleranz dar (Grohmann 2001). Diese wichtige Funktion ergibt sich aus der Beobachtung, daß IDO durch IFN- γ induziert wird, was eigentlich im Widerspruch zur pro-inflammatorischen Natur von IFN- γ steht. Allerdings wird so eine für den Körper schädliche Immunreaktion, zum Beispiel gegen Autoantigene, bereits bei der Induktion begrenzt. Es ist ein im Immunsystem immer wiederkehrendes Prinzip, daß eine Entzündung gleichzeitig auch eine ausgleichende, anti-inflammatorische Reaktion auslöst. Allerdings ist es nicht ganz korrekt, IFN- γ als rein pro-inflammatorisches Zytokin zu betrachten, da es abhängig vom jeweiligen experimentellen System bzw. vom Zeitpunkt seiner Expression während der Immunantwort auch anti-inflammatorische und tolerogene Effekte haben kann (Grohmann, 2003). Auch die Zytokine IL-2 und IL-12 können in Abhängigkeit von IFN- γ die Expression von IDO bewirken (Carlin, 1987; Yu, 1996). In einigen Geweben wird die Expression von IDO unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen ausgelöst, wie Krebs oder viralen und bakteriellen Infektionen, unter anderem auch HIV (Saito, 1991; Heyes, 1998; Thomas, 1993; Grant, 2000; Mellor, 1999). Dies deutet auf einen weiteren IFN- γ -unabhängigen Mechanismus der IDO-Induktion hin. Beschrieben wird die Initiation durch LPS-Stimulation (Fujigaki, 2001). Eines der Hauptziele von LPS *in vivo* sind Makrophagen bzw. Monozyten, die bei ihrer Aktivierung durch LPS pro-inflammatorische

Zytokine, unter anderem TNF- α und IL-1 β , sekretieren (Matic, 1991; Arend, 1986; Bailly, 1990). Bei diesen Zellen konnte die Induktion von IDO in Abhängigkeit von TNF- α und IL-1 β , jedoch unabhängig von IFN- γ gezeigt werden (Fujigaki, 2001). Ist die Expression von IDO jedoch gestört, kann es zum Ausbruch von Autoimmunkrankheiten kommen, wie im Fall von NOD Mäusen, die zur Ausbildung von Diabetes neigen. In diesen Tieren ist der intrazelluläre Stat1-Signalweg durch die Produktion von Peroxynitrit blockiert, was die Induktion von IDO verhindert (Grohmann, 2003). Werden die Tiere jedoch zum richtigen Zeitpunkt mit TNF- α (Christen, 2001) oder IFN- γ behandelt (Sobel, 2002), oder *ex vivo* IFN- γ -stimulierte DZ übertragen (Shinomiya, 1999), wird die Krankheit aufgehalten. In Situationen, in denen die Suppression von T-Zellantworten nicht wünschenswert ist, wie der Bekämpfung von Inflammationen, besteht jedoch auch die Möglichkeit, die IDO-Expression durch Faktoren zu verhindern, die die Reifung von APZ fördern, wie die Ligation von CD40 (Grohmann, 2001) oder die Expression der Zytokine IL-4 und TGF- β (Musso, 1994; Yuan, 1998; MacKenzie, 1999).

1.2.11.2 Funktionelle IDO-Expression erfordert die Aktivierung von DZ

Aktuelle Daten zeigen, daß funktionelles IDO-Enzym in bedeutenden Mengen von speziellen Subpopulationen myeloider Zellen, im besonderen CD11c⁺CD8 α ⁺ DZ der Maus und kultivierte CD123⁺ DZ des Menschen, exprimiert wird (Fallarino, 2002; Munn, 2002). Die CD11c⁺CD8 α ⁺ DZ der Maus sind dafür bekannt, die Immunregulation zu vermitteln (Grohmann, 2001; Shortman, 2002). Unter Standardkulturbedingungen mit GM-CSF und IL-4 weist bereits ein signifikanter Teil der humanen DZ IDO-Expression auf (Munn, 2002). Erst kürzlich konnte die funktionelle Expression von IDO in einem weiteren Zelltyp, den plasmazytoiden DZ (pDZ) gezeigt werden, welche sich durch die Expression von CD11c, B220 und CD19, sowie eines unreifen Phänotyps hervorheben (Munn, 2004). Das IDO-Protein (Apoenzym) wird von einem Gen mit 10 Exons auf Chromosom 8 sowohl der Maus als auch des Menschen kodiert, hat ein Molekulargewicht von 42 bis 45 kDa und ist hoch konserviert (Suzuki, 2003). IDO kann von DZ konstitutiv exprimiert werden. Die Expression von IDO allein bedeutet jedoch nicht, daß das Enzym auch enzymatisch aktiv ist (Fallarino, 2002; Munn, 2002), erst durch die Aktivierung der Zellen über IFN- γ und die Ligation von CD80/CD86 erlangt es seine enzymatische Aktivität (Munn, 2004). Es existieren verschiedene Isoformen dieses Enzyms, die vermutlich durch post-translationale Modifikation entstehen (Munn, 2002). Dabei kommen alternatives Spleißen, die Regulation der Proteinstabilität und Inhibitoren als mögliche Mechanismen in Frage (Mellor, 2004). Ebenso beeinflussen biochemische Faktoren in der Zelle, wie Stickoxide (NO), die Biosynthese des Enzymkofaktors Häm und das Redoxpotential, die Aktivität und Stabilität von IDO (Bodaghi, 1999; Thomas, 2001; Hucke, 2004). Dies erklärt möglicherweise, warum IDO-Aktivität in murinen CD11c⁺CD8 α ⁺ DZ gefunden wird, aber nicht in CD11c⁺CD8 α ⁻ DZ, obwohl ähnliche Mengen von IDO-Protein in beiden Subtypen exprimiert werden (Fallarino, 2002).

1.2.11.3 Aufregulation von IDO durch Liganden

1.2.11.3.1 Durch CTLA-4

IDO wird durch verschiedene Liganden oder auch Antikörper aufreguliert, die Zelloberflächenmoleküle auf den APZ vernetzen, darunter CD80/86, CD200R und der Fc-Rezeptor Fc ϵ RI (von Bubnoff, 2002; Grohmann, 2002; Gorczyński, 2002; Fallarino, 2004). In diesem Zusammenhang konnte die IDO-Aufregulation durch die Ligation von CD80 oder CD86 mit dem immunomodulatorischen Molekül CTLA-4-Ig bei DZ der Maus nachgewiesen werden. Als Resultat kommt es zur Freisetzung von IFN- γ , welches autokrin zur Aktivierung von IDO führt (Grohmann 2003; Fallarino, 2003). Somit ist die Blockierung der Kostimulation nicht der einzige Mechanismus der immunregulatorischen Wirkung von CTLA-4, möglicherweise bildet die Aufregulation von IDO die Grundlage seiner tolerogenen Eigenschaften (Grohmann, 2002). Dies deutet auf eine Funktion für CTLA-4-exprimierende Zellen, wie Treg-Zellen, bei der Regulation der IDO-Expression von APZ hin,

was diese in regulatorische APZ umwandelt (Finger, 2002). Dieser Mechanismus erklärt, wie regulatorische T-Zellen die Immunantworten anderer T-Zellen unterdrücken können, ohne eine direkte Interaktion mit ihnen einzugehen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit der sogenannten "linked suppression" durchIDO exprimierende DZ. Diese IDO⁺ DZ können die T-Zellantworten auf ein bestimmtes Antigen unterdrücken, wenn dieses von benachbarten IDO⁻ DZ präsentiert wird (Munn, 2004; Mellor, 2003; Mellor, 2004). *In vitro* werden sogar Reaktionen gegen ein zweites, gleichzeitig präsentiertes Antigen unterdrückt (Munn, 2004). Auch Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Gleichmann deuten auf eine Interaktion zwischen Treg-Zellen und DZ hin, die gleichzeitig auch die Grundlage eines Amplifikationsmechanismus bildet und für die Rekrutierung vieler neuer Treg-Zellen durch die tolerogene DZ sorgt (Roelofs-Haarhuis, 2003, Mahnke, 2003; Bilsborough, 2003; Wakkach, 2003, Faunce, 2004, Gilliet, 2002). IDO-exprimierende DZ könnten demnach mit CTLA-4⁺ Treg-Zellen ein sich selbst verstärkendes Netzwerk bilden, was die Generation neuer Treg-Zellen in der Peripherie nach sich zieht (Finger, 2002), ein Mechanismus auch bekannt als infektiöse Toleranz (Roelofs-Haarhuis, 2003; Roelofs-Haarhuis, 2004, Waldmann, 2001). Die IDO-Expression durch DZ könnte auch die Expression von immunsuppressiven Faktoren, wie Zytokinen, durch andere Zelltypen bewirken, die in lymphoiden Geweben vorkommen. Hierfür kommen potentiell immunregulatorische Zellen, wie Makrophagen (Munn, 2003), Treg-Zellen und regulatorische B-Zellen (Parekh, 2003; Fillatreau, 2002), in Frage (Mellor, 2004).

1.2.11.3.2 Durch CD200

CD200 (OX-2) ist ein weit verbreitetes Zelloberflächen-Glykoprotein, welches mit seinem Rezeptor CD200R, der stark von myeloiden Zellen, wie APZ, exprimiert wird, in Wechselwirkung tritt (Wright, 2000; Wright, 2003). Es ist an der Regulation von Makrophagen und DZ beteiligt (Hoek, 2000; Rosenblum, 2003; Barclay, 2002). Die Wechselwirkungen von CD200-CD200R spielen auch eine bedeutende Rolle in der Regulation der Autoimmunität, wie die erhöhte Empfänglichkeit von CD200-defizienten Tieren für diverse Autoimmunkrankheiten demonstriert (Nathan, 2001; Gorczynski, 2001). Zusätzlich zu CTLA-4 und B7 wird es auch in hohem Maße von der humanen Plazenta während der Schwangerschaft exprimiert (Clark, 2003). Desweiteren ist CD200 dazu in der Lage, die Expression von IDO in einer ansonsten nicht-tolerogenen plasmazytoiden DZ-Subpopulation zu induzieren (Fallarino, 2004). Plasmazytoide Zellen tragen ebenfalls zur Regulation der Immunität bei, sowohl bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Toleranz als auch bei der Abwehr von Viren (Nakano, 2001; Shortman, 2002). Obwohl sich für CD200 eine Funktion als Toleranz-vermittelndes Molekül abzeichnet, sind die weiteren Ereignisse seiner Aktivierung weitgehend unbekannt (Wright, 2003).

1.2.11.4 Wirkung von IDO

1.2.11.4.1 Verbrauch der essentiellen Aminosäure Tryptophan

Der Mechanismus des Einflusses von IDO auf das Immunsystem ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Eine Hypothese besagt, daß die verringerte Proliferation von T-Zellen auf der Verarmung lokaler Gewebemikroumgebungen an Tryptophan, der seltensten essentiellen Aminosäure, durch die enzymatische Aktivität von IDO beruht (Munn, 1999; Mellor, 1999). Humane Trophoblasten und Makrophagen können auf diese Weise die Proliferation von T-Zellen verhindern. Dies ist von besonderer Bedeutung während der Schwangerschaft, um die allogene Abstoßung des foetalen Gewebes durch das Immunsystem der Mutter zu unterdrücken (Munn, 1998; Mellor, 2001). Die naiven (primären) T-Zellen können zwar noch in den Zellzyklus eintreten, ihn aber nicht vollenden (Munn, 1999; Lee, 2002). Bei beiden Versuchsansätzen exprimieren die T-Zellen die frühen Aktivierungsmarker CD69 und CD25, aber die Expression von späten Markern wie CD71 bleibt aus (Munn, 1999; Munn, 2002; Lee, 2002; Mellor, 2002). Dabei scheinen die T-Zellen in diesem Arrest-Stadium besonders sensitiv für Tryptophanmangel zu sein, sie werden empfänglich für Apoptose (Lee,

2002). Ein Mangel anderer Aminosäuren hat zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluß auf das Fortschreiten des Zellzyklus.

1.2.11.4.2 Induktion der T-Zellapoptose durch Metabolite

Eine weitere Hypothese beruht auf der Möglichkeit, daß die entstehenden Reaktionsprodukte des Tryptophanabbaus Einfluß auf die Entwicklung der aktivierten T-Zellen nehmen, indem sie deren Apoptose induzieren.IDO katalysiert den ersten und geschwindigkeits-bestimmenden Schritt im Kynurenin-Abbauweg (Shimizu, 1978; Werner, 1987; Carlin, 1989; Taylor, 1991) bei dem L-Tryptophan in N-Formylkynurenin umgewandelt wird. In weiteren Abbauschritten entstehen L-Kynurenin (KYN), Anthranylsäure (AA), 3-Hydroxykynurenin (3-HK), 3-Hydroxyanthranylsäure (3-HAA) und Quinolinsäure (QUIN) als Metabolite des L-Tryptophans (Stone, 2002). Die Induktion der T-Zell-Apoptose durch die Reaktionsprodukte durch 3-HAA und QUIN erfolgt bereits bei niedrigen Konzentrationen (Morita, 2001; Fallarino, 2002). Dabei sind Zellen des Th1-Typs empfänglicher für die Induktion der Apoptose als die des Th2-Typs (Fallarino, 2002). Der schnelle Tod der Th1-Effektorzellen führt zum selektiven Überleben der Th2-Zellen, was einen wichtigen Mechanismus für die differentielle Regulation der beiden Zellpopulationen und somit für den Ausgang der gesamten Immunreaktion darstellt (Zhang, 1997; Varadhachary, 1997). Im Gegensatz dazu sind Makrophagen und dendritische Zellen gegenüber dieser Form der Apoptoseinduktion unempfindlich, die Apoptose setzt erst bei relativ hohen Kynureninkonzentrationen ein. Die Apoptoseinduktion durch Kynurenin-Metabolite erfolgt bemerkenswerterweise nicht über die Interaktion von Fas mit seinem Liganden FasL, sondern über einen späteren Schritt im Apoptosesignalweg, der die Aktivierung von Caspase8 beinhaltet und durch Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien gekennzeichnet ist. (Fallarino, 2002; Fallarino, 2003). Trotzdem kann die Inhibition der T-Zellproliferation durch Supplementierung mit überschüssigem Tryptophan aufgehoben werden, obwohl dies auch die vermehrte Bildung der Metabolite nach sich zieht. Möglicherweise sind die Metabolite spezifisch toxisch für T-Zellen, in denen zuvor ein Arrest des Zellzyklus erfolgt ist (Munn, 1999; Munn, 2002; Sakurai, 2002).

Die Inhibition der T-Zellproliferation durch die Beteiligung des Tryptophan-Katabolismus spielt eine wichtige Rolle beim Schutz des Foetus vor den mütterlichen Immunreaktionen während der Schwangerschaft. Die Expression von IDO durch verschiedene Zelltypen wie Makrophagen und DZ kann jedoch noch weitere Bedeutung für Toleranz und Autoimmunität haben. Die Fähigkeit der CD8 α^+ Subpopulation der murinen DZ zur selektiven Induktion der IDO-abhängigen Apoptose von T-Zellen legt eine Funktion des Tryptophan-Metabolismus bei der Regulation der T-Zellhomöostase nahe. Durch Apoptose von Th1- aber nicht von Th2-Zellen wird die Ausbildung einer zellvermittelten Immunantwort unterdrückt und eine Th2-Antwort begünstigt. Die Aktivierung der Enzymaktivität von IDO unterliegt verständlicherweise einer vielfältigen Kontrolle, da sie bei konstitutiver Aktivität großen Schaden durch den Verbrauch der essentiellen Aminosäure Tryptophan oder die Unterdrückung einer erwünschten adaptiven Immunantwort anrichten könnte. Die Verschiebung der Immunreaktion zugunsten einer Th2-Antwort ist abhängig vom Pathogen nicht immer wünschenswert (Rogers, 2002).

1.2.12 Eigenschaften tolerogener DZ

Dendritische Zellen sind potente APZ, die naive T-Zellen stimulieren können (Lutz, 2002). Sie sind weitverbreitet in allen Geweben, besonders in jenen, die eine Kontaktfläche zur Umwelt herstellen, wie den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes. Sie bilden viele verschiedene Subtypen aus, die durch ihre Abstammung, die Expression von Oberflächenmolekülen und ihre biologische Funktion unterschieden werden können. Die Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen ist nicht intrinsisch festgelegt und wird unabhängig von ihrer Abstammung durch exogene Faktoren bestimmt. Dazu gehört auch die Ausbildung lokaler Zytokinmilieus. Sie bestimmen durch ihren Charakter die Auslösung einer bestimmten Art von T-Zellantwort, die entweder von Zellen des Th1-Typs, des Th2-

Typs oder regulatorischen Treg-Zellen dominiert wird. Pro-inflammatorische Zytokine, die Th1 Reaktionen fördern, verstärken die immunogene Präsentation von Antigenen durch DZ (Grohmann, 1998; Frucht, 2001). Im Gegensatz dazu fördern anti-inflammatorische oder immunsuppressive Zytokine, die Th2-Reaktionen begünstigen, die tolerogenen Eigenschaften der DZ (Link, 2001). Die chronische Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei verschiedenen Autoimmunerkrankheiten jedoch bewirkt die Ausbildung regulatorischer Eigenschaften der DZ, die dem Patienten zugute kommen. Dies führt zu der Annahme, daß pro-inflammatorische Zytokine, abhängig vom Zeitpunkt, dem Ort und der Stärke ihrer Expression, den Ausgang von Autoimmunerkrankheiten mildern können (Falcone, 1999). Das bedeutet, daß Zytokine, die Autoimmunität kontrollieren, sowohl verstärkend als auch hemmend wirken können. Die durch IFN- γ -induzierte Expression vonIDO in DZ ist ein gutes Beispiel für die ambivalente Rolle pro-inflammatorischer Zytokine.

Für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz durch DZ kommen zwei mögliche Mechanismen in Frage, zum einen das Vorkommen eines spezialisierten regulatorischen DZ-Subtyps, und zum anderen die Möglichkeit, daß alle DZ die Fähigkeit zur Initialisierung von Toleranz und Immunität haben, abhängig von ihrem Reife- oder Aktivierungszustand (Lutz, 2002). In Abwesenheit einer Infektion oder Entzündung besteht ein ständiger Strom unreifer dendritischer Zellen von den peripheren Geweben in die regionalen Lymphknoten, die endogene Antigene aufnehmen und prozessieren (Steinman, 2002; Hawiger, 2001). Diese DZ definieren das immunologische Selbst und sorgen somit für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, indem sie autoreaktive T-Effektorzellen stillstellen. Auch nach ihrer Differenzierung *in vivo* und *in vitro* haben dendritische Zellen tolerogenes Potential, je nachdem, in welchen Subtyp sie sich auf ihrer Wanderung differenzieren (Steinman, 2002; Clare-Salzer, 1992; Dhodapkar, 2001; Menges, 2002). Diese Differenzierung ist abhängig von ihrer Abstammung und den Stimuli, denen die Zellen auf ihrer Wanderung begegnen (Banchereau, 2000). Dieser Subtyp ist letztendlich ausschlaggebend für ihre Wirkung auf die T-Zell-Effektorfunktion und das exprimierte Zytokinprofil (Pulendran, 2001; Risoan, 1999; Liu, 2001). Es wird hierbei in zunehmendem Maße deutlich, daß die APZ, die an der Immunität beteiligt sind, auch an der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beteiligt sind (Shortman, 2001). Der Informationsaustausch zwischen dendritischen Zellen und verschiedenen T-Zellsubpopulationen ist nicht nur für das Priming der T-Zellen erforderlich, sondern wird auch von den dendritischen Zellen für ihre Reifung benötigt (Risoan, 1999; Shreedhar, 1999). DZ versehen wichtige Funktionen in der Induktion peripherer Toleranz, wie die Induktion von T-Zellanergie (Jenkins, 1987), Verschiebung der Balance der Immunantwort, Induktion von Treg-Zellen (Shevach, 2000) und der Apoptose aktivierter T-Zellen (Rocha, 1991). Verantwortlich für die tolerogene Wirkung ist die reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle, die Expression von FasL (Süss, 1996), die Expression bestimmter Zytokine und die Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Chang, 2002). DZ können jedoch auch über einen FasL-unabhängigen Mechanismus die Apoptose von aktivierten T-Effektorzellen auslösen und Toleranz induzieren (siehe 1.2.11). So können tolerogene DZ und Treg-Zellen zusammen die Regulation der Immunantwort übernehmen.

1.2.12.1 DZ benötigen eine spezielle Mikroumgebung

Auch die lokale Mikroumgebung kann tolerisierende Signale an die DZ liefern. Ein Beispiel dafür liefern DZ in immunprivilegierten Geweben wie dem Auge oder der Leber, die eher in tolerogener Weise agieren (Streilein, 1999; Khanna, 2000). Auch die darmassoziierten lymphoiden Geweben (GALT), die wichtig für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber der Darmflora sind, die wie Selbstantigen behandelt wird, zeichnen sich durch die Produktion tolerogener Zytokine wie IL-10 aus (Duchmann, 1997; Duchmann, 1996; Iwasaki, 1999). DZ in der Mukosa fördern bevorzugt die Ausbildung von Th2-Antworten, was auf die Interaktionen von T-Zellen und DZ in den mesenterischen Lymphknoten zurückzuführen ist (Alpan, 2001). Auch die DZ des respiratorischen Traktes zeigen diese Tendenz zur Induktion von Th2-Antworten (Koch, 1996; Kalinski, 1997; Isler, 1999). Die Eigenschaften solcher lokalen Mikroumgebungen werden größtenteils durch die

Produktion eines bestimmten Zytokinprofils, bzw. durch ein bestimmtes Angebot von kostimulatorischen Molekülen oder Liganden durch andere Zellen bestimmt, und wirken sich auf den Reifezustand und somit die Funktion der DZ aus.

1.2.12.2 Einfluß von Zytokinen auf die Funktion von DZ

Die Produktion von Zytokinen erfolgt teilweise durch andere Zellen, zum Teil sind die DZ jedoch auch selbst dazu in der Lage, durch die Produktion von Zytokinen Einfluß auf ihre Umgebung zu nehmen. Dies zeigt sich in der Beobachtung, daß als Folge der Stimulation von iNKT-Zellen durch DZ zum einen die Expression des IL-12-Rezeptors bei den iNKT-Zellen und zum anderen die IL-12 Expression der DZ selbst induziert wird (Kitamura, 1999). Aktivierte iNKT-Zellklone exprimieren unter anderem Transkripte für GM-CSF, IL-4, TNF, CCL3 und CCL4, die entscheidend für die Rekrutierung und Reifung von DZ sind (Sharif, 2001; Sharif, 2002; Wilson, 2001). Dendritische Zellen, die in der Gegenwart von iNKT-Zellen reifen, produzieren im ausgereiften Zustand eine größere Menge an IL-10 und verlieren während des Reifeprozesses die Fähigkeit zur IL-12 Produktion, was für einen tolerogenen Phänotyp spricht (Vincent, 2002; Naumov, 2001). Dies widerspricht nicht der Beobachtung, daß der Kontakt mit iNKT-Zellen die Produktion von IL-12 auslöst (Kitamura, 1999), vielmehr ist der jeweilige Zustand abhängig vom Zeitpunkt, dem betrachteten Gewebe und der Art der den DZ zur Verfügung stehenden Differenzierungssignale. In diabetischen Tieren, die eine verringerte iNKT-Zellfunktion aufweisen, kommt es zur Ausbildung eines pro-inflammatorischen autoimmunen Angriffes, die DZ produzieren IL-12 und können selbstreaktive T-Zellen aktivieren. In nicht-autoimmunen Tierstämmen, also in Abwesenheit einer Entzündung, besteht eine konstante Wanderung von unreifen DZ aus den Langerhansschen Inseln und nicht-lymphoiden Geweben in die pankreatischen Lymphknoten, wo sie Selbstpeptide in tolerogener Art und Weise präsentieren, Zytokine wie IL-10 sekretieren und für die Induktion von Treg-Zellen und der Anergie bei selbstreaktiven T-Zellen sorgen. Obwohl Th2-Antworten nicht abhängig von CD1d sind, ist der von iNKT-Zellen vermittelte Schutz gegen Diabetes an die Expression von IL-4 oder IL-10 gebunden (Hammond, 1998; Sharif, 2001; Sharif, 2002). Mit IL-10-behandelte DZ können bereits Toleranz induzieren (Steinbrink, 1997). Im ACAID-Modell der iNKT-Zell-abhängigen Toleranz ist die Interaktion von iNKT-Zellen mit CD1d exprimierenden antigenpräsentierenden Zellen in der Milz der entscheidende erste Schritt in der IL-10-abhängigen Generierung von Antigen-spezifischer systemischer Immuntoleranz, wobei die IL-10 Sekretion auf die NKT-Zellen zurückzuführen ist (Sonoda, 1999; Sonoda, 2001). Die Antigen-spezifität der Suppression wird in diesem Modell durch CD8⁺ Tregs vermittelt, die von den NKT Zellen, möglicherweise durch deren IL-10-Produktion, induziert werden (Nakamura, 2003). In NOD-Mäusen wirkt IL-4 auf dendritische Zellen und unterdrückt die Stimulation von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (King, 2001). Darüber hinaus kann IL-4 auch die Expression von IL-12 durch dendritische Zellen unterbinden, was die Ausbildung von Diabetes verhindert (O'Hara, 1996). Die Bedeutung der autokrinen Produktion von IFN- γ durch DZ wurde bereits eingehend in 1.2.11 beschrieben.

1.2.12.3 Einfluß des Reifestadiums dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind wichtige Komponenten für die Induktion von Toleranz oder Immunität. Bisher wurde die Entscheidung zugunsten Toleranz oder Immunität dem Reifezustand der DZ zugeschrieben, wobei zwischen reifen und unreifen DZ unterschieden wurde. In Übereinstimmung mit Th1- oder Th2-polarisierten Zytokinprofilen wurden auch verschiedene DZ-Vorläufer beschrieben, die nach ihrer Aktivierung bevorzugt die Differenzierung zum Th1- oder Th2-Typ vollziehen (Rissoan, 1999; Macatonia, 1995; Cella, 1996; Koch, 1996). Tatsächlich spielen wesentlich mehr Faktoren eine Rolle.

1.2.12.3.1 Unreife DZ

Der Reifezustand der DZ wurde aufgrund ihrer Fähigkeit beurteilt, kostimulatorische Signale an T-Zellen zu liefern (Roncarolo, 2001; Dhodapkar, 2001; Steinman, 2000). Dem "Danger-Model" und dem "infectious non-self model" folgend, liefern DZ in Abwesenheit einer Entzündung, in einem unreifen ruhenden Zustand, nur Signal 1 über die Ligation des TZR an T-Zellen, jedoch keine Kostimulation. Durch die unzureichende Kostimulation bei der Aktivierung werden Antigen-spezifische T-Zellen anerg (Faulkner, 2000; Steinbrink, 1999). Dies führt zur Tolerisierung potentieller autoreaktiver T-Zellen. Erst wenn ein "Danger-signal" in Form von infektiösen Nicht-Selbst-Liganden bemerkt wird, beginnen die DZ zu reifen und migrieren in die lokalen Lymphknoten, wo sie Signal 1 und 2, die Ligation des TZR in Verbindung mit der Expression kostimulatorischer Moleküle, liefern (Gallucci, 2001; Matzinger, 2002; Medzhitov, 2002). Hinsichtlich der Induktion von Toleranz stellen sich mit diesem Modell einige Probleme. Zum einen ist die Begegnung einer unreifen DZ mit einer T-Zelle in der Peripherie in Abwesenheit einer Entzündung sehr selten, zum anderen benötigen diese potentiell tolerogenen DZ ein Aktivierungssignal, um in die regionalen Lymphgefäße und die regionalen Lymphknoten zu migrieren, in denen sich naive T-Zellen vornehmlich aufhalten (Mombaas, 1995; Lee, 1993). Des Weiteren können auch reife DZ die Toleranz von CD4⁺ T-Zellen induzieren (Akbari, 2001, Menges, 2002; McGuirk, 2002). Demzufolge ist die Funktion von DZ in Immunität und Toleranz von mehr als nur ihrem Reifezustand abhängig.

1.2.12.3.2 "Semi-mature" DZ

Tatsächlich sind die Subtypen immunogener und tolerogener DZ wesentlich differenzierter. Zusätzlich zu den unreifen DZ in den Geweben existiert eine DZ-Population, die in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen in die lokalen Lymphknoten migriert (Huang, 2001). Diese Zellen transportieren Selbst-Antigene (Hemmi, 2001), die unter anderem bei der Phagozytose apoptotischer Zellen in den Geweben aufgenommen werden (Inaba, 1998). Diese DZ erfahren durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen (Huang, 2000) oder TNF- α (Menges, 2002) eine Art Reifung, die es ihnen ermöglicht, phagozytierte Selbst-Antigene auch auf MHC Klasse I-Molekülen zu präsentieren (Blankenstein, 2002). Sie exprimieren MHC Klasse II- und kostimulatorische Moleküle in vergleichbarem Umfang wie reife DZ, was sie von den unreifen DZ des Gewebes unterscheidet, produzieren jedoch keine pro-inflammatorischen Zytokine, sie befinden sich in einem "semi-mature state".

1.2.12.3.3 Reife DZ

Für ihre vollständige Reifung benötigen DZ ein "Danger-signal". Sie erhalten dieses über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den sogenannten "pattern recognition receptors" (PRR), von welchen die "toll like receptors" (TLR) die am besten untersucht sind (Medzhitov, 2001; Medzhitov, 1997). Diese Rezeptoren erkennen je nach Untertyp konservierte Strukturen sowohl gram-positiver als auch gram-negativer Bakterien, wie Bestandteile bakterieller Zellwände, Proteine der Flagellen (Hayashi, 2001), bakterielle DNA (Hemmi, 2000) oder LPS (Poltorak, 1998; Qureshi, 1999). Sie können aber auch durch Streßfaktoren wie Hitzeschockproteine aktiviert werden, die beispielsweise von nekrotischen Zellen freigesetzt werden (Ohashi, 2000). DZ werden nicht nur durch mikrobielle Faktoren aktiviert, sondern auch durch Liganden, die bei der Schädigung des Gewebes durch Entzündungen freigesetzt werden, wie TNF- α (Azzawi, 1999). Die solcherart gereiften DZ setzen Th1-polarisierende Zytokine wie IL-12 frei, die zur Differenzierung von Th1-Zellen führen (Macatonia, 1995; Cella, 1996). Zusätzlich zu diesen Faktoren wird die Reifung der DZ durch die Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen ausgelöst, die CD40L exprimieren. Die Ligation von CD40 auf den DZ mit seinem Liganden führt zu verstärkter Antigenpräsentation, Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie CD83, CD40 und MHC II (Caux, 1994), sowie der Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12. Solche DZ haben die Fähigkeit, sowohl naive CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen vollständig zu aktivieren (Ridge, 1998). Die Reifung allein ist jedoch

nicht immer ausreichend, um immunogene DZ hervorzubringen, wie die bereits beschriebenen "semi-mature" DZ beweisen.

1.2.12.4 Induktion tolerogener DZ durch Interaktion mit Treg-Zellen

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung tolerogener DZ ist die Interaktion mit Treg-Zellen sowohl des CD4⁺CD25⁺ Typs (Min, 2003; Taams, 1998) als auch des CD8⁺CD28⁻ Typs (Chang, 2002). Die CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort und der T-Zellhomöostase. Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß sie die Reifung und die Antigenpräsentation unreifer DZ verhindern, was den direkten Zell-Zell-Kontakt erfordert und durch die Expression der tolerogenen Zytokine IL-10 und TGF- β unterstützt wird (Misra, 2004). CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bewirken die autokrine Expression von IL-10 durch die DZ (Corinti, 2001), andere CD4⁺ Treg-Zellen exprimieren selber IL-10 (O'Garra, 2004). CD8⁺CD28⁻ Tregs induzieren tolerogene DZ über einen Mechanismus, der mit verminderter Aktivierung von NF- κ B einhergeht. Die meisten Faktoren, die die Induktion tolerogener DZ bewirken, inhibieren die Aktivierung von NF- κ B (Chang, 2002).

1.1.12.5 Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigen induziert tolerogene DZ

DZ nehmen verschiedene Antigene durch Rezeptor-vermittelte Endozytose auf. Dieser Vorgang wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt und bewirkt eine Aufkonzentration der Antigene in intrazellulären Vesikeln. Dieser Vorgang ist wichtig für die Generierung der Peptid-MHC-Komplexe und für eine effektive Antigenpräsentation (Trombetta, 2003). Diese Komplexe werden auf der Zelloberfläche präsentiert und führen zur Aktivierung der T-Zellen (Inaba, 2000). Die Antigenpräsentation kann jedoch auch zur Induktion von Toleranz führen (Shortman, 2001), je nach der Art des Rezeptors, der die Aufnahme vermittelt hat (Mahnke, 2003; Bonifaz, 2002). Dendritische Zellen exprimieren drei Hauptgruppen von Antigenrezeptoren, die an der Toleranzinduktion beteiligt sind: C-Typ Lektine, Integrine und Fc-Rezeptoren (FcRs). C-Typ Lektine, wie DEC-205, welches ausschließlich auf DZ exprimiert wird, binden Zuckerseitenketten auf Pathogenen und Proteinen (Cambi, 2003; Engering, 2002; Geijtenbeek, 2003). DEC-205 ist der effektivste Antigenrezeptor auf DZ. Integrine, wie CD36 und Komplementrezeptoren, binden apoptotische Zellen (Albert, 1998; Morelli, 2003). Fc-Rezeptoren wiederum, und hier im speziellen FcRIIB (Legge, 2002; Kalergis, 2002), vermitteln die Endozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen (Sedlik, 2003). Alle diese Rezeptoren sind dazu in der Lage, Toleranz zu induzieren, sie werden vornehmlich auf unreifen DZ exprimiert und verhindern mit ihrer Ligation die Reifung der DZ (Urban, 2001; Legge, 2002). Die Folge ist die Induktion regulatorischer T-Zellen. Speziell unreife DZ sind wichtige Faktoren, die mit der Induktion von Toleranz in Verbindung gebracht werden (De Smedt, 2001), tolerogene Eigenschaften werden vielfach speziell für die CD8 α ⁺ Subpopulation beschrieben, die auch zum größten Teil für die Aufnahme apoptotischen Materials verantwortlich ist (Belz, 2002; Liu, 2002).

1.2.13 Einfluß apoptotischer Zellen auf das Immunsystem

Im normalen Zustand wird die Aufnahme apoptotischen Materials als notwendig für die Generation tolerogener dendritischer Zellen angesehen, während die Aufnahme nekrotischer Zellen, wie sie durch Infektionen oder Entzündungen entstehen, für ihre Differenzierung in proinflammatorische dendritische Zellen sorgt (Sauter, 2000; Steinman, 2000). Unangemessene oder übermäßige Apoptose jedoch kann ebenso Entzündungen hervorrufen (Mathis, 2001; Green, 2000) und somit zur Generation pro-inflammatorischer dendritischer Zellen führen. Viele Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes mellitus oder SLE, haben eine Gemeinsamkeit in der veränderten Expression von Zytokinen durch Makrophagen, die ebenfalls Antigen aufnehmen und prozessieren. Die Makrophagen dieser Tiere zeigen eine Unterexpression verschiedener Zytokine nach Stimulation mit LPS in FBS-haltigem Kulturmedium, die in einer fehlerhaften Aktivierung von T-Suppressorzellen resultiert (Serreze, 1988; Jacob, 1990; Fan, 2004). Eine ähnliche Unterexpression tritt auch nach Stimulation mit anderen

Gefahrensignalen und Aktivatoren von Makrophagen auf, unter anderem auch TNF- α (Koh, 2000). Diese Beeinträchtigung der Zytokinexpression ist auch nach Kontakt mit apoptotischen Zellen oder anionischen Lipiden, wie denen, die auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen exprimiert werden (z.B. Phosphatidylserin), zu beobachten (Koh, 2000). Mögliche Kandidaten für diese Lipidbestandteile in FBS sind oxidativ modifizierte Lipide, Lipoproteine oder Lipid-Protein-Addukte, deren Aufnahme durch Makrophagen von denselben Rezeptoren vermittelt wird, wie die apoptotischer Zellen. Dabei handelt es sich unter anderen um verschiedene Scavenger-Rezeptoren (Terpstra, 1997; Fukasawa, 1996; Chang, 1999). Bemerkenswerterweise steigert die Kultur von Makrophagen nicht-autoimmuner Mausstämme in Serum-freiem Medium ebenfalls deren Zytokinexpression. Es hat somit den Anschein, daß die Reaktion von NOD-Makrophagen auf FBS die Steigerung einer normalen regulatorischen Antwort darstellt (Fan, 2004). Zu den Genen, die dieser Regulation unterliegen, gehören unter anderen die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-1 Rezeptor-Antagonist IL-6, IL-12, GM-CSF und TNF- α , sowie die Chemokine CTACK, MCP-1 MIP-2 und 6CKine (Fan, 2004). Die Folge der Regulation ist eine reduzierte pro-inflammatorische Reaktion, die letztendlich eine Verschiebung der gesamten Immunantwort zur Folge haben könnte. Dieser Mechanismus legt eine Rolle für apoptotische Zellen in der Immunhomöostase nahe. Hierbei bieten apoptotische Zellen dem Immunsystem eine beständige Quelle für Selbst-Antigene und sorgen so für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Koh, 2000). Neuere Ergebnisse zeigen, daß T-Zellen abhängig von der Herkunft der präsentierten Antigene unterschiedlich auf antigenpräsentierende Zellen reagieren, was die resultierende Immunantwort beeinflusst (Albert, 1998; Bellone, 1997; Inaba, 1998; Albert, 2001).

Die Präsentation von nekrotischem Material hingegen führt zur Reifung von immunstimulatorischen Antigen-präsentierenden Zellen (Sauter, 2000). Diesem System folgend bestehen somit verschiedene Möglichkeiten, die die Entwicklung von Autoimmunität auslösen können: 1) Fehler in der Generierung von apoptotischem Material, möglicherweise in der Induktion der Apoptose; 2) Fehler in der Kennzeichnung, der Erkennung oder der Beseitigung des apoptotischen Materials, was entweder an den Liganden auf den apoptotischen Zellen oder den phagozytischen Rezeptoren auf den Phagozyten zurückzuführen ist; 3) Fehler in der Präsentation der Selbst-Antigene, entweder bei der Prozessierung oder der Präsentation selbst; oder 4) Fehler in der Erkennung oder Interpretation der Selbst-Antigene, zum Beispiel durch Störungen in den nachfolgenden Signalkaskaden. Einer der meistuntersuchten Mechanismen ist eine Störung bei der Beseitigung der apoptotischen Zellen. Der Verlust der Membranintegrität von nicht-beseitigten apoptotischen Zellen führt zur Freisetzung von Komponenten des Zytoplasmas, die eine pro-inflammatorische Wirkung ausüben und die Immunantwort von Toleranz zu Immunität verschieben (Savill, 2000). Diese Hypothese liefert auch eine Erklärung dafür, warum in einem solchen Fall nur einige, aber nicht alle von Makrophagen produzierten Zytokine betroffen sind. Ein Effekt besteht nur auf solche Zytokine, deren Signalwege mit denen vernetzt sind, die von der Phagozytose apoptotischer Zellen stimuliert werden (Fan, 2004). Aus der kritischen Rolle, die Zytokine und apoptotische Zellen bei der Balance von Toleranz und Immunität spielen, könnte die fehlerhafte Erkennung apoptotischer Zellen ein potenter Auslöser von Autoimmunität sein.

1.3 Mögliche Bedeutung von Umweltstäuben für die Sensibilisierung gegen Nickel

Epidemiologische Studien deuten einen Zusammenhang zwischen Allergien und der Exposition gegenüber Umweltstäuben (particulate matter, PM) an, was durch experimentelle Studien bestätigt wird (Devalia, 1996; Behrendt, 1997). Dabei scheint der Metallanteil von PM für den schädlichen Einfluß auf die Gesundheit verantwortlich zu sein (Costa, 1997). PM-Exposition erhöht die Zahl kardiovaskulärer Erkrankungen und die Anzahl von Todesfällen besonders bei alten und sehr jungen Menschen speziell in Zeiten hoher Partikelbelastung (Dockery, 1993; Schwartz, 1991; Anderson, 1995). Speziell in der Nähe von Autobahnen und anderen Gebieten mit hoher PM-Exposition zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von Atemwegserkrankungen (van Vliet, 1997), experimentelle Daten

bestätigen, daß diese Beobachtungen auf PM zurückzuführen sind (Ishizaki, 1987; Diaz-Sanchez, 1999).

1.3.1 Unterteilung von PM

Stäube kommen in unterschiedlichen Größen vor, von kleinen Molekülen mit weniger als $0,0001\mu\text{m}$ Durchmesser bis hin zu Pollen und Sporen (2 bis $50\mu\text{m}$) und sehr großen, sichtbaren Staubpartikeln in der Größenordnung von $1000\mu\text{m}$ (Salvaggio, 1994). Die am häufigsten experimentell eingesetzte PM-Größe ist PM_{10} , also Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als $10\mu\text{m}$. Diese Partikel gelten als inhalierbar. Die PM_{10} -Fraktion kann weiterhin unterteilt werden in die grobe Fraktion ($\text{PM}_{10-2.5}$), die feine Fraktion ($\text{PM}_{2.5}$) und die ultrafeinen Partikel ($\text{PM}_{0.1}$). Entsprechend ihrer Größe besitzen diese Partikel unterschiedliche biologische Relevanz, wobei den beiden letztgenannten Fraktionen eine höhere Beteiligung an Gesundheitsbeeinträchtigungen und erhöhter Mortalitätsrate zugeschrieben wird (Peters, 1997; Schwartz, 1999; Schwartz, 2000). Der Hauptangriffsort der Partikel liegt in den Atemwegen. So gelangen Partikel der groben Fraktion bis in die Bronchien, während die ultrafeinen Partikel sehr viel tiefer in die Atemwege und sogar bis in die Alveolen gelangen können. Eine zweite Unterteilungsmöglichkeit besteht in der Unterscheidung in eine wasserlösliche und eine wasserunlösliche Fraktion (Soukup, 2000; Imrich, 2000). Hierbei befinden sich Proteine und biogene Faktoren in der wasserlöslichen Fraktion, während die wasserunlösliche Fraktion Kohlenwasserstoffe und den karbonösen Kern des Partikels enthält.

1.3.2 Quellen von PM

Die Zusammensetzung von PM kann stark variieren in Abhängigkeit vom Ort und dem Zeitpunkt des Sammelns. Hier bestehen starke jahreszeitliche aber auch tageszeitliche Unterschiede. Die unterschiedlichen, in der Natur vorkommenden PM entstehen im allgemeinen durch die Verbrennung von Holz oder fossiler Brennstoffe, wie bei der Verbrennung in Motoren oder durch die Verbrennung von Kohle oder Öl in Kraftwerken. In Industrieländern besteht die $\text{PM}_{2.5}$ -Fraktion hauptsächlich aus Kohlenstoffpartikeln und sekundären Partikeln, wie sauren Kondensaten, Sulfaten und Nitraten, die durch chemische Reaktionen in der Atmosphäre gebildet werden (Ormstad, 1997; Seaton, 1995). Eine weitere Möglichkeit der Entstehung bildet die Erosion von geogenem Material, hierbei besteht der Partikelkern aus Siliziumoxid. Bedeutende Quellen von $\text{PM}_{2.5}$ und $\text{PM}_{0.1}$ sind Kraftwerke und Straßenverkehr. Zwei von diesen Quellen generierte PM-Arten sind das sogenannte ROFA (Residual Oil Fly Ash) und DEP (Diesel Exhaust Particles, Dieselruß), die beide einen Partikelkern aus Kohlenstoff besitzen. Besonders ROFA trägt hohe Anteile wasserlöslicher Metallionen, wie Vanadium, Nickel und Eisen (Dreher, 1997). Zusätzlich zu den adsorbierten chemischen Substanzen tragen Kohlenstoffpartikel in der Umwelt auch verbreitete Allergene sowie Endotoxin auf ihrer Oberfläche (Knox, 1997; Ormstad, 2000; Imrich, 2000).

1.3.3 Umweltstäube als Adjuvans

Für die Sensibilisierung gegen Nickel ist die Anwesenheit eines Adjuvans erforderlich. Dieses Adjuvans bewirkt die Aufregulation von kostimulatorischen Faktoren auf der Oberfläche der APZ, die für die Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind. Auch verschiedene PM können Adjuvansfunktionen innehaben. Verschiedene Studien haben sich mit dem Einfluß von PM auf Entzündungsreaktionen beschäftigt (Driscoll, 1997b; Finkelstein, 1997; Granum, 2001b; Lovik, 1997; Oberdörster, 1992). In einem intranasalen Modell der PM-Applikation (Kurup, 1994) zeigen verschiedene PM ganz unterschiedliche Adjuvanswirkungen. Abhängig von der verwendeten PM-Art wurde die resultierende Immunantwort entweder zum mehr inflammatorischen Th1-Typ oder zum Th2-Typ verschoben, wie er auch bei der Allergie vom Soforttyp (Typ I) auftritt. Auch bei subkutaner Applikation *in vivo* ist PM dazu in der Lage, bei der Sensibilisierung gegen Antigene die

Funktion eines Adjuvans auszuüben, und je nach verwendetem PM ein ganz spezifisches Zytokinprofil zu induzieren (van Zijverden, 2000).

1.3.4 Adjuvansfunktion der verschiedenen PM-Fractionen

1.3.4.1 Effekt der wasserunlöslichen PM-Fraktion

Die Injektion von Kohlenstoffpartikeln (CBP, Carbon Black Particles), welche den reinen Kohlenstoffkern mit nur wenigen adsorbierten Chemikalien repräsentieren, in die Hinterpfoten von Mäusen bewirkt eine Zunahme des Gewichts, der Zellzahlen und der Zellproliferation in den drainierenden poplitealen Lymphknoten (PLN) (Granum, 2001b; Lovik, 1997). Die Partikel können also zelluläre Antworten auszulösen. Verschiedene Studien zeigen, daß alveoläre Makrophagen und Epithelzellen nach der Internalisation von verschiedenen PM-Typen mit der Produktion von Zytokinen beginnen, die wichtig für die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen sind (Driscoll, 1997b; Finkelstein, 1997). Dies zeigt, daß bereits der Partikelkern alleine, ohne die Abgabe chemischer Komponenten, dazu in der Lage ist, Entzündungsreaktionen in der Lunge auszulösen. Die Entzündung wiederum scheint der Grund für den Adjuvaneffekt bei der Antikörperproduktion zu sein, die von PM ausgelöst wird (Granum, 2001a, b), da es zur Ansammlung von APZ und Zytokin-produzierenden Zellen an der Eintrittsstelle des Allergens kommt.

1.3.4.2 Effekt der wasserlöslichen PM-Fraktion

Andere Studien befürworten die Ansicht, daß die an PM adsorbierten Chemikalien, insbesondere die Metalle unter ihnen, Allergie-bedingte Immunantworten verstärken. Bekannte Beispiele sind ROFA und DEP (Dreher, 1997; Fahy, 2000; Heo, 2001; Lambert, 1999). Wird ROFA mit dem Metallchelator Deferoxamin vorbehandelt, läßt sich die Produktion von IL-6 durch humane Epithelzellen der Atemwege nach ROFA-Exposition verhindern (Quay, 1998). In der Studie von Lambert *et al.* (1999) dienen unbehandeltes ROFA oder äquivalente Konzentrationen von Nickel-, Eisen- oder Vanadiumionen als Adjuvantien bei der Sensibilisierung gegen ein verbreitetes Allergen. Epithelzellen der Ratte zeigen nach *In vitro*-Exposition zu ROFA erhöhte mRNA-Mengen für IL-6 und MIP-2, ein IL-8-Analogon der Ratte (Dye *et al.*, 1999). Diese und andere Studien legen die Schlußfolgerung nahe, daß die Entzündung, die aus der Behandlung mit PM oder seinen Metallkonstituenten resultiert, die Grundlage für eine erhöhte Immunantwort und die Schädigung der Lunge bei Kontakt mit Allergen bildet (Samet, 1997; Carter, 1997; Frampton, 1999). Vermutlich ergibt sich der verstärkende Einfluß von Umweltstäuben auf allergische Immunreaktionen aus der Interaktion zwischen physikalischem Partikel und Partikel-assoziierten Metallen.

Zusätzlich zu Metallionen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, die auch Einfluß auf allergische Immunreaktionen nehmen können (Bömmel, 2000; Fahy, 2000; Tsien, 1997; Terada, 1997), trägt PM Endotoxin, ein weitverbreitetes Produkt Gram-negativer Bakterien. Endotoxin besitzt Adjuvanseigenschaften und moduliert nachhaltig Entzündungsreaktionen (Becker, 1996; Daniels, 2000; Monn, 1999; Ning, 2000). Humane Monozyten zeigen erhöhte Mengen von IL-6 und IL-8 nach Behandlung mit einem bestimmten PM₁₀, und dieser Effekt ist den Endotoxinen in PM zuzuschreiben (Monn, 1999). In der Studie von Ning (2000) können sowohl die wasserlösliche als auch die – unlösliche Fraktion, die beide Spuren von Endotoxin enthalten, die Expression von TNF- α und MIP-2 induzieren. In dieser Studie war der Hauptteil der biologischen Aktivität und des Endotoxingehalts mit der unlöslichen Fraktion assoziiert, daher schließen die Autoren auf eine synergistische Interaktion zwischen Endotoxin und anderen pro-inflammatorischen Komponenten der Partikel.

1.3.5 Verwendung von PM als Adjuvans zur Induktion der Nickelallergie

Wie bereits beschrieben besitzt PM einen ausgeprägten Adjuvanseffekt (siehe 1.3.4). In Analogie zur Rolle von Wasserstoffperoxid als Adjuvans bei der Induktion der Kontakthypersensitivität wird in dieser Arbeit in einem Mausmodell untersucht, ob die Adjuvanswirkung von PM auch für die Induktion der Nickelallergie verantwortlich sein kann. Die Partikel bringen alle Voraussetzungen mit, die für die Auslösung der Kontakthypersensitivität gegen Nickel benötigt werden. Sie besitzen zum einen eine starke Adjuvansfunktion und können pro-inflammatorische Faktoren induzieren, zum anderen tragen sie selber Nickelionen auf ihrer Oberfläche, und stellen so die räumliche Nähe zwischen Entzündung und Metallion her.

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines unkomplizierten und schnellen *In vivo*-Tests zur Untersuchung des Risikopotentials verschiedener Umweltstäube. Die bisherigen Modelle der intranasalen und intratrachealen Instillation von PM sind sehr aufwendig und langwierig. In dieser Arbeit wurde ein "early-endpoint" Modell etabliert, um die Risikoabschätzung für Stäube in nur kurzer Zeit nach ihrer Applikation anhand der Tendenz des induzierten Zytokinprofils vornehmen zu können.

1.4 Mausmodell der Nickelallergie

1.4.1 Induktion der Hypersensitivität

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Modell ist die Nickelallergie in der Maus. Lange Zeit schlugen Studien fehl, in denen versucht wurde Mäuse gegen Nickel zu sensibilisieren (Möller, 1984; Vreeburg, 1991; Mandervelt, 1997). Die einzigen Ansätze, in denen dies glückte, setzten die Aufzucht der Tiere in Nickel-freier Umgebung oder die orale Applikation außerordentlich hoher Konzentrationen von Nickelsalzen voraus (Van Hoogstraten, 1993; Ishii, 1993). Wird Nickel in Form von Ni^{2+} -Salzen jedoch zusammen mit einem Irritans, wie CFA, oder mit dem körpereigenen Entzündungsmediator IL-12, der wichtig für die Induktion der Kontakthypersensitivität ist (Riemann, 1996; Müller, 1995), verabreicht, so kommt es zur Sensibilisierung. Dies geschieht in Analogie zur Situation im Menschen, wo sich die Hypersensibilität gegen Nickel sehr viel leichter in Bereichen entzündeter Haut ausbildet. Bei Entzündungen werden reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorit (OCl^-) gebildet, die periphere DZ stimulieren können (Rutault, 1999). Darüber hinaus oxidieren sie Metallionen zu höheren Oxidationsstufen. Nickel in Form von Ni^{3+} und Ni^{4+} besitzt eine viel größere Reaktivität als Nickel der Oxidationsstufe Ni^{2+} . Es konnte gezeigt werden, daß Nickel dieser Oxidationsstufen, welche durch Koapplikation von Ni^{2+} zusammen mit H_2O_2 bzw. OCl^- *in situ* gebildet werden, Mäuse gegen Nickel sensibilisiert. Die erfolgreiche Sensibilisierung wird anhand der lokalen Immunreaktion nach erneuter Applikation von Ni^{2+} ohne Oxidantien gemessen. Hierzu wird Ni^{2+} in die Pinnae der Ohren injiziert und die Zunahme der Ohrdicke bestimmt (Mausohrschwellungstest, MEST) (Van Hoogstraten, 1993; Artik, 1999). Obwohl die höheren Oxidationsstufen von Nickel allein ausreichend für die Sensibilisierung sind (Artik, 1999), besitzt H_2O_2 zusätzlich zu seiner Funktion als Oxidationsmittel einen Adjuvanseffekt, der die Aufregulation der Kostimulaton auf APZ und die Bildung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen bewirkt. H_2O_2 wirkt auch als endogenes Adjuvans bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Diese Vorgänge wirken unterstützend bei der erfolgreichen Sensibilisierung.

Aus diesen Ergebnissen entstand der Schluß, daß Nickel selber keine Adjuvanswirkung besitzt und demzufolge alleine nicht sensibilisieren kann. Dies hat sich jedoch im nachhinein als falsch herausgestellt. Tiere, die unter Nickel-freien Bedingungen gezüchtet werden, können bereits durch Ni^{2+} ohne die zusätzliche Applikation eines Adjuvans oder eines Oxidationsmittels sensibilisiert werden (Wu, persönliche Kommunikation; Veröffentlichung in Vorbereitung). Dieser Unterschied zwischen Nickel-frei und konventionell gehaltenen Tieren ergibt sich aus der Art der Haltung. Konventionell gehaltene Tiere nehmen permanent oral Nickel aus ihrer Umgebung auf. Nickel ist im rostfreien Stahl der Käfiggitter und in den Edelstahlkappen der Trinkflaschen vorhanden. Diese

ständige Nickelaufnahme bewirkt die Induktion eines kleinen Kontingents von Treg-Zellen, die eine Grundtoleranz in diesen Tieren induzieren (siehe auch 1.5). Um diese Toleranz zu überwinden muß Ni^{2+} im Verbund mit einem Adjuvans appliziert werden, welches die kostimulatorische Funktion von professionellen APZ aufreguliert und somit für die Aktivierung Nickel-spezifischer T-Effektorzellen sorgt. Diese Toleranz kann durch den gezielten Transfer von T-Zellen konventionell gehaltener Tiere in Nickel-frei gehaltene Empfänger übertragen werden (Wu, persönliche Kommunikation; Veröffentlichung in Vorbereitung). Für die Auslösung der Zweitantwort ist Ni^{2+} jedoch ausreichend, die bereits aktivierten T-Zellen benötigen keine erhöhte Kostimulation, um ihre Effektorfunktionen zu versehen (Artik, 1999).

1.4.2 Induktion der Toleranz gegen Nickel

Das beschriebene Modell der Nickelallergie wurde von Artik *et al.* (2001) modifiziert, um die Toleranzinduktion gegen Nickel untersuchen zu können. Die Tiere erhalten vor der Sensibilisierung eine 4-wöchige orale Applikation von Ni^{2+} im Trinkwasser. Die solcherart behandelten Tiere zeigen nach dem in 1.4.1 beschriebenen MEST keine allergische Reaktion mehr (**Abb. 1**).

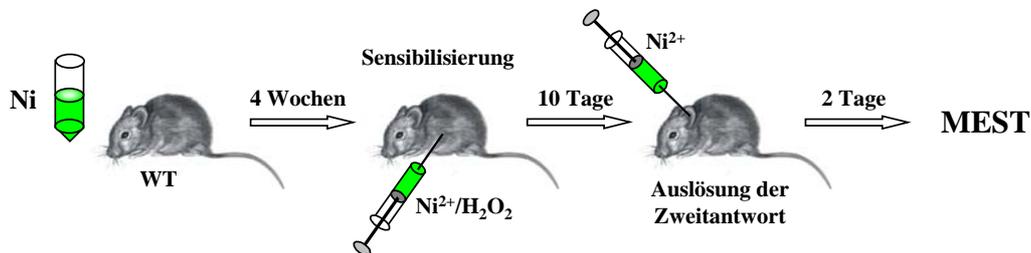


Abb. 1: Mausmodell der Nickeltoleranz. Erhalten WT-Mäuse über 4 Wochen 10 mM Ni^{2+} oral über das Trinkwasser, ist es nicht mehr möglich, sie durch die Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ zu sensibilisieren. Diese Tiere entwickeln nach Injektion von 10 mM Ni^{2+} in die Pinnae der Ohren keine Zweitantwort, das bedeutet, bei Durchführung des Mausohrschwellungstests (MEST) zeigen die toleranten Tiere keine Zunahme der Ohrschwellung.

Bei dieser Art der Behandlung wird Ni^{2+} über mukosales Gewebe der Mundschleimhaut und der Darmschleimhaut aufgenommen, analog zur Aufnahme von Nickelionen aus Zahnsparungen beim Menschen (van Hoogstraten, 1991; Kerosuo, 1996). Dies führt zur Induktion einer Antigen-spezifischen Toleranz, vergleichbar mit der Induktion der Toleranz gegen Antigene aus der Nahrung. Diese Toleranz ist gekennzeichnet durch die Entstehung Nickel-spezifischer Treg-Zellen und tolerogener APZ (Artik, 2001; Roelofs-Haarhuis, 2003).

1.4.3 Übertragung der Toleranz durch Zelltransfer

Die orale Induktion der Nickeltoleranz ist gekennzeichnet durch die Bildung Nickel-spezifischer Treg-Zellen und tolerogener APZ. Die APZ, bestehend aus sowohl DZ als auch B-Zellen, zeigen jeweils einen tolerogenen Phänotyp, gekennzeichnet durch die verstärkte Expression von DEC-205 durch DZ und verminderte Expression von CD40 bei beiden Zelltypen. Eine weitere Eigenschaft der Toleranz besteht darin, daß sie durch den adoptiven Transfer dieser Zellpopulationen auf naive Empfänger übertragen werden kann. Dabei ist in diesem Modell der Nickelallergie, im Gegensatz zu verschiedenen anderen Studien, die Beteiligung von sowohl CD4^+ - als auch von CD8^+ -Treg-Zellen erforderlich. Bemerkenswert dabei ist, daß eine Zahl von nur 10^2 Treg-Zellen oder 10^2 APZ (T-Zell-depetierte Milzzellen: DZ, jedoch hauptsächlich B-Zellen) allein für den Transfer der Toleranz ausreicht (Artik, 2001; Roelofs-Haarhuis, 2003). Auch 10^3 B-Zellen allein, die ebenfalls Antigen präsentieren können, sind dazu in der Lage (Roelofs-Haarhuis, 2003). Dies kann zum einen an der ungewöhnlichen Art der Bindung von Nickel liegen, welches auch ohne Prozessierung an TZR und MHC-Moleküle binden und somit in Verbindung mit so gut wie jedem präsentierten Peptid ein Neoantigen bilden kann (siehe 1.2.5), zum anderen an einem Verstärkungsmechanismus, der für die

Rekrutierung neuer Nickel-spezifischer Treg-Zellen und tolerogener APZ verantwortlich ist. Hierfür kommt der Mechanismus der "infektiösen Toleranz" in Frage (Cobbold, 1998).

1.4.3.1 Beteiligung der "infektiösen Toleranz" am Transfer der Nickeltoleranz

Für die Beteiligung eines solchen Mechanismus spricht die Tatsache, daß für die Übertragung der Toleranz auf einen naiven Empfänger eine Wechselwirkung der übertragenen Zellen mit ihrem entsprechenden Gegenstück im Empfänger stattfindet, also übertragene Treg-Zellen tolerogene APZ induzieren und umgekehrt. Dies konnte von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) durch serielle adoptive Transfers von Zellen toleranter Spender auf zwei aufeinanderfolgende Empfänger gezeigt werden. Werden im ersten Transfer Treg-Zellen übertragen, kann nur mit den APZ des ersten Empfängers die Toleranz auf den zweiten Empfänger übertragen werden. Die transferierten Treg-Zellen übertragen also die Toleranz auf die APZ des ersten Empfängers. Wenn jedoch für den ersten Transfer tolerogene APZ verwendet werden, kann die Toleranz nur durch die Treg-Zellen des ersten Empfängers transferiert werden, die transferierten APZ übertragen die Toleranz auf die T-Zellen des ersten Empfängers. Für die Generation tolerogener Immunzellen im ersten Empfänger ist dessen Immunisierung erforderlich, was auf eine aktive Interaktion und die Aktivierung der beteiligten Zelltypen hindeutet. Die Notwendigkeit zur Immunisierung der Tiere, um die Aktivität der Treg-Zellen zu induzieren, wird in anderen Assays zur Untersuchung regulatorischer T-Zellen bestätigt (Jiang, 2000; Ferguson, 2002). Übertragung der Toleranz mit Zellen des gleichen Typs ist hingegen nur nach zweimaliger Sensibilisierung mit Ni^{2+} und H_2O_2 und einer 10-tägigen Wartezeit zwischen den Injektionen möglich. Dies deutet darauf hin, daß nach Transfer von Treg zuerst tolerogene APZ des Empfängers induziert werden müssen, die dann ihrerseits Treg-Zellen induzieren. Entsprechend verhält es sich genau umgekehrt beim Transfer von APZ. Diese induzieren zunächst Nickel-spezifische Treg-Zellen im Empfänger, die dann ihrerseits die Toleranz an APZ des Empfängers übergeben. Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, daß die Toleranz einfach durch direkten Zell-Zell-Kontakt von APZ zu APZ bzw. von T-Zelle zu T-Zelle übergeben wird. Offenbar wirken die APZ als Anlaufstelle und Vermittler der Suppression zwischen Treg-Zellen und naiven T-Zellen. Auf diese Weise kann eine geringe Zahl tolerogener Spenderzellen die Rekrutierung einer großen Zahl Nickel-spezifischer Treg-Zellen und tolerogener APZ im Empfänger bewirken (Roelofs-Haarhuis, 2003). Neu an dieser Beobachtung ist, daß die Immunisierung auch für die Übertragung der Toleranz von APZ auf T-Zellen erforderlich ist (Roelofs-Haarhuis, 2003).

1.4.3.2 Erfordernis von NKT-Zellen im Empfänger

Zwischen dem hier beschriebenen Modell der Nickeltoleranz und dem Modell der "anterior-chamber associated immune deviation" (ACAID), bei welchem Toleranz gegen Antigene induziert wird, die durch den immunprivilegierten Bereich der Linsenvorkammer des Auges appliziert werden, bestehen viele Ähnlichkeiten. Auch in jenem Modell ist die Toleranz mit nur sehr wenigen APZ, in diesem Fall Makrophagen, übertragbar (Hara, 1992). Auch dort kann die Toleranz mit B-Zellen eines toleranten Donors übertragen werden, die die Induktion von Treg-Zellen im Empfänger bewirken (Stein-Streilein, 2002; D'Orazio, 2001; Noble, 1998). Für die Induktion der Toleranz in diesem Modell ist die Expression von CD1 durch die B-Zellen der marginalen Zone der Milz erforderlich (Sonoda, 2002), und Treg-Zellen können nur dann generiert werden, wenn CD1d-reaktive NKT-Zellen in der Milz ausreichend stimuliert werden. Dies veranlasst die NKT-Zellen, mit der Produktion von IL-10 zu beginnen, was die Differenzierung spezifischer Treg-Zellen nach sich zieht (Sonoda, 2001).

In Analogie zum ACAID-Modell ist auch im Modell der Nickeltoleranz die Anwesenheit und Mitwirkung von NKT-Zellen erforderlich. Tiere, die keine NKT-Zellen besitzen, werden nicht durch orale Nickelapplikation tolerant. Sie besitzen zwar tolerogene APZ, jedoch keine Nickel-spezifischen Treg-Zellen. Offensichtlich bilden sie während der oralen Toleranzinduktion tolerogene APZ, die allerdings die Hilfe von NKT-Zellen benötigen, um die Bildung von Treg-Zellen induzieren zu

können. Für die Sensibilisierung gegen Nickel sind NKT-Zellen jedoch nicht erforderlich, bei Immunisierung werden defiziente Tiere allergisch gegen Nickel.

Die Nickeltoleranz kann durch den adoptiven Transfer von T-Zellen eines tolerierten Spenders, die auch in geringem Umfang funktionelle NKT-Zellen beinhalten, auf NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen werden, jedoch nicht durch den Transfer von APZ (T-Zell-depletierte Milzzellen). Durch den Transfer von T-Zellen werden die defizienten Tiere mit der fehlenden Zellpopulation substituiert, und die Toleranz kann induziert werden. Werden tolerogene APZ zusammen mit NKT-Zellen unbehandelter Spender übertragen, so werden die NKT-Zell-defizienten Empfänger ebenfalls tolerant. NKT-Zellen werden also nicht nur während der oralen Toleranzinduktion benötigt, sondern auch bei der infektiösen Verbreitung der Toleranz von tolerogenen Spender-APZ auf naive T-Zellen des Empfängers. Die NKT-Zellen müssen in der Lage sein, die Zytokine IL-4 und IL-10 zu produzieren, sowie den Fas-Liganden (FasL) zu exprimieren (Roelofs-Haarhuis, 2004; Roelofs-Haarhuis, persönliche Kommunikation). Somit deutet sich eine Rolle für die Ausbildung eines spezifischen Zytokinprofils und die Apoptose bei der Induktion der Nickeltoleranz an.

Fragestellungen:

In dieser Arbeit sollen verschiedene Fragen bezüglich der Induktion der Nickeltoleranz am beschriebenen Mausmodell untersucht werden:

1. Die erste Frage beschäftigt sich mit dem Verbleib der transferierten Zellen toleranter und unbehandelter Spender nach der Sensibilisierung im Empfänger. Zur Untersuchung dieser Frage wurden Zellen toleranter und unbehandelter Spender mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und ihre Wanderung und Proliferation im Empfänger verfolgt. (Kapitel 3.1).
2. Eine weitere Aufgabe bestand in der Bearbeitung der Frage, ob die Entstehung der Toleranz durch die Expression eines speziellen Zytokinprofils gekennzeichnet ist. Hierzu wurden RNA-Extrakte aus den Zellen der axillären Lymphknoten und der Milz von unbehandelten und toleranten Tieren bzw. von Empfängern der Zellen behandelte und unbehandelte Spender hergestellt und die Zytokinexpression mittels RT-PCR untersucht. (Kapitel 3.2 + 3.3).
3. Aufgrund des in den zuvor erwähnten Versuchen beobachteten Zytokinprofils, das auf die Beteiligung eines weiteren Toleranzmechanismus unter Beteiligung des Tryptophankatabolismus hindeutet, wurde untersucht, ob unter den beobachteten Bedingungen das Tryptophan-abbauende Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert wird. Hierzu wurde die Expression von IDO an aus Knochenmark-generierten DZ auf RNA- und Proteinebene untersucht (Kapitel 3.4).
4. Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung die Fas/FasL-induzierte Apoptose für die Induktion der Nickeltoleranz hat, wurde die Möglichkeit der Toleranzinduktion in Mausstämmen untersucht, die Verlustmutationen dieser Gene aufweisen. (Kapitel 3.5.1 + 3.5.2).
5. Im weiteren Verlauf der Arbeit kam die Frage auf, welche Zellen für die Induktion der Apoptose während der Induktion der Nickeltoleranz verantwortlich sind, und welche Zellen sterben müssen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zellpopulationen von B6-Spendern auf Gen-defiziente Empfänger und im Gegenzug verschiedene Zellpopulationen von Gen-defizienten Spendern auf B6-Empfänger übertragen und die Suppression der Kontakthypersensitivität gegen Nickel untersucht. (Kapitel 3.5.3 + 3.5.4).
6. Weitere Daten der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, daß NKT-Zellen für die Induktion der Nickeltoleranz erforderlich und an der Induktion der Apoptose beteiligt sind. Sie weisen jedoch auch noch andere Funktionen auf, deren Bedeutung bisher nicht eindeutig einzuordnen war. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein System zum Zell-freien Transfer der Toleranz auf naive Empfänger etabliert, mit dem es möglich ist, zwischen den Effekten der übertragenen Zellen des toleranten Spenders und der NKT-Zellen zu unterscheiden. Somit ist es erstmals möglich, die Induktion der Apoptose durch NKT-Zellen und ihre weiteren Funktionen separat zu untersuchen. (Kapitel 3.6).
7. Die Aufgabenstellung im zweiten Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines einfach und schnell anzuwendenden *In-vivo*-Testsystems zur Risikoabschätzung von Umweltstäuben. Zu diesem Zweck wurde die Analyse der durch Injektion von Staub ausgelösten primären Reaktion durch Ermittlung der Zellzahlen sowie des resultierenden Zytokinprofils in den PLN etabliert. (Kapitel 3.7.1 + 3.7.2)
8. In der Literatur wird von der Adjuvansfunktion von Umweltstäuben *in vitro* berichtet, davon abgesehen tragen sie unter anderem Nickelionen auf ihrer Oberfläche. Deshalb wurde im MEST untersucht, ob Stäube eine Adjuvansfunktion bei der Induktion der Nickelallergie ausüben können, da sie alle notwendigen Voraussetzungen dafür erfüllen. (Kapitel 3.7.3).

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Die in dieser Arbeit eingesetzten spezifisch pathogen-freien Mäuse des Stammes C57BL6/J WT wurden von Elevage Janvier (Le Genes St. Isle, Frankreich) erworben. Die verwendeten Mäuse des Fas-defizienten Stammes B6.MRL *Fas*^{lpr}/J, im Text als *Fas*^{-/-} bezeichnet, und des FasL-defizienten Stammes B6.Smn.C3-*Tnfsf6*^{gld}/J, im Text bezeichnet als *FasL*^{-/-}, wurden von Charles River, USA, über die deutsche Vertretung Charles River, Deutschland, erworben. Die Tiere des iNKT-Zell-defizienten Stammes *Jα18*^{-/-} wurden an der Chiba Universität (Chuoku Chiba, Japan) erzeugt und 9-fach mit C57BL6-Mäusen rück-gekreuzt. Sie waren eine Gabe von Dr. Balk (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard University, Boston, MA). Die hier verwendeten Tiere stammen aus der Weiterzucht der Instituts-eigenen Versuchstierhaltung. Die Tiere erhielten Wasser und Futter ad libitum und waren 6 – 14 Wochen alt bei Beginn der Experimente. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konventionellen, nicht Nickel-reduzierten Bedingungen.

2.2 Sensibilisierung, Auslösung der Nickelallergie

Zur Sensibilisierung gegen Nickel erhalten die Mäuse eine Injektion von jeweils 50 µl 10 mM NiCl₂ und 1% H₂O₂ als Adjuvans in steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) intradermal in jede Flanke. Nach 10 Tagen erfolgt die Auslösung der Zweitantwort durch Injektion von jeweils 50 µl 10 mM NiCl₂ in die Pinnae beider Ohren, für die Injektion wird eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm verwendet. Als Sensibilisierungskontrolle erhalten die Mäuse alternativ eine Injektion von jeweils 50 µl 10 mM NiCl₂ ohne Adjuvans in steriler physiologischer Kochsalzlösung intradermal in jede Flanke. Bei diesen Tieren kann durch Injektion von 10 mM NiCl₂ in die Pinnae der Ohren keine Zweitantwort ausgelöst werden, sie entwickeln keine Ohrschwellung.

2.3 Mausohrschwellungstest (MEST)

Der Mausohrschwellungstest erfolgt zwei Tage nach Auslösung der Zweitantwort. Die Versuchsgruppen bestehen jeweils aus 5 Tieren. Die Dicke der Ohren wird durch Messung mit einem Meßtaster (Oditest S 5010, Fa. Kröplin) bestimmt. Die Messung erfolgt nahe des Außenrandes des Ohres, unterhalb der Injektionsstelle, jedoch oberhalb des Ohrknorpels. Die Messung wird doppelt blind jeweils durch zwei Personen ohne Kenntnis der Behandlung der jeweiligen Gruppe und der Meßwerte des Anderen durchgeführt. Die Berechnung der Mittelwerte und ihres Standardfehlers (SEM) erfolgte mit der Prism3 Software der Firma GraphPad. Zur Berechnung wurde die Analyse der Varianz (one-way analysis of variance "ANOVA") mit daran anschließendem Newman-Keuls-Test durchgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wird in den Graphen wie folgt angegeben: *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05).

2.4 Induktion der Toleranz durch orale Nickelapplikation

Zur Induktion der Toleranz erhalten die Mäuse vor der Sensibilisierung über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen oral eine Lösung von 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser (50% Bidest, 50% Leitungswasser).

2.5 Präparation von Lymphozyten

2.5.1 Von Milzzellen

Die sterile Präparation von Milzzellen erfolgt unter der Sterilbank. Zum Aufbrechen der Organhüllen wird jeweils eine Milz pro 5 ml sterilem PBS mit einem sterilen Stempel in einer Petrischale zerdrückt und die größeren Organstücke weiter homogenisiert. Die Organhüllen werden entfernt und die Zellsuspension durch einen Gazefilter in ein 50 ml-Greiner-Tube überführt, die Petrischale wird mit einem weiteren Volumen Medium nachgespült. Die Zellsuspension wird durch Zentrifugation mit 1200 Upm für 8 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet resuspendiert. Zur Lyse von Erythrozyten wird das Pellet von jeweils 2 Milzen für 3 min bei Raumtemperatur in 5 ml ACT-Lysepuffer inkubiert, danach wird die Zellsuspension mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt, erneut filtriert und wiederum abzentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert und pro Milz in 5 ml sterilem Endotoxin-freiem PBS zur Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer aufgenommen. Danach wird die Zellsuspension durch Verdünnung auf die erforderliche Zelldichte eingestellt.

2.5.2 Von Lymphknotenzellen

Nach der Präparation der Lymphknoten erfolgt der Aufschluß der Organhülle von 1 bis 2 Lymphknoten in 1 ml PBS in einer 24-Well-Platte durch Homogenisation mit einer gut schließenden Apothekerpinzette (Aesculab BD130), die Organhüllen werden bei Bedarf entfernt. Danach erfolgt die Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer.

2.5.3 Von Knochenmarkszellen

Die Präparation der Knochenmarkszellen erfolgt aus Ober- und Unterschenkelknochen der Mäuse. Zunächst werden die Knochen freigelegt und nahe der Hüfte und oberhalb des Fußgelenks abgetrennt. Ober und Unterschenkelknochen werden ober- und unterhalb des Knies abgetrennt und mit einer 0,45 mm Kanüle mit DMEM in eine Petrischale ausgespült. Zellklumpen werden durch mehrfaches Aufziehen durch eine 0,9 mm Kanüle suspendiert, anschließend wird die Suspension in ein 50 ml-Tube überführt. Die Zellen werden 8 min bei 1200 Upm, 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Zur Lyse von Erythrozyten werden die Knochenmarkszellen von maximal 3 Mäusen pro 5 ml ACT aufgenommen und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend werden die Zellen mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert und zur Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer in 10 ml DMEM aufgenommen. Danach wird die Zellsuspension durch Verdünnung auf die erforderliche Zelldichte eingestellt.

2.5.4 Bestimmung der Zellzahl

2.5.4.1 Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypan-Blau im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Diese Methode hat den Vorteil, daß durch die Färbung mit Trypan-Blau tote Zellen angefärbt werden, und somit die Anteile lebender und toter Zellen bestimmt werden können. Die Zellzählung erfolgt unter dem Mikroskop. Ausgezählt werden die 4 in den Ecken des Gitters liegenden Quadrate, die jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen. Nach Bildung des Mittelwertes erfolgt die Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration (Zellen/ml)} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgt durch Einbeziehung des Volumens der Zellsuspension:

$$\text{Konzentration (Zellen/ml)} \times \text{Volumen (ml)} = \text{Gesamtzellzahl.}$$

2.5.4.2 CASYton®

Jeweils 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension werden in 5 ml CASYton-Puffer pipettiert und die Zellkonzentration mit der Maschine ermittelt.

2.6 Magnetische Zellseparation

2.6.1 Von T-Zellen durch negative Selektion

Zunächst werden die zu trennenden Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Die Markierung der Zellen mit MicroBeads erfolgt in 15 ml Falcon-Tubes. Zur Separation werden jeweils 10 µl CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und 10 µl anti-MHC Class II MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pro 10^7 Zellen verwendet und mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 100 µl pro 10^7 Zellen aufgefüllt. Die Antikörperbindung erfolgt für 15 min bei 4°C. Danach wird die Suspension mit MACS-Puffer auf 15 ml aufgefüllt und für 8 min bei 1200 Upm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert, in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und die Antikörper-markierten Zellen mit dem AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), Programm "Deplete sensitiv", aus der Zellsuspension depletiert. Anschließend werden die Zellen der negativen Fraktion gezählt, pelletiert, und mit sterilem Endotoxin-freien PBS auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt. Die gesamte Separation wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Reinheit der aufgereinigten Zellpopulation wird durch Färbung mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern für die Marker CD19, MHCII, CD11c und CD3 durchflußzytometrisch kontrolliert.

2.6.2 Von B-Zellen durch negative Selektion

Die Durchführung erfolgt analog zu 2.6.1, mit dem Unterschied, daß zur Separation von B-Zellen die unerwünschten T-Zellen mit CD90 (Thy1.2) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und die DZ mit CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) markiert und depletiert werden. Auch hier wird die Reinheit der Separation durchflußzytometrisch kontrolliert.

2.7 Generation von DZ aus Knochenmarkzellen (BMDC)

Die Knochenmarkzellen werden wie in 2.5.3 beschrieben präpariert und auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml mit DMEM eingestellt. Für die Kultur werden jeweils 2×10^7 Knochenmarkzellen pro Petrischale (Durchmesser 10 cm, für T-Zell-Kultur; Greiner, Frickenhausen) eingesetzt und mit 10 ng/ml rmGM-CSF (R&D Systems, MN) behandelt. Nach jeweils 2 Tagen wird das Medium gewechselt und durch frisches DMEM mit 10 ng/ml rmGM-CSF ersetzt. Die Kultur erfolgt über 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂.

2.8 Stimulation von BMDC

2.8.1 Stimulation von BMDC mit IFN-γ

Die Knochenmarkzellen werden wie in 2.7 beschrieben kultiviert. An Tag 6 der Kultur wird das Medium gegen frisches DMEM mit 10 ng/ml rmIFN-γ (R&D Systems, MN) ersetzt und die Zellen über Nacht stimuliert. Die Kultur erfolgt bei 37°C und 5% CO₂.

2.8.2 Stimulation von BMDC durch UVB-Bestrahlung

Die Knochenmarkzellen werden wie in 2.7 beschrieben kultiviert. An Tag 6 der Kultur wird das Medium gegen Endotoxin-freies PBS ersetzt und die Zellen mit einer Dosis von 100 J/m² UVB-Licht bestrahlt. Anschließend wird das PBS gegen frisches DMEM ausgetauscht und die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.8.3 Suspendierung der BMDC

Zur Ablösung der kultivierten Zellen vom Kunststoff der Kulturschale werden sie für 1 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA (Sigma, Taufkirchen) behandelt, dann mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und in 10 ml sterilem Endotoxin-freiem PBS aufgenommen. Die Zellen werden in ein 50 ml-Greiner-Tube überführt und die Kulturschale mit 10 ml sterilem Endotoxin-freiem PBS nachgespült. Vor der weiteren Verwendung werden die Zellen pelletiert und dann im erforderlichen Medium aufgenommen.

2.9 Adoptiver Transfer von Spenderzellen

In den beschriebenen Experimenten wurden entweder 10^7 Milzzellen oder 10^3 T-Zellen bzw. B-Zellen in Endotoxin-freiem sterilem PBS übertragen. Dazu wurde die Zellkonzentration auf $6,66 \times 10^7$ /ml für Milzzellen und $6,66 \times 10^3$ /ml für T-Zellen und B-Zellen eingestellt. Für den Transfer wurden jeweils 150 µl der jeweiligen Zellsuspension i.v. in die Schwanzvene der Empfänger injiziert. Vor dem Transfer wurden die Empfänger für ca. 30 min der Bestrahlung mit Infrarotlicht zur Dilatation der Schwanzvene ausgesetzt, um die Injektion zu erleichtern.

2.10 Durchflußzytometrische Untersuchung von Zellen

2.10.1 Verwendete Antikörper

anti-CD3e-APC (145-2C11), anti-CD3e-perCP (145-2C11), anti-I-A/I-E-PE (M5/114.15.2) (MHCII), anti-CD11c-bio (HL3); anti-CD11c-APC (HL3), anti-CD19-FITC (1D3), anti-IL2-PE (JES6-5H4), anti-IL-4-PE (BVD4-1D11), anti-IL-5-PE (TRFK4), anti-IL-6-PE (MP5-20F3), anti-IL10-PE (JES5-16E3), anti-IL12 (p40/p70)-PE (C15.6), anti-IL17-PE (TC11-18H10.1), anti-IFN- γ -PE (XMG1.2), anti-TNF- α -PE (MP6-XT22), anti-CD8 α -bio (53-6.7), Ziege anti-Kaninchen-Ig-FITC (polyklonal), anti-Dec-205-FITC (NLDC145) (von DPC Biermann), polyklonales Kaninchen-anti-Maus-IDO-Serum, anti-CD16/32-purified (2.4G2) (Fc-Block), Streptavidin-perCP.

Mit Ausnahme von anti-Dec-205-FITC (DPC Biermann, jetzt ACRIS) und des Kaninchen-anti-Maus-IDO-Serums stammen alle Antikörper von BD Pharmingen.

2.10.2 Antikörperfärbung von Lymphozyten

Die Färbung von Zellen erfolgt in 96-Well-Rundboden-Platten in einem Färbevolumen von 100 µl PBS. Zur Färbung werden jeweils 1×10^5 Zellen pro Färbeansatz (ein Well) verwendet und in der 96-Well-Platte durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 Upm, 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird durch kurzes Vortexen resuspendiert und für 10 min bei 4°C mit anti-CD16/32-purified inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern (Fc-Block). Zum Waschen wird ein weiteres Volumen von 100 µl PBS zugegeben und die Zellen erneut pelletiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Pellet resuspendiert. Die Färbung erfolgt mit 100 µl eines vorbereiteten Antikörpermixes für 10 min bei 4°C im Dunkel. Ab diesem Arbeitsschritt sollten die Zellen keinem hellen Licht mehr ausgesetzt werden, da dies zur Abnahme der Fluoreszenz führen kann. Anschließend wird der Ansatz erneut gewaschen. Werden nur direkt konjugierte Antikörper verwendet, werden die Zellen nun in 100 µl PBS aufgenommen und durchflußzytometrisch untersucht. Bei Verwendung eines Biotin-konjugierten Antikörpers erfolgt stattdessen zuerst die Anfärbung des Biotins mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorochrom für 10 min bei 4°C, gefolgt von einem weiteren Waschschriff. Danach werden die Zellen zur durchflußzytometrischen Untersuchung in 100 µl PBS aufgenommen. Alle verwendeten Antikörper werden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, mit Ausnahme des anti-I-A/I-E-Antikörpers, der in einer Verdünnung von 1:4000 verwendet wird.

2.10.3 Intrazelluläre Färbung

2.10.3.1 Von Zytokinen

Die intrazelluläre Färbung erfolgte bzw analog zur extrazellulären Färbung, allerdings werden die Zellen zuvor für 20 min bei 4°C in 100 µl PBS/2% Paraformaldehyd fixiert. Danach werden die Zellen durch Zugabe eines gleichen Volumens PBS/1% BSA gewaschen. Auch die Blockierung des Fc-Rezeptors erfolgt in 100 µl PBS/1% BSA. Zum Waschen werden 100 µl PBS/BSA/0,1% Saponin zugegeben und die Zellen pelletiert. Das resuspendierte Pellet wird für 10 min bei 4°C mit 100 µl PBS/BSA/Saponin inkubiert, um die Permeabilität der Zellmembranen für die Antikörper der folgenden Färbung zu gewährleisten. Die Zellen werden erneut pelletiert und das resuspendierte Zellpellet mit dem vorbereiteten Antikörpermix in 100 µl PBS/BSA/Saponin für 45 min bei 4°C im Dunkel gefärbt. Nach einem Waschschrift mit PBS/BSA wird die Membran der Zellen durch Inkubation mit 100 µl PBS/BSA für 10 min bei 4°C wieder impermeabilisiert. Die Zellen werden erneut pelletiert, dann erfolgt die Färbung Biotin-konjugierter Erst-Antikörper mit Streptavidin-perCP in PBS/BSA wie bereits beschrieben. Nach einem erneuten Waschschrift werden die Zellen in 100 µl PBS/BSA aufgenommen und durchflußzytometrisch untersucht. Die anti-Zytokin-Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

2.10.3.2 Von IDO

Die intrazelluläre Färbung für die Analyse der IDO-Expression von BMDC wurde analog zu 2.10.3.1 durchgeführt. Das Serum gegen IDO wurde hierbei in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Zusätzlich ist jedoch ein weiterer intrazellulärer Färbeschritt zur Markierung der anti-IDO-Antikörper im Serum mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper erforderlich. Die Zellen werden nach der Inkubation mit dem anti-IDO-Serum mit PBS/BSA/Saponin gewaschen und mit dem Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG-FITC, 1:100 in PBS/BSA/Saponin) für 30 min bei 4°C im Dunkel gefärbt. Danach erfolgt die Impermeabilisierung der Zellmembranen und die Färbung Biotin-gekoppelter Erst-Antikörper mit Streptavidin-APC wie in 2.10.3.1 beschrieben.

2.10.4 CFSE-Färbung zur Beobachtung der Zellproliferation

Zur Färbung mit CFSE wird die Zellkonzentration auf 1×10^7 /ml in Endotoxin-freiem sterilem PBS eingestellt und CFSE (4×10^{-4} in DMSO) bis zu einer Konzentration von 0,5 µM zugefügt. Die Färbung erfolgt für 10 min bei 37°C. Anschließend werden die Zellen 2-mal in kaltem DMEM mit 10% FCS und einmal in PBS gewaschen, dann wird die für den Transfer der Zellen erforderliche Zellkonzentration mit PBS eingestellt.

2.10.5 Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrische Untersuchung der angefärbten Zellen erfolgt mit einem FACSCalibur™ 4-Kanal Durchflußzytometer (BD Biosciences, CA).

2.11 Induktion der Apoptose durch gamma-Bestrahlung

Die Induktion der Apoptose erfolgt durch Bestrahlung der B-Zellen mit einer Dosis von 600 rad, was einer Bestrahlungsdauer von 1 min in der Gammacell 2000 (Mølsgaard Medical, Dänemark) entspricht.

2.12 Präparation der "apoptotic bodies" sterbender B-Zellen

Vor der Präparation wird zunächst die Apoptose von 2×10^7 aufgereinigten B-Zellen wie in 2.11 beschrieben induziert. Die apoptotischen Zellen werden mit 6000 Upm bei 4°C abzentrifugiert, das resultierende Pellet wird in 6 ml sterilem Endotoxin-freiem PBS aufgenommen und für 10 min bei

15000 Upm und einer Temperatur von 4°C erneut zentrifugiert. Der Überstand wird in sterile Ultrazentrifugenröhrchen überführt, und die "apoptotic bodies" werden in der Ultrazentrifuge bei 40000 Upm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl sterilem Endotoxin-freiem PBS aufgenommen. Die Präparation der "apoptotic bodies" wurde von Rebecca Widmer (AG Grune, IuF Düsseldorf) durchgeführt, da die Prozedur in dieser Arbeitsgruppe etabliert ist.

2.13 Proteinbestimmung von "apoptotic bodies"

Die Proteinbestimmung dient zum Nachweis der erfolgreichen Präparation der "apoptotic bodies", um sicherzustellen, daß ähnliche Ausbeuten erzielt werden. Dies gewährleistet die Vergleichbarkeit der späteren Transfers. Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewendet. Dazu wurde zunächst eine Eichreihe verschiedener Verdünnungen von BSA zwischen 0 und 180 µg/ml hergestellt und jeweils 50 µl dieser Verdünnungen für die Eichreihe verwendet. Die Farbreaktion nach Zugabe von 200µl des verdünnten Bradford-Reagenzes (2:5,5) wurde photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm bestimmt. Für die Proteinbestimmung wurden jeweils die "apoptotic bodies" von $2,5 \times 10^6$ B-Zellen präpariert und in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Von dieser Proteinlösung wurden verschiedene Verdünnungen (5-fach, 10-fach, 25-fach, 50-fach) in 50 µl Bidest zur Proteinbestimmung eingesetzt. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Diese Variante des Bradford-Tests wurde von der AG Grune übernommen.

2.14 Transfer von "apoptotic bodies"

Die in 100 µl sterilem Endotoxin-freiem PBS resuspendierten "apoptotic bodies" von 2×10^7 apoptotischen B-Zellen werden analog wie Zellen verwendet und verdünnt, die Konzentration ist äquivalent zu 2×10^8 Zellen/ml. Durch Zugabe von sterilem Endotoxin-freiem PBS wird die Suspension 300-fach auf eine Konzentration von $6,66 \times 10^5$ /ml verdünnt, für den Transfer werden 150 µl der Suspension, äquivalent zu einer Zellmenge von 10^5 B-Zellen, i.v. in die Schwanzvene des Empfängers injiziert. Für den Transfer einer "apoptotic body"-Menge äquivalent zu 10^3 B-Zellen wird die Konzentration der Suspension in einem weiteren Verdünnungsschritt erneut 100-fach auf $6,66 \times 10^3$ /ml verdünnt und 150 µl übertragen.

2.15 Isolation von totaler RNA

2.15.1 Extraktion mit TRIzol[®]-Prozedur

Zur Isolation der RNA werden $5-10 \times 10^6$ Zellen in 1 ml TRIzol[®] aufgenommen, kurz durch Schütteln gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 0,2 ml Chloroform pro ml TRIzol[®] zugefügt und ausgiebig durch Vortexen gemischt. Danach erfolgt aufs Neue eine 3-minütige Inkubation bei RT, gefolgt von einer Zentrifugation bei 14000 Upm für 15 min in der Tischzentrifuge bei RT, bei der sich zwei Phasen ausbilden. Die farblose obere Phase wird in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol pro ml verwendetem TRIzol[®] zugefügt. Danach wird der Ansatz von Hand gemischt und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Die Probe wird erneut bei 14000 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und verworfen, das Pellet wird mit 1 ml 75% Ethanol pro verwendetem ml TRIzol[®] versetzt und durch Vortexen gewaschen. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 12000 Upm für 5 min bei RT. Der Überstand wird bis auf 50 µl entfernt und der Rest noch einmal für 5 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Der Rest des Überstandes wird entfernt und das Pellet für 10 min vorsichtig im Thermoblock getrocknet, darf dabei jedoch nicht völlig eintrocknen, da sich die RNA sonst nur noch schlecht lösen läßt. Anschließend wird das Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen. Das Lösen der RNA erfolgt für 5 min bei 55°C im Thermoblock. Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA bei -80°C eingefroren.

2.15.2 Bestimmung der RNA-Menge

Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgt durch die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}). Zur Messung wird 1 μ l der RNA-Lösung auf 120 μ l mit steril gefiltertem Bidest verdünnt und im sowohl die Absorption bei 260 nm (RNA) und bei 280 nm (Protein) im Photometer (Beckman DU[®]70 Spectrophotometer) gemessen. Das Verhältnis von RNA zu Protein gibt dabei Aufschluss über die Reinheit der isolierten RNA und somit die Qualität der Isolation. Die Berechnung der RNA-Menge erfolgt nach dieser Formel, wobei zugrunde gelegt wird, daß eine RNA-Konzentration von 40 μ g/ml einer optischen Einheit entspricht:

$$OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 120 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = x \mu\text{g/ml}$$

2.15.3 Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese

Die Qualität der isolierten RNA wird anhand des Zustands der in der gesamten RNA enthaltenen rRNA beurteilt. Bei guten Präparationen laufen 28S (5,1 kb) und 18S (1,9kb) rRNA als zwei scharfe getrennte Banden und dienen als interne Marker für die Integrität der isolierten RNA. Für die Gelelektrophorese werden 0,5 μ g der RNA mit DEPC-H₂O auf 10 μ l aufgefüllt und zusammen mit 2 μ l 6x Ladepuffer (PEQLAB, Erlangen) auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgt durch Gelelektrophorese auf einem 1,2%-igen Agarosegel (40 ml TAE, 0,48 g Agarose, 0,25 μ g/ml Ethidiumbromid) bei einem begrenzten Strom von etwa 50 mA und variabler Spannung.

2.16 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Für die Retranskription in cDNA wird jeweils 1 μ g RNA eingesetzt und zusammen mit 1 μ l DNase I (1 U/ μ l) (Invitrogen) und 1 μ l 10x DNase I-Puffer (Invitrogen) mit DEPC-H₂O auf 10 μ l aufgefüllt. Der Verdau der DNA erfolgt für 15 min bei RT, anschließend wird das Enzym durch Zugabe von 1 μ l 25 mM EDTA (Invitrogen) und Erhitzen für 10 min auf 65°C inaktiviert. Danach werden 2 μ g pd(T)₁₂₋₁₈-Primer (Amersham Biosciences, NJ) zugegeben. Die Anlagerung der Primer erfolgte für 5 min bei 60°C im Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra), anschließend wird der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt. Zum Ansatz werden 27 μ l eines vorbereiteten Reaktions-Mixes, bestehend aus 5 μ l DEPC-H₂O₂, 8 μ l 5x RT-Puffer, 4 μ l 100mM DTT, 2 μ l RNasin (40 U/ μ l), 2 μ l M-MLV RT (200 U/ μ l) (alle Promega, WI) und 4 μ l 10 mM dNTP-Mix (Amersham Biosciences, GB) pipettiert. Die Retranskription erfolgt im Thermocycler nach folgendem Programm: 60 min bei 37°C, gefolgt von 10 min bei 70°C, Abkühlen auf 4°C.

2.17 Erstellung genspezifischer Oligonukleotid-Primer

Die Erstellung Gen-spezifischer Oligonukleotid-Primer erfolgt mit der Software Primer3, (Whitehead Institute for Biomedical Research; Rozen, 2000), die zugehörigen Gen-Sequenzen werden über PubMed Nucleotide ermittelt.

2.18 Primersequenzen

Primer	Sequenz (5'→3')	Fragmentlänge	Annealing Temp.	Zyklen
IFN- γ	F: CAC GGC ACA GTC ATT GAA AG	198 bp	55	40
	R: GCT GAT GGC CTG ATT GTC TT			
IL-10	F: AGG GTT ACT TGG GTT GCC AA	181 bp	55	40
	R: CAC AGG GGA GAA ATC GAT GA			
IDO	F: GAA GGA TCC TTG AAG ACC AC	498 bp	59	40
	R: GAA GCT GCG ATT TCC ACC AA			
β -Actin	F: GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA	540 bp	55	30
	R: CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT			

Die Primersequenzen für β -Actin wurden freundlicherweise von Abdelhakim Lgssiar zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden über Qiagen Operon, Köln, bezogen.

2.19 Semiquantitative PCR

2.19.1 Durchführung der PCR

Die Amplifikation der Gen-spezifischen Fragmente erfolgt in einem Volumen von 25 μ l mit 1,5 mM MgCl₂. Für die Reaktion wird Taq DNA Polymerase in Aufbewahrungspuffer B (Promega, WI) verwendet. Pro Ansatz werden 2,5 μ l 10x Reaktionspuffer ohne MgCl₂ (Promega, WI), 1,5 μ l 25 mM MgCl₂ (Promega, WI), 0,5 μ l 10 mM dNTP (Amersham Biosciences, GB), 0,26 μ l Taq DNA Polymerase B (5U/ μ l, Promega, WI), jeweils 3 μ l 5 μ M 5'-Primer und 3 μ l 5 μ M 3'-Primer. Pro Ansatz werden 50 ng cDNA eingesetzt und das Volumen mit DEPC-H₂O auf 25 μ l aufgefüllt. Bei der Negativkontrolle wird die cDNA durch ein identisches Volumen DEPC-H₂O ersetzt, als Positivkontrolle wird in jedem PCR-Lauf ein Ansatz mit 50 ng cDNA von unbehandelten Milzzellen verwendet.

Die Amplifikation erfolgt nach folgendem Programm:

94°C, 5min	
94°C, 1min	} 40 Zyklen
55°C, 1 min 30 sek	
72°C, 1 min	
72°C, 10 min	
4°C, ∞	

Bei Amplifikation mit Primern für β -Actin erfolgen nur 30 Amplifikationszyklen, bei Verwendung von Primern für IDO wird eine Annealing-Temperatur von 59°C verwendet.

2.19.2 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die amplifizierten Fragmente werden durch Gelelektrophorese auf 1,2%-igen Agarosegelen (250 ml TAE, 3 g Agarose, 100 μ g Ethidiumbromid) aufgetrennt. Jeweils 12,5 μ l des PCR-Ansatzes werden mit 2,5 μ l 6x Ladepuffer gemischt und auf das Gel geladen. Zur Identifizierung der Größe der PCR-Fragmente und als Vergleichsstandard für die spätere Quantifizierung wurde 1 μ g 100 bp-Leiter-Größenstandard (PEQLAB, Erlangen) mit 10,5 μ l DEPC-H₂O und 2,5 μ l 6x Ladepuffer gemischt und

zusammen mit den PCR-Fragmenten durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt bei etwa 150 mA begrenztem Strom und variabler Spannung.

2.19.3 Nachfärbung der Agarosegele

Da Ethidiumbromid im elektrischen Feld entgegen der Richtung der DNA-Fragmente wandert, ist die Färbung in der unteren Hälfte des Gels schwächer als in der oberen Hälfte. Aus diesem Grund wird der untere Teil der Gele für 25 min in 200ml TAE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen) nachgefärbt.

2.19.4 Auswertung mit Quantity One®

Nach der Färbung werden die Gele mit einem Fluor-S™ MultiImager (Bio-Rad Laboratories, CA) eingescannt. Die Quantifizierung erfolgt mit der Quantifizierungs-Software Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, CA). Die DNA-Banden werden mit Feldern gleicher Größe markiert, als Eichreihe dienen die 400 bp-, die 300 bp- und die 200 bp-Bande des Größenstandards. Das Programm errechnet die Intensität der Färbung bezogen auf die markierte Fläche, durch Vergleich mit der Eichreihe wird die DNA-Menge der Bande berechnet. Die amplifizierte DNA-Menge korreliert mit der Menge der exprimierten mRNA in den Ursprungszellen. Das Verhältnis aus Expression des untersuchten Gens zur Expression des Housekeeping-Gens β -Actin gibt die relative Expression wieder. Die in den Abbildungen angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus zwei voneinander unabhängigen PCR-Läufen, die untereinander anhand der Expression der Positivkontrolle korrigiert werden, um technisch bedingte Abweichungen zwischen den Läufen ausschließen zu können.

2.20 Herstellung von Staubsuspensionen zur *In-vivo*-Analyse

2.20.1 Verschiedene PM-Typen

Zur Untersuchung der Adjuvanswirkung von Stäuben bei der Sensibilisierung gegen Nickel wird Acetylene Carbon Black (STREM Chemicals, MA) als Partikel zusammen mit Ni^{2+} injiziert. Im PLN-Assay werden Suspensionen von SRM1648 (NIST, MD) sowie PM_{10} , welches in den Niederlanden gesammelt und freundlicherweise von F. Cassee (RIVM Bilthoven, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde, in physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Nähere Informationen zu diesem PM_{10} sind nicht bekannt.

2.20.2 Verwendete Filtertypen

In dieser Arbeit wurden folgende Filter verwendet:

Nitrozellulosefilter Whatman WCN (Whatman, GB), Teflonfilter Gelman TF1000 (Gelman Sciences, GB). Die PU-Filter wurden von F. Cassee (RIVM Bilthoven, Niederlande) zur Verfügung gestellt, Herstellerangaben sind nicht bekannt.

2.20.3 Extraktion von PM von unterschiedlichen Filtertypen

2.20.3.1 NC-Filter

Zur Extraktion wird eine Fläche von 10 cm² des Filters mit einer Keramikscherer ausgeschnitten und zusammen mit 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung kräftig von Hand geschüttelt. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und die enthaltenen Partikel für 5 min im Ultraschallbad suspendiert.

2.20.3.2 Teflon

Zunächst wird der Kunststoff-Trägererring des Filters mit einer Keramikschere entfernt, der gesamte Filter (Fläche 10 cm²) in 1 ml sterile physiologische Kochsalzlösung überführt, und die Partikel durch Vortexen vom Filter abgelöst. Der Filter wird mit einer Kunststoff-Pinzette entfernt und die Partikel für 5 min im Ultraschallbad suspendiert.

2.20.3.3 Polyurethanschaum

Zu Beginn wird überschüssiges Filtermaterial, welches keine Partikel trägt, mit einer Keramikschere entfernt. Der Filter wird in einem 50 ml-Greiner Röhrchen in 10 ml 100% Methanol p.a. (Merck, Darmstadt) für 20 sek kräftig durch Vortexen ausgewaschen. Anschließend werden 5 ml ultrareines Wasser zugefügt und erneut für 20 sek mit dem Vortex gemischt. Der Filter wird in Wasser/Methanol für 3 min mit Ultraschall (im Ultraschallbad) behandelt und erneut für 20 sek durch kräftiges Vortexen gemischt. Der Filterstreifen wird mit einer Kunststoffpinzette ausgedrückt und entfernt. Anschließend wird das Methanol unter Stickstoffatmosphäre eingedampft, um die Oxidation der adsorbierten Substanzen zu verhindern, und die verbliebene Suspension bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

2.21 Applikation von PM

2.21.1 In die Fußsohle

Zur Untersuchung im PLN-Assay werden jeweils 50 µl der PM₁₀-Suspension (3 mg/ml) intradermal in beide Fußsohlen injiziert. Zum Vergleich werden jeweils 50 µl einer Suspension gleicher Konzentration des kommerziell erhältlichen Staubs SRM1648 in die Fußsohlen einer weiteren Versuchsgruppe injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten Injektionen von jeweils 50 µl steriler physiologischer Kochsalzlösung bzw. blieben unbehandelt.

2.21.2 In die Flanke

Zur Untersuchung des Adjuvanseffektes von Stäuben bei der Sensibilisierung gegen Nickel erhielten die Mäuse Injektionen von jeweils 50 µl einer 10 mM oder 30 mM Ni²⁺-Lösung gemischt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Acetylene Carbon Black (20 mg/ml, 40 mg/ml oder 80 mg/ml) subkutan in die Flanke. Die Tiere einer weiteren Versuchsgruppe erhielten Injektionen von 50 µl einer 30 mM Ni²⁺-Lösung gemischt mit 3 mg/ml SRM1648. Die Kontrollgruppen erhielten jeweils Injektionen von 50 µl einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung mit identischen Konzentrationen von Acetylene Carbon Black bzw. SRM1648, bzw. 50µl der gleichen Lösungen ohne Zusatz von Partikeln.

2.22 PLN-Assay

Zur Untersuchung der Reaktion in den poplitealen Lymphknoten erfolgt die Injektion in beide Fußsohlen wie in 2.21.1 beschrieben. Die Versuchsgruppen bestehen aus jeweils 3 Tieren. Nach 3 bzw. nach 7 Tagen erfolgt die Präparation der poplitealen Lymphknoten und die Ermittlung der Zellzahlen pro Maus. Die Berechnung der Indizes erfolgt durch Bildung des Quotienten aus den Zellzahlen der experimentellen Gruppen und der Zellzahl der mit NaCl injizierten Kontrollgruppe. Vor der Zytokinfärbung werden die PLN-Zellen gruppenweise vereinigt. Die Berechnung der Indizes der Zytokinexpression erfolgt durch Bildung des Quotienten aus der Zahl Zytokin-exprimierender Zellen in den experimentellen Gruppen und der Zahl Zytokin-exprimierender Zellen in der NaCl-behandelten Kontrollgruppe.

2.23 Puffer und Medien

ACT-Medium:

(für 1 Liter:)

2,06 g Tris (Serva, Heidelberg)

8,55 g NH₄Cl (Merck, Darmstadt)

pH einstellen auf 7,2

CASYton-Puffer:

(für 1 Liter:)

7,93 g NaCl

0,38 g Na₂-EDTA

0,40 g KCl

0,19 g Natriumdihydrogenphosphat

1,95 g Dinatriumhydrogenphosphat

0,3 g Natriumfluorid

(alle Merck, Darmstadt)

DEPC-H₂O:

Steril ansetzen:

0,2 ml Diethyl-Pyrocbonat (Sigma, Taufkirchen)

100 ml Ultra Pure Water (DNase und RNase-Frei) (GIBCO Invitrogen, NY)

Rühren über Nacht, gefolgt von Autoklavierung

1 ml Aliquots bei -20°C einfrieren

DMEM-Medium:

mit 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin + Natriumpyruvat

(PAA Laboratories, Cölbe)

10% FCS (PAA Laboratories, Cölbe)

1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (GIBCO Invitrogen, NY)

1µl β-Mercapto-EtOH (Sigma, Taufkirchen) pro 100 ml DMEM

MACS-Puffer: (Für 1 Liter)

895 ml Millipore-Wasser

100 ml 10x PBS endotoxin-frei (Sigma, Taufkirchen)

0,5% FCS (PAA Laboratories, Cölbe)(5ml)

0,7444g EDTA (2mM) (Sigma, Taufkirchen)

Nickel-Wasser (für orale Behandlung): (Für 5 Liter)

11,88 g NiCl₂·6H₂O (Sigma, Taufkirchen)

2,5 l Bidest

2,5 l Leitungswasser

Ni²⁺/H₂O₂ zur Sensibilisierung:

(für 100 ml:)

0,238 g NiCl₂·6H₂O (Sigma, Taufkirchen)

3,33 ml 30% H₂O₂ (Merck, Darmstadt)

96,67 ml sterile 0,9% NaCl-Lösung (Fresenius, Bad Homburg)

1x PBS steril Endotoxin-frei (Sigma, Taufkirchen)

PBS/1% BSA:

(für 100 ml:)

1x PBS (Sigma, Taufkirchen)

1 g BSA (Sigma, Taufkirchen)

Steril filtrieren mit Acrodisc Filter, Porengröße 0,2µm (Pall)

PBS/2% Paraformaldehyd:

2% Paraformaldehyd (Sigma, Taufkirchen) in sterilem PBS
Lösen für 1 h bei 65°C

1x TAE-Puffer :

(für 1 Liter)

4,84 g Tris

1,14 ml Eisessig (Merck, Darmstadt)

2 ml 0,5M EDTA (Sigma, Taufkirchen) pH8

pH einstellen auf 8,5

3 Ergebnisse

3.1 Lymphozyten migrieren bei Sensibilisierung in Lymphknoten und Milz

In unserem Mausmodell der Nickelallergie und -toleranz erfolgt die Sensibilisierung der Tiere durch die subcutane (s.c.) Injektion von entweder $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, Ni^{2+} oder NaCl in die Flanke. Bei der Sensibilisierung wird Antigen, in diesem Fall Nickel, von APZ aufgenommen und von diesen Zellen in die drainierenden Lymphknoten transportiert. In unserem Modell handelt es sich dabei um die axillären (axLN), weniger um die inguinalen Lymphknoten. Dort erfolgt die Antigenpräsentation und die Aktivierung spezifischer T-Effektor- bzw. Treg-Zellen. In diesem Experiment wird die Migration von Lymphozyten naiver oder oral tolerisierter Spendermäuse nach Transfer in nicht-sensibilisierte Empfänger untersucht. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen der verschiedenen Spender zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester) markiert. Dieser Farbstoff wird in die Zellen aufgenommen und wird bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen auf Mutter- und Tochterzelle verteilt. Er eignet sich somit nicht nur dafür, die Migration der markierten Zellen zu verfolgen, sondern auch deren Proliferation. 24h nach dem Transfer der markierten Zellen erfolgt die Sensibilisierung der Empfänger durch Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, Ni^{2+} oder NaCl in die Flanke. Nach entweder 6, 12, 24 oder 48 Stunden werden die axLN und die Milz der Empfänger präpariert und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Anschließend wird der Anteil und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CFSE-markierten Zellen in diesen Suspensionen gemessen und miteinander verglichen (**Abb. 2**).

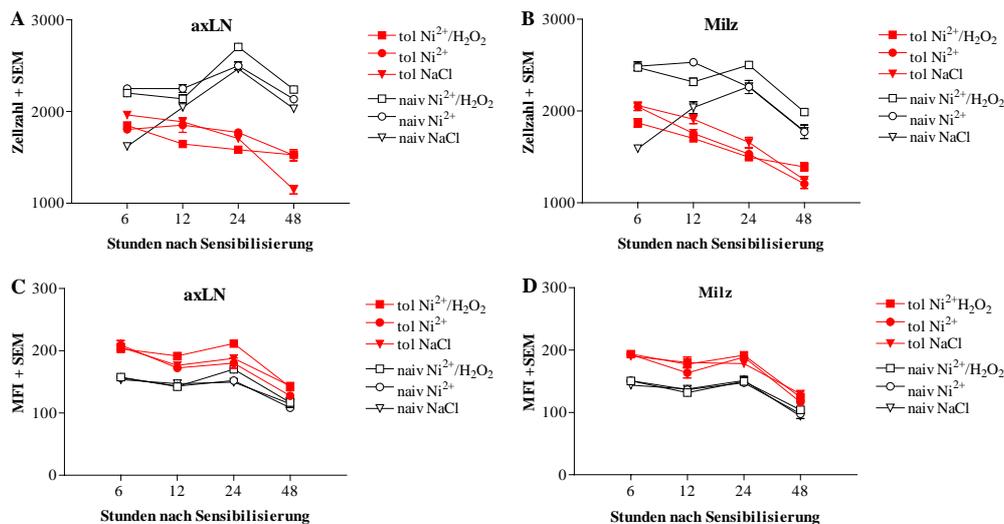


Abb. 2: Verbleib CFSE-markierter Lymphozyten oral tolerisierter oder naiver Spender nach Sensibilisierung des Empfängers. Untersucht wurden die Zellzahl und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Spenderzellen in den axillären Lymphknoten (axLN) und der Milz des Empfängers jeweils 6, 12, 24 oder 48 h nach Sensibilisierung mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, Ni^{2+} oder NaCl. A) Zellzahl in axLN B) Zellzahl in Milz C) MFI in axLN D) MFI in Milz

Die Milz dient in diesem Experiment als Beispiel für ein nicht-drainierendes lymphoides Gewebe. Befunde in der Literatur deuten darauf hin, daß die Toleranz zwar in den Lymphknoten induziert wird, die infektiöse Verbreitung jedoch in der Milz erfolgt. Dieses Experiment zeigt ein Maximum CFSE-markierter Zellen naiver Spender in den axLN 24h nach der Sensibilisierung, während die Zahl toleranter Spenderzellen (rote Symbole) zwischen 6 und 48h konstant zurückgeht. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Art der Sensibilisierung. Auffällig ist, daß die Zahl naiver CFSE-markierter Zellen ebenfalls unabhängig von der Art der Sensibilisierung größer ist als die der toleranten Lymphozyten, obwohl jeweils gleiche Zellzahlen transferiert wurden. Die einzige Ausnahme bilden die Empfänger naiver Lymphozyten, die mit NaCl sensibilisiert wurden (∇). Ihre Zahl ist 6h nach

Sensibilisierung geringer als die aller anderen Versuchsgruppen, steigt aber beständig an und erreicht ebenfalls nach 24h das Maximum. Im Vergleich mit den $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. Ni^{2+} -sensibilisierten Gruppen scheinen sie langsamer zu migrieren (**Abb. 2A**). Die Situation in der Milz ist vergleichbar mit der in den axLN, auch hier stellt sich ein Maximum nach 24h ein, und die Zahl der naiven Spenderzellen ist größer als die der toleranten (**Abb. 2B**). Auch hier ist die Zellzahl der mit NaCl sensibilisierten Gruppe (∇) nach 6h geringer als die der übrigen, steigt dann ebenfalls an und erreicht nach 24h den Höhepunkt. Die Zahl toleranter Spenderzellen ist 6h nach der Sensibilisierung am höchsten und geht dann beständig zurück (rote Symbole). Nach 24h geht die Zahl der naiven Spenderzellen sowohl in den axLN als auch der Milz stark zurück (**Abb. 2A+2B**).

Im Gegensatz zu den Zellzahlen ist die **mittlere Fluoreszenzintensität** (MFI) der toleranten Zellen (rote Symbole) in den axLN im Vergleich mit den CFSE-markierten naiven Zellen (schwarze Symbole) deutlich höher (**Abb. 2C**). Dies könnte am beschriebenen Zustand der Anergie der toleranten T-Zellen unter den toleranten Lymphozyten liegen, die nicht oder weniger proliferieren, weshalb die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz geringer ist. Dafür spricht ebenfalls die geringere Zahl der toleranten Zellen. Nach 24h nimmt die Fluoreszenzintensität sowohl der toleranten als auch der naiven Zellen ab, ebenso wie die Zellzahl, was an der Emigration der Zellen aus den lymphoiden Geweben in die Peripherie liegt. Die Situation in der Milz entspricht der in den axLN, auch hier ist die Fluoreszenzintensität der toleranten Zellen (rote Symbole) höher als die der naiven (**Abb. 2D**) und geht nach 24h zurück.

3.2 Vergleich der Zytokinexpression verschiedener Arten von B6-Mäusen

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die Art der resultierenden Immunreaktion von vielen Faktoren während der T-Zellaktivierung abhängig, zum Beispiel vom Reifezustand der APZ, somit also vom Umfang der Kostimulation, sowie von der Ausbildung eines ganz spezifischen Zytokinprofils. Die immunogene Präsentation von Antigenen, die zur Entstehung von Immunreaktionen führt, ist durch die Expression eines Th1-Zytokinprofils gekennzeichnet. Hierbei sind typischerweise Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF- α vertreten. Die Induktion von Toleranz ist im allgemeinen durch die Expression eines Th2-Zytokinprofils gekennzeichnet. Zytokine, die immer wieder im Zusammenhang mit der Regulation von Immunantworten erwähnt werden sind IL-4, IL-10 und TGF- β . Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Unterschiede in der Art der exprimierten Zytokinprofile in den axillären Lymphknoten und der Milz naiver oder oral tolerisierter Mäuse nach Sensibilisierung mit Nickel bestehen. Zu diesem Zweck wurden naive oder oral tolerisierte Tiere durch die s.c. Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, Ni^{2+} oder NaCl sensibilisiert und jeweils 6, 12, 24 oder 48h später axLN und Milz präpariert. Nach Isolation der RNA aus den jeweiligen Zellen wurde die Expression der Zytokine IFN- γ und IL-10, die exemplarisch als typische Vertreter einer Th1- bzw. Th2-Antwort ausgewählt wurden, auf Genexpressionsebene mit semiquantitativer RT-PCR untersucht (**Abb. 3 und 4**).

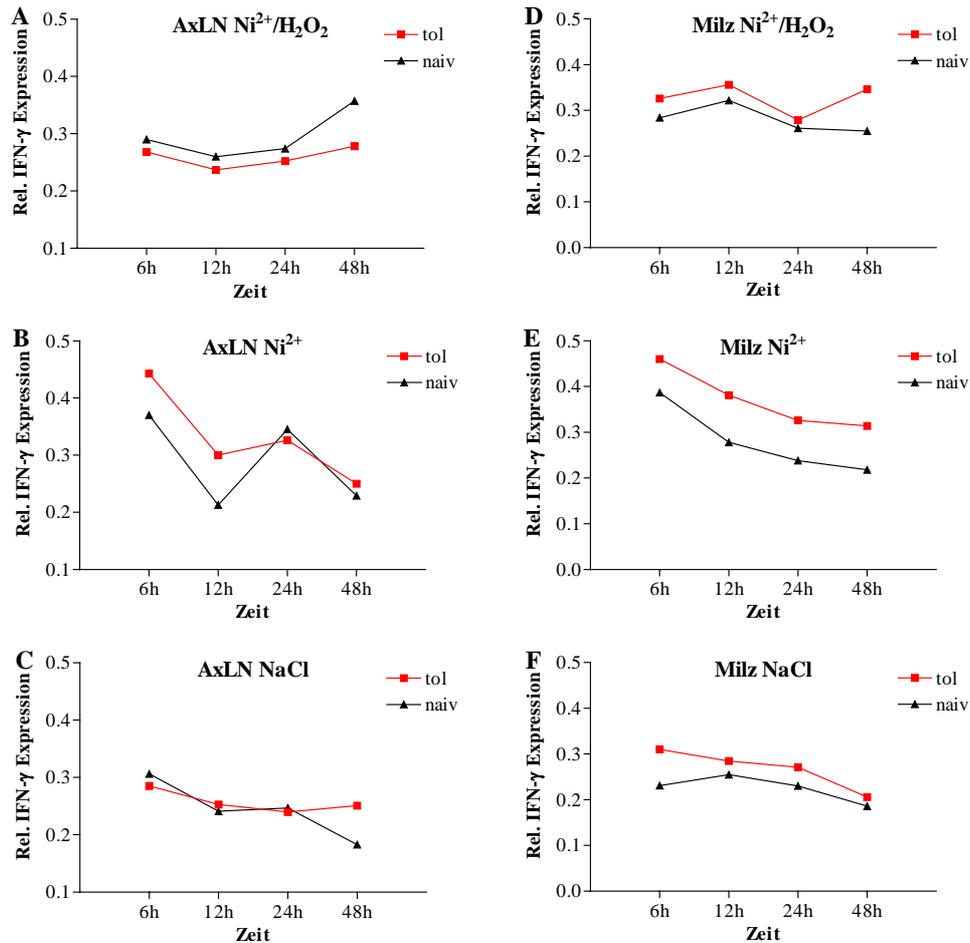


Abb. 3: Kinetik der mRNA-Expression von IFN- γ in axLN und Milz von naiven oder oral tolerierten Mäusen. Expression von IFN- γ mRNA in naiven (\blacktriangle) oder oral tolerierten Mäusen (\blacksquare) zu verschiedenen Zeitpunkten nach s.c. Injektion von Ni^{2+}/H_2O_2 , Ni^{2+} oder NaCl. Dargestellt sind die gemittelten Werte zweier unabhängiger PCR-Läufe, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β -Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technische bedingte Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. **A-C)** Relative Expression von IFN- γ mRNA in axLN. **D-F)** Relative Expression von IFN- γ mRNA in der Milz. Die Tiere wurden sensibilisiert mit Ni^{2+}/H_2O_2 (**A+D**), Ni^{2+} (**B+E**) oder NaCl (**C+F**).

In diesem Experiment zeigt sich eine leichte Tendenz zu verringerter Expression von IFN- γ mRNA in den Lymphknoten oral tolerierter Mäuse nach Sensibilisierung mit Ni^{2+}/H_2O_2 (**Abb. 3A**), während nach Sensibilisierung mit Ni^{2+} oder NaCl keine bemerkenswerten Unterschiede zu beobachten sind (**Abb. 3B+C**). Im Gegensatz dazu ist die Expression von IFN- γ mRNA in der Milz oral tolerierter Mäuse deutlich erhöht im Vergleich zur Milz naiver Tiere (**Abb. 3D-F**). Diese verstärkte Expression von IFN- γ mRNA ist jedoch anders als in den axillären Lymphknoten unabhängig von der Art der Sensibilisierung, und dies ist zu jedem der untersuchten Zeitpunkte zu beobachten.

Im Gegensatz zu IFN- γ zeigen sich hinsichtlich der Expression von IL-10 mRNA jedoch keine erwähnenswerten Unterschiede zwischen axillären Lymphknoten oder Milz naiver oder oral tolerierter Tiere (**Abb. 4**).

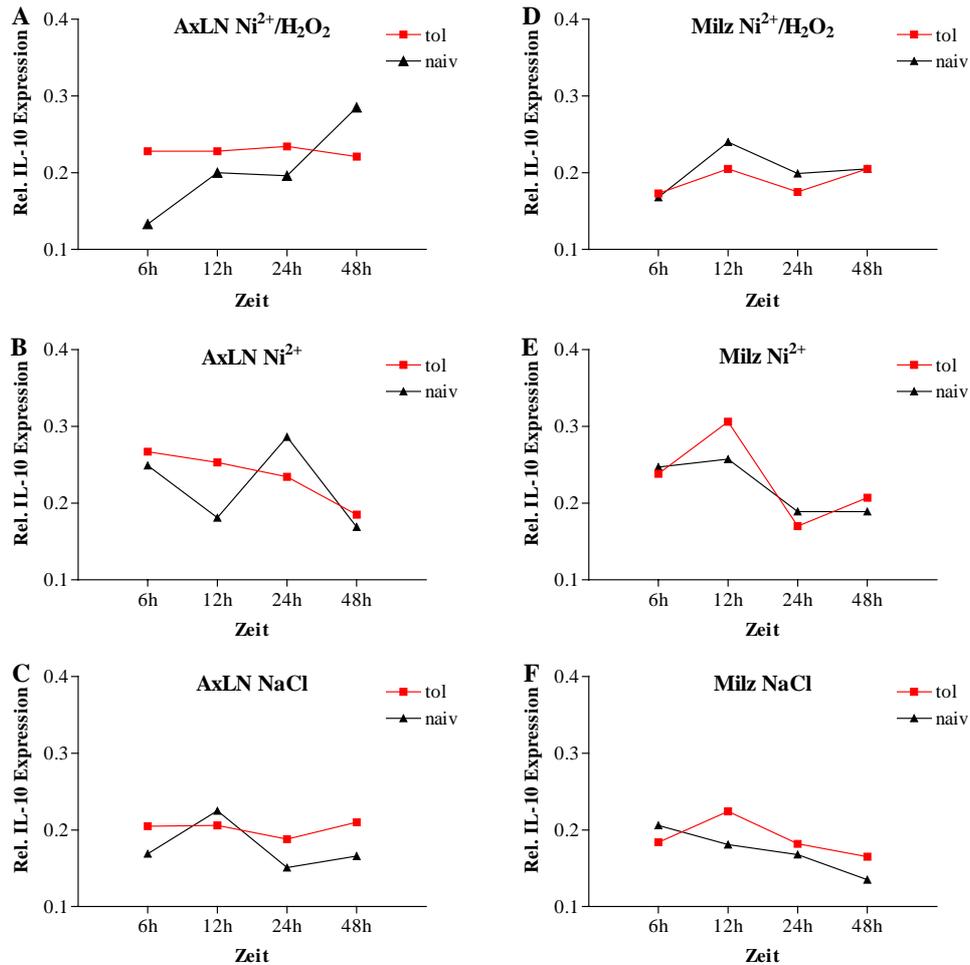


Abb. 4: Kinetik der mRNA-Expression von IL-10 in axLN und Milz von naiven oder oral tolerierten Mäusen. Expression von IL-10 mRNA in naiven (▲) oder oral tolerierten Mäusen (■) zu verschiedenen Zeitpunkten nach s.c. Injektion von Ni²⁺/H₂O₂, Ni²⁺ oder NaCl. Dargestellt sind die gemittelten Werte zweier unabhängiger PCR-Läufe, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β-Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technische bedingte Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. **A-C)** Relative Expression von IL-10 mRNA in axLN. **D-F)** Relative Expression von IL-10 mRNA in der Milz. Die Tiere wurden sensibilisiert mit Ni²⁺/H₂O₂ (**A+D**), Ni²⁺ (**B+E**) oder NaCl (**C+F**).

Nur nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ deutet sich in den axillären Lymphknoten der tolerierten Tiere die Tendenz zu einer leicht erhöhten Synthese von IL10-mRNA an (**Abb. 4A**). Diese Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig, da diese Beobachtung nur für die ersten 24 Stunden nach der Sensibilisierung zutrifft. Danach überschneiden sich auch hier die Graphen der naiven und der tolerierten Gruppe. Anhand dieser Daten ist es auch schwierig zu beurteilen, ob tatsächlich mehr IL-10 mRNA in den axLN der tolerierten Gruppe produziert wird, oder ob dies die normale Expressionsmenge widerspiegelt und die Transkription von IL-10 in den Lymphknoten der naiven Gruppe reduziert ist. Diese Überlegung gilt im übrigen auch für die beschriebenen Unterschiede in der Transkription von IFN-γ.

Die leicht verringerte Expression von IFN-γ in den Lymphknoten der tolerierten Gruppe nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ (**Abb. 3A**) bestätigt die Hypothese, daß während der Induktion der Toleranz die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und somit die Expression eines Th1-Profiles vermindert ist. Nicht bestätigt wird diese Vermutung jedoch durch die unklaren Verhältnisse bei der Expression von IL-10 mRNA. Völlig unerwartet ist jedoch die Beobachtung, daß die Expression von IFN-γ in der Milz der tolerierten Gruppe deutlich höher ist als in der naiven Vergleichsgruppe.

3.3 Vergleich der Zytokinexpression nach Transfer von Milzzellen verschiedener B6-Mäuse

Bei der Maus ist die Toleranz auf naive Empfänger durch den Transfer von Lymphozyten oral tolerisierter Spender übertragbar. In 3.1 wurde gezeigt, daß die übertragenen Spenderzellen in die Milz und die Lymphknoten gelangen. In 3.2 wurde gezeigt, daß in tolerisierten oder naiven Tieren Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster bestehen. Daher liegt die Hypothese nahe, daß die übertragenen Spenderzellen auch die Expression von Zytokinen in den axillären Lymphknoten und der Milz der Empfänger beeinflussen. Um diese Vermutung zu untersuchen wurden 10^4 Zellen naiver oder oral tolerisierter Spender in naive syngene Empfänger übertragen. Nach 24h wurden die Empfänger mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, Ni^{2+} oder NaCl sensibilisiert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Sensibilisierung die RNA aus den axillären Lymphknoten und der Milz der Empfänger isoliert und ebenfalls mittels RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotidprimern für die Zytokine IFN- γ und IL-10 untersucht. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele gescannt und quantifiziert (Abb. 5+6).

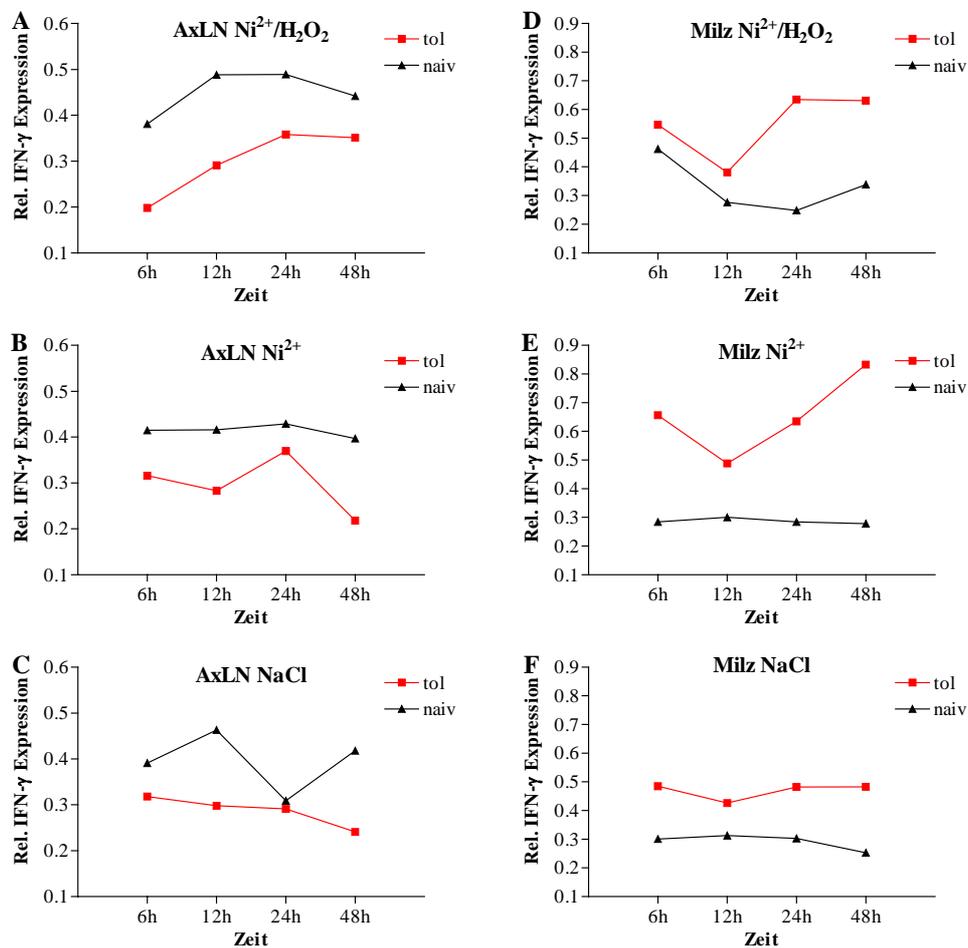


Abb. 5: Kinetik der IFN- γ mRNA-Expression in axLN und Milz in Empfängern von Zellen naiver oder oral tolerisierter Spender. Expression von IFN- γ mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Sensibilisierung von Mäusen, die einen Transfer von 10^4 Zellen naiver (\blacktriangle) oder oral tolerisierter Spender (\blacksquare) erhalten haben. Dargestellt sind die gemittelten Werte zweier unabhängiger PCR-Läufe, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β -Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technische Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. **A-C)** Relative Expression von IFN- γ mRNA in axLN. **D-F)** Relative Expression von IFN- γ mRNA in der Milz. Die Tiere wurden sensibilisiert mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (**A+D**), Ni^{2+} (**B+E**) oder NaCl (**C+F**).

Die Beobachtungen hinsichtlich der Zytokinexpression in den axLN und der Milz der Empfänger bestätigen die Ergebnisse, die in tolerierten und naiven Tieren ohne Zelltransfer beobachtet wurden. Die beschriebenen Effekte sind sogar wesentlich deutlicher ausgeprägt. So zeigt sich in den axillären Lymphknoten der Empfänger von Lymphozyten tolerierter Spender eine im Vergleich zu den Empfängern naiver Lymphozyten deutlich niedrigere Transkription von IFN- γ -mRNA, bzw. die bei den Empfängern naiver Zellen beobachtete Aufregulation der IFN- γ -Transkription bleibt aus (**Abb. 5A-C**). Die relative RNA-Expression nach Transfer toleranter Spenderzellen ist mit der in tolerierten Tieren vergleichbar. Die Transkription von IFN- γ in den Empfängern naiver Lymphozyten ist im Vergleich mit naiven Tieren jedoch deutlich erhöht (**vgl. Abb. 3A-C und Abb. 5A-C**). Im Unterschied zur Situation in naiven und tolerierten Tieren sind die beschriebenen Effekte nach Transfer von Spenderzellen unabhängig von der Art der Sensibilisierung, auch Ni²⁺ und NaCl reichen bereits aus, um die Transkription von IFN- γ zu induzieren.

Auch in der Milz werden die in **3.2** beschriebenen Beobachtungen bestätigt. Während die Größenordnungen der IFN- γ -Transkription nach Transfer naiver Spenderzellen etwa mit denen in naiven Tieren identisch sind, ist die Transkription nach Transfer der Lymphozyten von tolerierten Spendern noch deutlicher erhöht als in tolerierten Tieren selbst (**Abb. 5D-F**). Dies spricht ganz deutlich für die Aufregulation der IFN- γ -Transkription in der Milz nach Sensibilisierung der Empfänger, also während der Induktionsphase der Toleranz (**vgl. Abb. 3D-F und Abb. 5D-F**). Auch in diesem Experiment ist die beobachtete Transkription von IFN- γ in der Milz unabhängig von der Art der Sensibilisierung, auch Ni²⁺ und NaCl sind dazu in der Lage, die Induktion herbeizuführen. Die Beobachtungen nach adoptivem Transfer toleranter Lymphozyten bestätigen somit die Befunde in naiven und tolerierten Tieren.

Dies gilt auch für die Transkription von IL-10 in den axillären Lymphknoten und der Milz von sensibilisierten Empfängern naiver oder toleranter Spenderzellen (**Abb. 6**). Wie bereits in naiven und tolerierten Tieren beobachtet, hat auch der Transfer von Lymphozyten keinen Einfluß auf die Transkription von IL-10 in den untersuchten Organen, die relative Expression ist sowohl bei den Empfängern toleranter als auch den Empfängern naiver Zellen annähernd gleich.

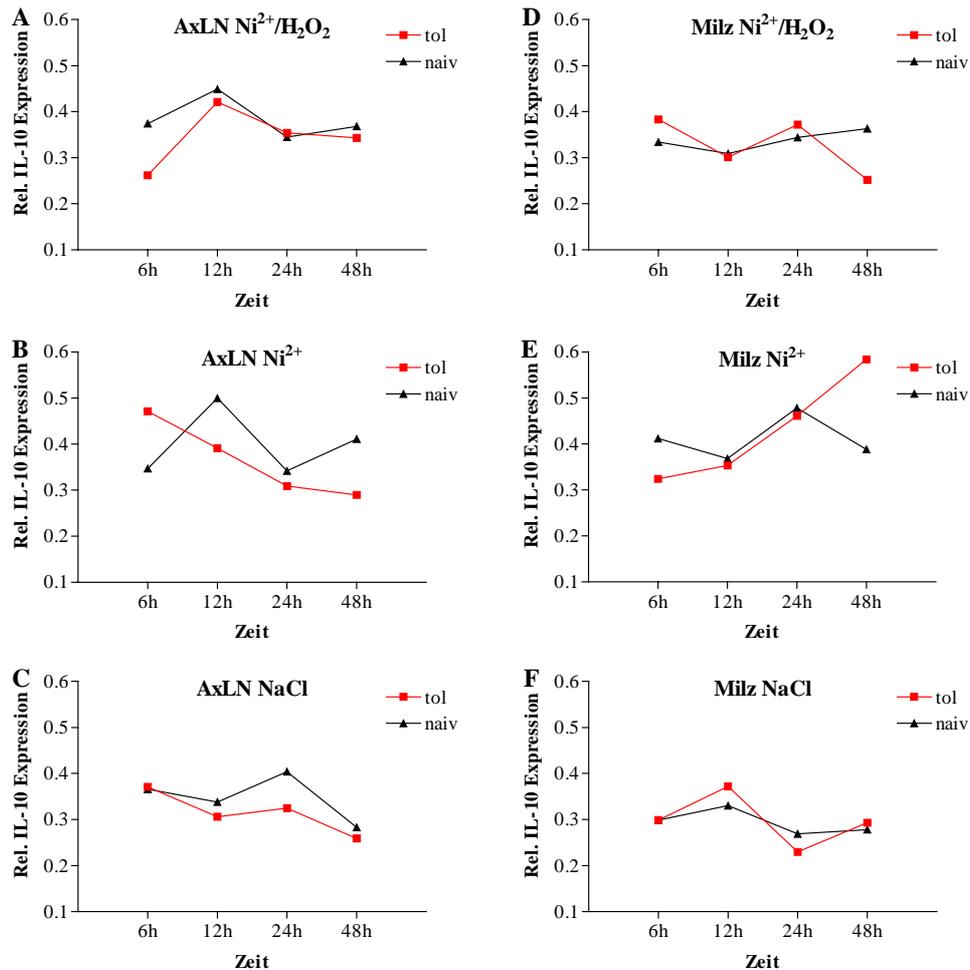


Abb. 6: Kinetik der IL-10 mRNA-Expression in axLN und Milz in Empfängern von Zellen naiver oder oral tolerierter Spender. Expression von IL-10 mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Sensibilisierung von Mäusen, die einen Transfer von 10^4 Zellen naiver (—▲) oder oral tolerierter Spender (—■) erhalten haben. Dargestellt sind die gemittelten Werte zweier unabhängiger PCR-Läufe, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β -Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technisch bedingte Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. A-C) Relative Expression von IL-10 mRNA in axLN. D-F) Relative Expression von IL-10 mRNA in der Milz. Die Tiere wurden sensibilisiert mit Ni²⁺/H₂O₂ (A+D), Ni²⁺ (B+E) oder NaCl (C+F).

Wie von Artik und Roelofs-Haarhuis gezeigt, führt die Sensibilisierung von Empfängern toleranter Spenderzellen zur Induktion der Nickeltoleranz. Ganz und gar unerwartet ist daher die beobachtete Expression des pro-inflammatorischen Th1-Zytokins IFN- γ in der Milz, während die Expression des immunregulatorischen Zytokins IL-10, welches in verschiedenen experimentellen Systemen der Immunsuppression eine entscheidende Rolle spielt (Skelsey, 2003; Groux, 1999), keine Änderung erfährt. Offensichtlich ist für die Induktion der Immuntoleranz gegen Nickel nicht die Expression von IL-10 ausschlaggebend, sondern das Ausbleiben der Aufregulation von IFN- γ in den axillären Lymphknoten, dem Ort der Antigenpräsentation. Offensichtlich ist für die Induktion der Immuntoleranz die Ausbildung einer ganz spezifischen Mikroumgebung erforderlich, die durch geringe Expression von IFN- γ charakterisiert ist. Um so erstaunlicher ist daher die hohe IFN- γ -Expression in der Milz. Die Bedingungen hier repräsentieren eher die Effektorphase der Nickeltoleranz, da die Lymphozyten nach ihrer Aktivierung in den axillären Lymphknoten in die Milz einwandern und dort für die infektiöse Verbreitung der Toleranz sorgen (Faunce, 2002). Die hohe Expression von IFN- γ deutet auf eine Beteiligung von IDO (Indolamin 2,3-dioxygenase) und des Tryptophankatabolismus an der Toleranz gegen Nickel hin. IDO wird durch IFN- γ induziert und katalysiert den ersten Schritt des Tryptophanabbaus, was in verminderter Proliferation der T-Effektorzellen durch Mangel an Tryptophan und Hemmung durch die entstehenden Metabolite resultiert (siehe 1.2.12). Diese Hypothese wurde in den folgenden Experimenten weiter untersucht.

3.4 Mögliche Auswirkung der Zytokinexpression auf dendritische Zellen

In der Maus erfolgt die Expression vonIDO hauptsächlich durch $CD11c^+CD8\alpha^+$ DZ. Da diese Zellpopulation nur einen Anteil von etwa 2% am gesamtem Lymphozytenkontingent besitzt, wurden für die Untersuchungen aus Knochenmark generierte DZ verwendet, um ausreichende Zellzahlen zur Verfügung zu haben. Diese Zellen wurden mit $IFN-\gamma$ stimuliert, und anschließend die Expression des Enzyms IDO mit unstimulierten, aus Knochenmark generierten DZ verglichen. Dies erfolgte zum einen auf Transkriptionsebene durch Untersuchung der gebildeten IDO-mRNA-Menge mittels semiquantitativer RT-PCR (Abb. 7), sowie auf Proteinebene durch Bestimmung der Zahlen IDO-exprimierender DZ mittels Durchflußzytometrie (Abb. 8). Ebenso wurde der Reifezustand der IDO-exprimierenden DZ aufgrund der Expression von spezifischen Markern charakterisiert. In diesen Experimenten wurde dazu die Expression des Lektins DEC205, der $CD8\alpha$ -Kette, und des MHC II-Moleküls untersucht.

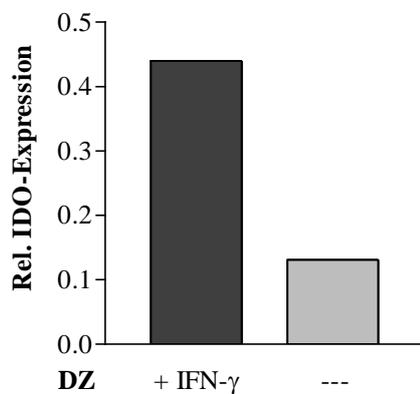


Abb. 7: Relative Expression von Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) mRNA in Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen. Verglichen werden unstimulierte (\square) DZ mit DZ nach Stimulation über Nacht mit 10ng/ml $rIFN-\gamma$ (\blacksquare). Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte von zwei unabhängigen PCR-Läufen, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β -Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technisch bedingte Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In Abb. 7 ist die erhöhte Transkription von IDO-mRNA der aus Knochenmarkzellen differenzierten DZ nach Stimulation mit $rIFN-\gamma$ dargestellt. Im Vergleich zu unstimulierten DZ gleicher Herkunft ist die Menge der IDO-mRNA nach Stimulation mit $IFN-\gamma$ **3,4-fach** aufreguliert.

Ein ähnliches Resultat zeigt sich für die Expression des **IDO-Proteins** nach Stimulation der DZ mit $IFN-\gamma$. Die Versuchsdurchführung war mit der in Abb. 7 beschriebenen identisch, allerdings wurde in diesem Experiment nicht die RNA aus den Zellen isoliert, sondern die Zellen im Anschluß an die Kultur mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die spezifisch an die genannten Proteine binden, gefärbt. Danach wurden durchflußzytometrisch die Anteile der Zellen bestimmt, die diese Moleküle exprimieren. Zur besseren Übersichtlichkeit der Darstellung wurde das Verhältnis der Proteinexpression von $IFN-\gamma$ -stimulierten zu unstimulierten DZ berechnet (Abb. 8).

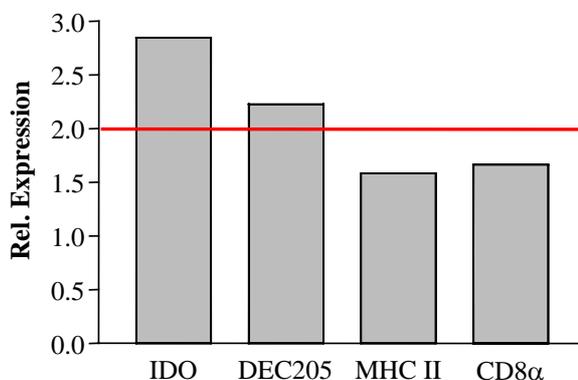


Abb. 8: Expression von IDO durch $IFN-\gamma$ stimulierte DZ. Dargestellt ist die relative Proteinexpression von MHC II⁺ DZ, die aus Knochenmarkzellen differenziert wurden. Errechnet wurde das Verhältnis von $IFN-\gamma$ -stimulierten zu unstimulierten DZ nach Abzug der entsprechenden Isotypkontrollen für IDO und DEC205. Die rote Linie markiert die Verdopplung der Proteinexpression.

Nach Stimulation mit $IFN-\gamma$ erhöht sich die (Zahl der IDO-exprimierenden Zellen) **IDO-Expression** unter den DZ etwa **2,8-fach**. Durch die Stimulierung ist auch die Expression des Antigenrezeptors

DEC205 2,2-fach erhöht. Die Expression von **MHC II** und **CD8 α** erhöht sich etwa **1,6- bis 1,7-fach**. Diese Beobachtung deutet auf einen unreifen Phänotyp der DZ hin, der gekennzeichnet ist durch die Expression von Antigenrezeptoren wie DEC205 und somit der Fähigkeit zur effizienten Aufnahme und Präsentation von Antigen.

Auch DZ aus der Milz Nickel-toleranter Mäuse zeigen eine erhöhte Expression von DEC205 (Roelofs-Haarhuis, 2003). Die von DEC205 vermittelte Bindung von Antigen führt zu einer bis zu 100-fach erhöhten Präsentation von Peptid-MHC-Komplexen ohne die weitere Aktivierung der DZ (Mahnke, 2003). Für die Fähigkeit zur effektiven Präsentation von Antigen durch diese DZ spricht auch die Aufregulation von MHC II. DEC205 wird *in vivo* hauptsächlich produziert von CD8 α^+ DZ in der Milz (Kronin, 1997), einer Subpopulation, die immer wieder mit der Toleranzinduktion in Verbindung gebracht wird (Mahnke, 2003; Kronin, 2000). Die DZ, die die Toleranzinduktion gegen Nickel *in vivo* vermitteln, weisen also bedeutende Parallelen mit den hier untersuchten aus Knochenmarkszellen differenzierten DZ auf. Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen, wie die erhöhte IFN- γ -Produktion in der Milz toleranter Tiere und der Empfänger toleranter Spenderzellen, sowie die Aufregulation vonIDO-mRNA und -Protein durch IFN- γ -stimulierte DZ, deuten auf eine mögliche Beteiligung von IDO und des Tryptophankatabolismus an der tolerogenen Wirkung dieser Zellen hin.

Ein weiteres Toleranzmodell basiert auf der Induktion der Toleranz durch die Bestrahlung mit UVB-Licht. Auch dieser Mechanismus ist wie die orale Toleranzinduktion durch die Bildung regulatorischer T-Zellen und die Beteiligung des inhibitorischen kostimulatorischen Moleküls CTLA-4 gekennzeichnet (Schwarz, 2004; Schwarz, 2000). Eine Folge der Interaktion von CTLA-4 auf Treg-Zellen mit DZ ist die Induktion der IFN- γ -Produktion durch die DZ, was die Expression von IDO nach sich zieht. Im Gegenzug jedoch fördert die Aktivität von IDO selbst die Toleranz durch die selektive Apoptose von T-Effektorzellen (Finger, 2002), während Treg-Zellen gegen Apoptose resistent sind (Banz, 2002). Möglicherweise ist die Induktion von IDO der Auslöser für die Bildung regulatorischer Treg-Zellen in diesem Toleranzmodell. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die UVB-Bestrahlung von DZ bereits die Expression von IDO in diesen Zellen auslösen kann. Auch für dieses Experiment wurden aus Knochenmarkszellen differenzierte DZ verwendet (**Abb. 9**).

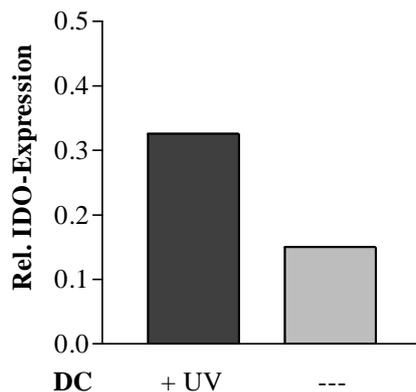


Abb. 9: UVB-induzierte Expression von IDO in Knochenmark-abgeleiteten DZ. Relative Expression von IDO-mRNA nach Bestrahlung mit 100 J/m² UVB. Verglichen werden bestrahlte (■) mit unbestrahlten DZ (□). Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte von zwei unabhängigen PCR-Läufen, die anhand der Expression des "Housekeeping"-Gens β -Actin gegeneinander korrigiert wurden, um technisch bedingte Abweichungen zwischen den Läufen auszuschließen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Wie in **Abb. 9** dargestellt, löst bereits die UVB-Bestrahlung der DZ allein die Expression von IDO-mRNA aus. Im Vergleich mit unbestrahlten DZ nimmt die Menge der IDO-mRNA **2,2-fach** zu. Dies und die Tatsache, daß die Expression von IDO bereits durch Stimulation des angeborenen Immunsystems durch bakterielle Stimuli wie LPS induziert werden kann, deuten eine mögliche Rolle für IDO bereits in der Induktionsphase der Toleranz an, möglicherweise durch Verhinderung der klonalen Expansion von Th1-Effektorzellen. Der wichtigste Beitrag der Regulation des Tryptophankatabolismus durch IDO erfolgt jedoch höchstwahrscheinlich in der Effektorphase der Immuntoleranz, da IDO sehr effektiv exprimiert wird, sobald aktivierte Treg-Zellen vorhanden sind (Grohmann, 2002).

3.5 Rolle der Apoptose in der Nickeltoleranz

In der Literatur existieren viele Hinweise, daß Apoptose und die Präsentation von Antigen apoptotischer Zellen eine Rolle bei der Induktion der Toleranz spielen. Nehmen APZ Antigen apoptotischer Zellen auf, so bewirkt die Präsentation dieser Antigene die Induktion von regulatorischen T-Zellen. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung der Apoptose für die Induktion der Nickel-Toleranz untersucht. Für diese Experimente wurden Mausstämme verwendet, die Gendefekte im Signalweg der Fas-FasL-vermittelten Apoptose besitzen. Tiere des Stammes $lpr^{-/-}$ exprimieren kein funktionelles Fas (CD95) auf der Oberfläche ihrer Zellen. Das bedeutet, daß in den Zellen dieser Tiere durch Interaktion mit CD95L (FasL) keine Induktion der Apoptose ausgelöst wird. Die Expression von CD95L hingegen ist nicht betroffen, Zellen dieser Tiere sind dazu in der Lage, bei adoptivem Transfer die Apoptose von $CD95^{+}$ Zellen anderer Tiere auszulösen.

Umgekehrt verhält es sich mit Lymphozyten von Tieren des $gld^{-/-}$ Stammes. Diese Zellen besitzen keinen funktionellen Fas-Liganden (FasL oder CD95L) auf ihrer Oberfläche, können also keine Apoptose in $CD95^{+}$ Zellen auslösen, können jedoch selbst durch Interaktion mit $CD95L^{+}$ Zellen anderer Tiere durch Apoptose sterben. Beiden Stämmen gemeinsam ist eine Beeinträchtigung des Lymphozyten-Turnovers, was in einer stark erhöhten Lymphozytenzahl in den sekundären lymphoiden Organen resultiert. Bisher ungeklärt ist, ob Apoptose und die Existenz von apoptotischem Zellmaterial für die Induktion der Nickel-Toleranz erforderlich sind. Falls die Apoptose Teil dieses Mechanismus ist, bleibt die Induktion der Toleranz durch die orale Applikation von Nickel in diesen Apoptose-defekten Stämmen aus, da in diesen Tieren kein apoptotisches Material gebildet wird.

Zunächst wurde jedoch untersucht, ob die Sensibilisierung dieser Tiere gegen Nickel möglich ist, da nicht auszuschließen ist, daß die Beeinträchtigung der Apoptose auch Einfluß auf die Sensibilisierung haben könnte. Die in Kapitel 3.5 dargestellten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Michael Nowak durchgeführt.

3.5.1 Sensibilisierung und Toleranzinduktion bei Fas-defizienten Mäusen

Tiere des $lpr^{-/-}$ -Stammes wurden wie bereits beschrieben durch die Injektion von Ni^{2+}/H_2O_2 sensibilisiert. Nach 10 Tagen wurde bei diesen Tieren durch die Injektion von Ni^{2+} in die Ohren versucht, eine Zweitantwort auszulösen. Der Erfolg der Sensibilisierung wurde mittels des MEST getestet. (**Abb. 10**). Zur Toleranzinduktion erhielten die Tiere zunächst 4 Wochen lang 10 mM $NiCl_2$ oral im Trinkwasser. Dann erfolgte die Sensibilisierung durch die Injektion von 10 mM $Ni^{2+}/1\% H_2O_2$ bzw. 10 mM Ni^{2+} in die Flanke. Nach 10 Tagen wurden die Tiere durch Injektion von Ni^{2+} alleine in die Ohren restimuliert, bevor nach weiteren 2 Tagen die Induktion der Nickel-Toleranz durch Ermittlung der Ohrschwellung untersucht wurde. Das Ergebnis der Toleranzinduktion im $lpr^{-/-}$ Stamm ist in **Abb. 10** dargestellt.

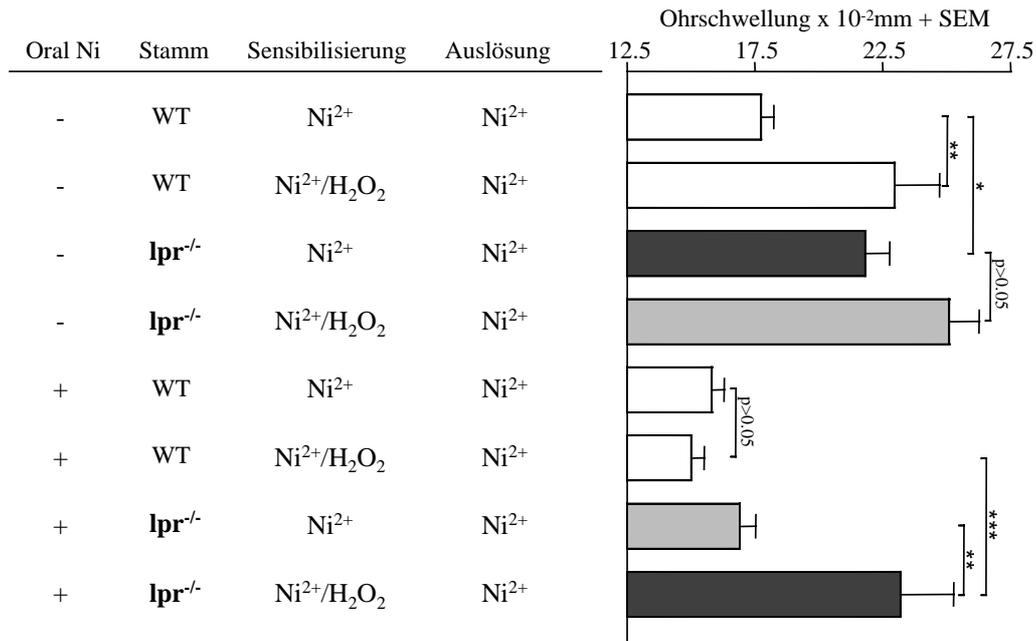


Abb. 10: Sensibilisierung gegen Nickel in oral behandelten und unbehandelten Fas-defizienten *lpr*^{-/-} Mäusen. Die Gruppen 5 - 8 erhalten für 4 Wochen 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser, die Gruppen 1 - 4 hingegen normales Trinkwasser. Die Sensibilisierung und Auslösung der Zweitantwort erfolgen wie in Material und Methoden beschrieben. Die Gruppen 3 + 4 zeigen die Sensibilisierung von naiven *lpr*^{-/-} Tieren im Vergleich zu der von naiven C57BL6 WT-Tieren (Gruppen 1 + 2). Fas-defiziente Mäuse lassen sich bereits mit Ni²⁺ (Gruppe 3) sowie mit Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisieren (Gruppe 4), im Gegensatz zu WT Mäusen. Diese benötigen H₂O₂ zusammen mit Ni²⁺ für eine erfolgreiche Sensibilisierung. Nach 4-wöchiger oraler Gabe von 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser ist die Sensibilisierung der WT-Mäuse auch mit Ni²⁺/H₂O₂ nicht mehr möglich (Gruppe 6), sie werden tolerant gegen Nickel. Die *lpr*^{-/-} Tiere können nach 4-wöchiger oraler Behandlung mit 10 mM NiCl₂ nicht mehr durch Ni²⁺ allein sensibilisiert werden (Gruppe 7), allerdings entwickeln sie immer noch eine Hypersensitivitätsreaktion gegen Nickel, wenn die Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ erfolgt ist (Gruppe 8).

Erhalten WT-Tiere eine Injektion von Ni²⁺ anstelle von Ni²⁺/H₂O₂ zur Auslösung der Reaktion gegen Nickel, so bleibt die Sensibilisierung aus (Gr. 1 + 2). Erhalten hingegen Tiere des *lpr*^{-/-} Stammes eine Injektion von Ni²⁺, so reicht dies bemerkenswerterweise bereits zur Sensibilisierung aus, bei Auslösung der Zweitantwort durch Injektion von Ni²⁺ in die Ohren entwickeln sie eine Hypersensibilitätsreaktion in Form der Ohrschwellung (Gr. 3), analog zu Fas-defizienten und WT-Mäusen, die mit Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisiert wurden (Gr. 4 + 2). Im zweiten Teil dieses Experimentes wurde untersucht, ob die orale Applikation von Ni²⁺ zur Induktion der Nickel-Toleranz bei den Fas-defizienten Tieren führt. Erhalten C57BL6 WT-Tiere Ni²⁺ im Trinkwasser, können sie auch mit Ni²⁺/H₂O₂ nicht mehr sensibilisiert werden, wie durch das Ausbleiben der Ohrschwellung demonstriert wird (Gr. 6). Werden Fas-defiziente Tiere vor der Sensibilisierung oral mit Nickel behandelt, so wird die Sensibilisierung dieser Tiere durch Injektion von Ni²⁺ alleine verhindert (Gr. 7), nicht jedoch die Sensibilisierung durch Ni²⁺/H₂O₂ (Gr. 8). Offensichtlich löst die orale Applikation von Nickel beim Fehlen von funktionellem Fas nur die Induktion einer "unvollständigen" Toleranz aus.

3.5.2 Sensibilisierung und Toleranzinduktion bei FasL-defizienten Mäusen

Analog zur Sensibilisierung der Fas-defizienten Tiere wurden auch Tiere des FasL-defizienten Stammes wie in 3.5.1 sensibilisiert und mit Ni²⁺ restimuliert. Der Ausgang der Sensibilisierung wurde durch Ermittlung der Ohrschwellung mittels MEST ermittelt (**Abb. 11**). Im gleichen Versuch wurde die Toleranzinduktion durch 4-wöchige orale Applikation von 10 mM NiCl₂ im *gld*^{-/-} Stamm untersucht.

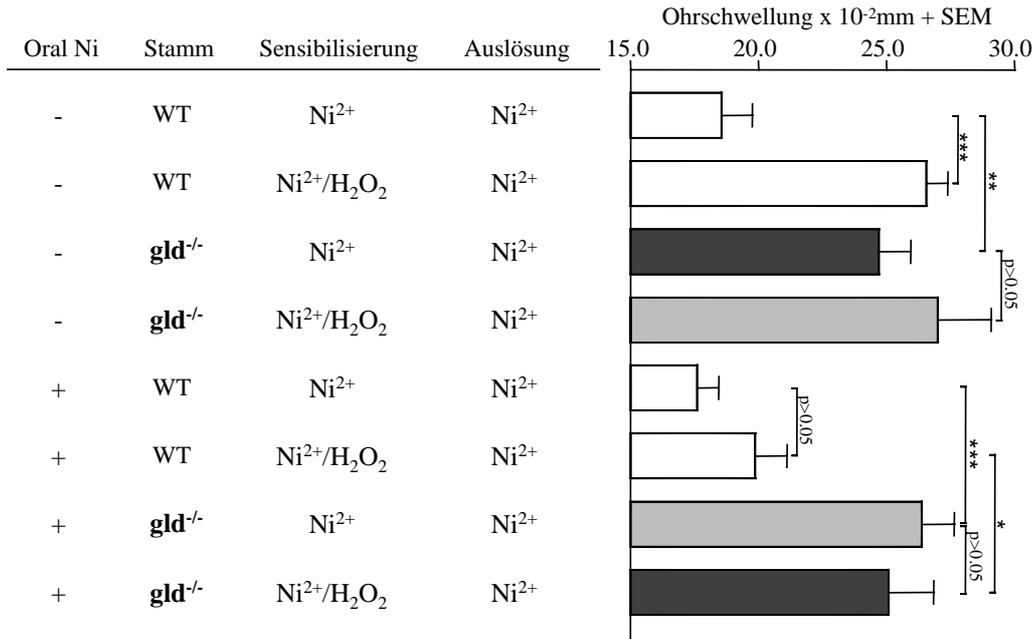


Abb. 11: Sensibilisierung gegen Nickel in oral behandelten und unbehandelten FasL-defizienten *gld*^{-/-} Mäusen. Die Gruppen 5 - 8 erhalten für 4 Wochen 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser, die Gruppen 1 - 4 hingegen normales Trinkwasser. Die Sensibilisierung und Auslösung der Zweitantwort erfolgen wie in Material und Methoden beschrieben. Die Gruppen 3 + 4 zeigen die Sensibilisierung von naiven *gld*^{-/-} Tieren im Vergleich zu der von naiven C57BL6 WT-Tieren (Gruppen 1 + 2). FasL-defiziente Mäuse lassen sich bereits mit Ni²⁺ (Gruppe 3) sowie mit Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisieren (Gruppe 4), im Gegensatz zu WT Mäusen, die Ni²⁺/H₂O₂ erfordern (Gruppe 2). Nach 4-wöchiger oraler Gabe von 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser ist die Sensibilisierung der WT-Mäuse auch mit Ni²⁺/H₂O₂ nicht mehr möglich (Gruppe 6), sie werden tolerant gegen Nickel. Die *gld*^{-/-} Tiere können nach 4-wöchiger oraler Behandlung mit 10 mM NiCl₂ immer noch sowohl durch Ni²⁺ allein (Gruppe 7), als auch durch Ni²⁺/H₂O₂ (Gruppe 8) sensibilisiert werden.

Wie bereits in **Abb. 10** gezeigt, lassen sich C57BL6 WT-Mäuse nicht durch Injektion mit Ni²⁺ sensibilisieren (Gr. 1), für eine erfolgreiche Sensibilisierung ist die Verwendung von H₂O₂ als Adjuvans erforderlich (Gr. 2). Nur nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ entwickeln die Tiere eine Hypersensibilitätsreaktion in Form der Ohrschwellung. Werden jedoch Tiere des FasL-defizienten *gld*^{-/-} Stammes mit Ni²⁺ injiziert, so reicht dies bereits zur Sensibilisierung aus (Gr. 3), sie entwickeln eine Zweitreaktion gegen Nickel, die sich in Form der Ohrschwellung manifestiert, ebenso wie bei den Tieren, die mit Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisiert werden (Gr. 4). Hier zeigt sich eine Übereinstimmung mit der Situation in Fas-defizienten Tieren (vgl. Abb. 10, Gr. 3), auch hier ist die Injektion von Ni²⁺ bereits ausreichend für die Sensibilisierung gegen Nickel. Die orale Behandlung von WT-Mäusen mit Ni²⁺ im Trinkwasser führt zur Induktion der Nickel-Toleranz, die Hypersensibilitätsreaktion, die bei unbehandelten Mäusen nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ entsteht, wird in den oral tolerierten Tieren unterdrückt (Gr. 6). Anders verhält es sich bei den Tieren des *gld*^{-/-} Stammes. Bei ihnen führt die orale Applikation mit Nickel nicht zur Induktion von Toleranz, sie entwickeln sowohl nach Sensibilisierung mit Ni²⁺ (Gr. 7) als auch nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ (Gr. 8) eine Zweitantwort bei erneuter Injektion mit Nickel. Im Gegensatz zu den Tieren des *lpr*^{-/-} Stammes, bei denen die Auslösung der Hypersensibilität durch Ni²⁺ aufgrund der oralen Gabe von Nickel unterbunden werden kann, ist dies bei den Tieren des *gld*^{-/-} Stammes nicht der Fall.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch Fas-FasL-induzierte Apoptose eine wichtige Rolle bei der Induktion der Nickel-Toleranz spielt. Offensichtlich bestehen jedoch Unterschiede in der Bedeutung der verschiedenen Moleküle für die Toleranzinduktion. Während beim Fehlen von Fas die durch Ni²⁺ ausgelöste Sensibilisierung unterdrückt werden kann, ist dies bei Abwesenheit von funktionellem FasL nicht der Fall. Offensichtlich ist FasL für die Induktion der Toleranz von größerer Bedeutung als Fas.

3.5.3 Übertragung der Toleranz durch Transfer von WT-Zellen in Fas und FasL defiziente Mäuse

Die Ergebnisse in **3.5.1** und **3.5.2** belegen, daß Fas- und FasL-defiziente Mäuse durch Injektion mit Ni^{2+} und $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ gegen Nickel sensibilisiert werden können, wie die entstehende Hypersensibilitätsreaktion bei erneutem Kontakt mit Nickel-Ionen beweist. Die orale Behandlung mit Ni^{2+} führt jedoch nicht wie in WT-Tieren zur Induktion einer vollständigen Toleranz gegen Nickel. Die Sensibilisierung von $\text{lpr}^{-/-}$ Tieren durch Ni^{2+} wird verhindert, nicht jedoch die Sensibilisierung durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. In $\text{gld}^{-/-}$ Tieren ist die Beeinträchtigung der Toleranzinduktion noch gravierender, trotz oraler Applikation von Nickel können diese Tiere immer noch sogar durch Ni^{2+} sensibilisiert werden. Um die Rolle der Apoptose in der Toleranzinduktion genauer analysieren zu können, wurde in den folgenden Experimenten versucht, die Toleranz durch den Transfer von Milzzellen toleranter WT-Spender auf Fas- bzw. FasL-defiziente Empfänger zu übertragen. Durch gezielten Transfer von T- oder B-Zellen toleranter WT-Spender wurde die Bedeutung der Apoptose für die transferierten Zelltypen untersucht, um Aussagen darüber zu machen, welche dieser Zellen im Verlauf der Toleranzinduktion im Empfänger die Apoptose induzieren, also FasL exprimieren müssen, und welche den Zelltod durch die Ligation von Fas erleiden. Dabei wurde durch den Transfer das Zellrepertoire der Fas- oder FasL-defizienten Empfänger mit Zellen supplementiert, die in der Lage sind, diese Moleküle in funktioneller Form zu exprimieren. Führt diese Supplementation zur Induktion der Toleranz in Gen-defizienten Tieren, bedeutet dies, daß die Expression des untersuchten Moleküls, Fas oder FasL, auf dem übertragenen Zelltyp im Empfänger erforderlich ist. Aufgrund dieses Zelltransfers kann auf die Funktion der unterschiedlichen Zelltypen während der Toleranzinduktion in der oral behandelten WT-Maus geschlossen werden. Zunächst wurde jedoch durch den Transfer des gesamten Lymphozytenkontingents der Milz getestet, ob es überhaupt möglich ist, die Toleranz auf diese Tiere zu übertragen.

3.5.3.1 Transfer der Toleranz durch Lymphozyten in Fas-defiziente Empfänger

In diesem Experiment wurden Milzzellen toleranter C57BL6-Spender in Fas-defiziente Empfänger des $\text{lpr}^{-/-}$ Stammes transferiert. Einen Tag nach dem Transfer wurden die Empfänger entweder mit Ni^{2+} oder $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sensibilisiert, 10 Tage später wurde die Zweitantwort durch Injektion von Ni^{2+} in die Ohren ausgelöst, weitere zwei Tage später erfolgte die Messung der Ohrdicke. Die Ergebnisse sind in **Abb. 12** dargestellt.

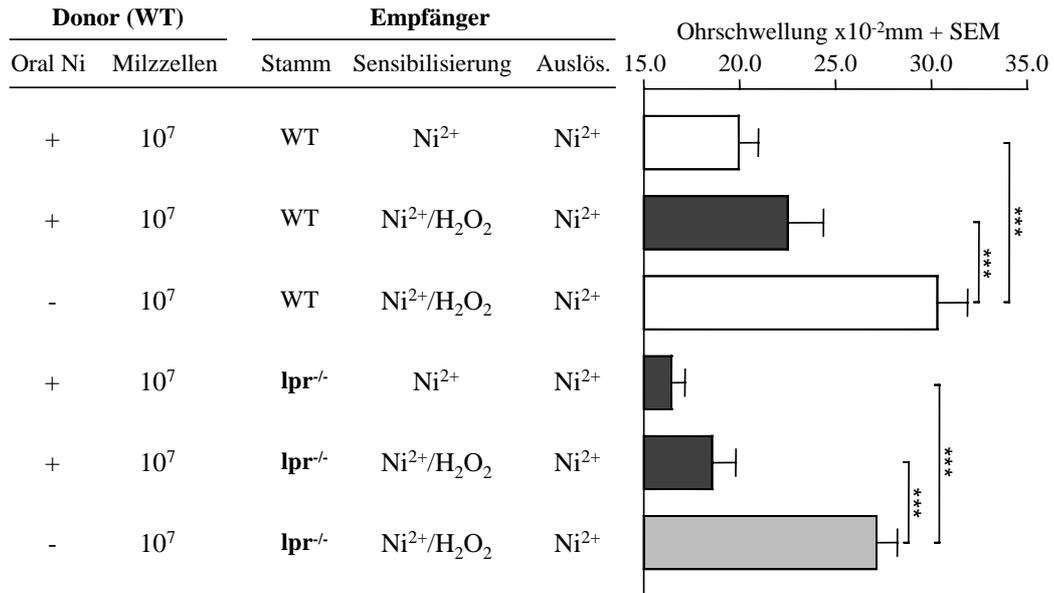


Abb. 12: Milzzellen toleranter Spender übertragen die Toleranz auf Fas-defiziente Empfänger. Die toleranten Spender erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen 10 mM NiCl_2 oral über das Trinkwasser, die naiven Spender normales Trinkwasser. Anschließend wurden jeweils 10^7 Milzzellen pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl_2 oder 10 mM NiCl_2 in 1% H_2O_2 ($\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl_2 in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 - 3 zeigen die Situation in C57BL6 WT Empfängern, die Gruppen 4 - 6 in $\text{lpr}^{-/-}$ Empfängern. Die Gruppen 1, 2, 4 und 5 erhielten Milzzellen toleranter Spender, die Gruppen 3 + 6 erhielten Zellen naiver Spender. Der Transfer toleranter Milzzellen führt zur Induktion von Toleranz sowohl in WT Empfängern (Gr. 2), als auch in Fas-defizienten Empfängern (Gr. 4 + 5), was nicht nur die Auslösung der Hypersensibilität durch Ni^{2+} , sondern auch durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ in diesem Stamm verhindert.

Dieses Experiment zeigt, daß C57BL6 Mäuse, die einen Transfer von Milzzellen toleranter Spender erhalten haben, Toleranz gegen Nickel entwickeln. Weder die Sensibilisierung mit Ni^{2+} (Gr. 1) noch mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gr. 2) löst nach erneutem Kontakt mit Nickel eine Zweitantwort aus. Werden jedoch die Empfänger von Milzzellen unbehandelter Spender mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sensibilisiert, zeigt sich nach der erneuten Injektion mit Ni^{2+} eine Zweitantwort in Form erhöhter Ohrschwellung (Gr. 3). Auch in Fas-defiziente Empfänger lässt sich die Toleranz gegen Nickel durch den Transfer von Milzzellen toleranter Spender übertragen. Die Fas-defizienten Empfänger toleranter Zellen lassen sich weder durch Ni^{2+} (Gr. 4) noch durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gr. 5) sensibilisieren. Erhalten die Tiere dieses Stammes jedoch Zellen unbehandelter naiver Spender, so entwickeln sie nach Sensibilisierung mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ und dem Auslösen der Zweitantwort eine erhöhte Ohrschwellung (Gr. 6). Dieses Ergebnis beweist, daß die Toleranz auch auf Fas-defiziente Tiere durch Zelltransfer übertragbar ist, obwohl diese Tiere selbst durch orale Behandlung mit Ni^{2+} keine vollständige Toleranz gegenüber Nickel entwickeln. Im nächsten Experiment wurde ein identischer Transfer in Empfänger des FasL-defizienten $\text{gld}^{-/-}$ Stammes durchgeführt.

3.5.3.2 Transfer der Toleranz durch Lymphozyten in FasL-defiziente Empfänger

Der Transfer von Zellen toleranter C57BL6 WT-Spender auf FasL-defiziente Empfänger erfolgte analog zu dem in 3.5.3.1 beschriebenen Experiment. Nach der Übertragung der Zellen wurden die Empfänger wie beschrieben sensibilisiert, und nach Auslösung der Zweitantwort durch Injektion von Ni^{2+} in die Ohren wurde die Induktion der Hypersensibilität bzw. der Toleranz gegen Nickel mit dem Maus-Ohrschwellungstest ermittelt (Abb. 13).

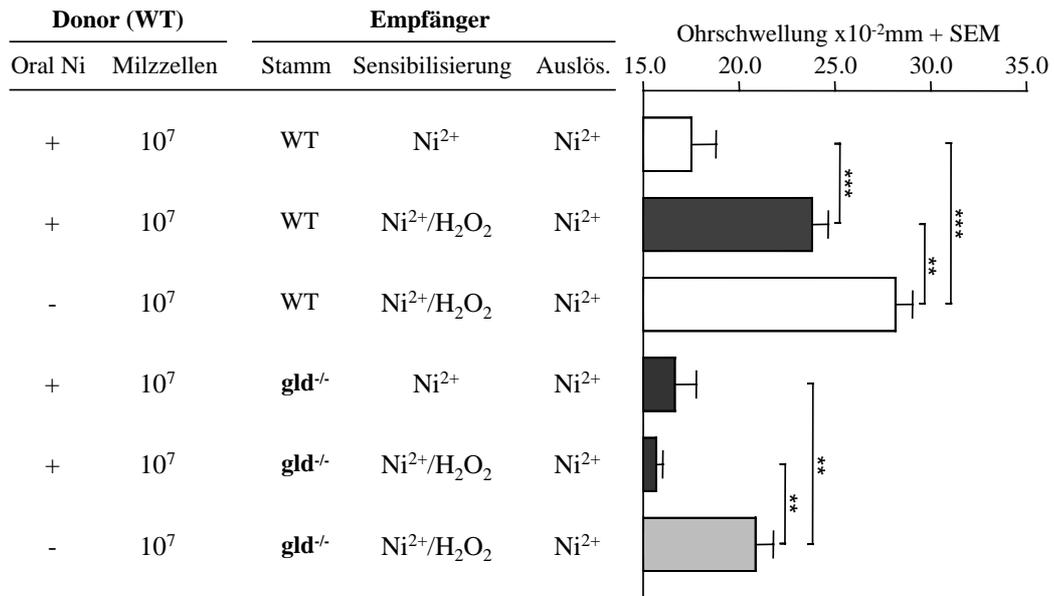


Abb. 13: Milzzellen toleranter Spender übertragen die Toleranz auf FasL-defiziente Empfänger. Die toleranten Spender erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen 10 mM NiCl_2 oral über das Trinkwasser, die naiven Spender normales Trinkwasser. Anschließend wurden jeweils 10^7 Milzzellen pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl_2 oder 10 mM NiCl_2 in 1% H_2O_2 ($\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl_2 in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 - 3 zeigen die Situation in C57BL6 WT Empfängern, die Gruppen 4 - 6 in *gld*^{-/-} Empfängern. Die Gruppen 1, 2, 4 und 5 erhielten Milzzellen toleranter Spender, die Gruppen 3 + 6 erhielten Zellen naiver Spender. Der Transfer toleranter Milzzellen führt zur Induktion von Toleranz sowohl in WT Empfängern (Gr. 2), als auch in FasL-defizienten Empfängern (Gr. 4 + 5), was nicht nur die Auslösung der Hypersensibilität durch Ni^{2+} (Gr. 4), sondern auch durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gr. 5) in diesem Stamm verhindert, analog zu Fas-defizienten Empfängern (Vgl. Abb. 12)

Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, verhindert der Transfer von Milzzellen toleranter Spender die Sensibilisierung von C57BL6 WT-Empfängern gegen Nickel durch die Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gr. 2), die Tiere dieser Versuchsgruppe zeigen eine signifikant reduzierte Ohrschwellung gegenüber den Empfängern von Zellen naiver unbehandelter Spender, die auf die gleiche Art sensibilisiert werden (Gr. 3). Ähnlich ist die Situation in Empfängermäusen des FasL-defizienten *gld*^{-/-} Stammes. Erhalten diese Tiere einen Transfer von Milzzellen toleranter WT-Spender, so wird sowohl die Sensibilisierung durch Ni^{2+} (Gr. 4), die bei Tieren dieses Stammes selbst nach oraler Behandlung mit Ni^{2+} beobachtet wird (vgl. Abb. 11, Gr. 3 + 7), als auch die Sensibilisierung durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gr. 5) unterbunden (vgl. Abb. 11, Gr. 4 + 8). Stammen die transferierten Zellen jedoch von unbehandelten naiven Spendern, entwickeln die Tiere eine deutliche Ohrschwellung nach Sensibilisierung mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ und anschließender Auslösung der Zweitantwort. Dieses Ergebnis zeigt, daß durch den Transfer von Milzzellen toleranter Spender die Sensibilisierung von FasL-defizienten Mäusen durch Ni^{2+} und $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ verhindert werden kann, und Toleranz gegen Nickel induziert wird, obwohl diese Tiere selber durch orale Behandlung mit Nickel nicht toleriert werden können (vgl. Abb. 11). Offenbar werden durch den Transfer die Zellen übertragen, deren FasL-Expression für die Induktion der Toleranz gegen Nickel erforderlich ist, so daß dieser Prozeß stattfinden kann.

Ungewöhnlich in diesem Experiment ist der Unterschied der Ohrschwellung zwischen den Tieren der Gruppe 1 und 2, die beide einen Transfer toleranter Spenderzellen erhalten haben, ebenso der Unterschied zwischen den Empfängern naiver Zellen beider Stämme (Gr. 3 + 6). Im Gesamtvergleich weisen alle Empfänger des *gld*^{-/-} Stammes eine recht geringe Ohrschwellung in diesem Experiment auf. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in dem Alter der verwendeten *gld*^{-/-} Mäuse liegen, die alle aus der hauseigenen Zucht stammen. Dabei ist aufgrund der experimentellen Planung in seltenen Fällen nicht zu vermeiden, daß wegen der benötigten Tierzahlen auch noch recht junge Tiere zum Einsatz kommen, die altersbedingt schon eine geringere Ausgangsohrdicke aufweisen. Da als

Ausgangsohrdicke ein in vielen Experimenten gemessener Mittelwert bei der Berechnung der Ohrschwellung von der tatsächlich ermittelten Ohrdicke subtrahiert wird, kann es aufgrund des Alters der Tiere vorkommen, dass solche experimentellen Gruppen niedrigere Ohrschwellungen aufweisen. Wichtig ist in solchen Fällen, dass zumindest die Signifikanz der Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen des gleichen Stammes gegeben ist. Dies ist hier der Fall.

In den folgenden Experimenten wurde weiter untersucht, welche Zellpopulationen der übertragenen Zellen FasL exprimieren müssen, um im Empfänger Apoptose induzieren zu können, und welche Fas exprimieren müssen, um durch Apoptose zu sterben. Zu diesem Zweck wurden zunächst aufgereinigte T- und B-Zellen oral tolerisierter Spender in FasL-defiziente Empfänger übertragen, und die Induktion der Toleranz durch die Messung der Ohrschwellung überprüft.

3.5.3.3 Transfer von T-Zellen in FasL-Defiziente Mäuse

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Auslösung von Apoptose durch T-Zellen des toleranten Spenders für die Induktion der Nickel-Toleranz im Empfänger verantwortlich ist, oder ob die T-Zellen selber durch Apoptose sterben müssen. Trifft die erste Möglichkeit zu, dann sollten die T-Zellen toleranter WT-Spender, die den funktionellen FasLiganden exprimieren, dazu in der Lage sein, das T-Zellrepertoire des FasL-defizienten Empfängers zu supplementieren und die Apoptose von Empfängerzellen auszulösen, was die Induktion der Toleranz nach sich zieht. Ist die zweite Möglichkeit zutreffend, dann sollte durch den Transfer von WT T-Zellen in die *gld*^{-/-} Empfänger keine Übertragung der Toleranz möglich sein, da die Zellen des Empfängers aufgrund des defekten FasLiganden keine Apoptose induzieren können. Der Ausgang dieses Experimentes ist in **Abbildung 14** dargestellt.

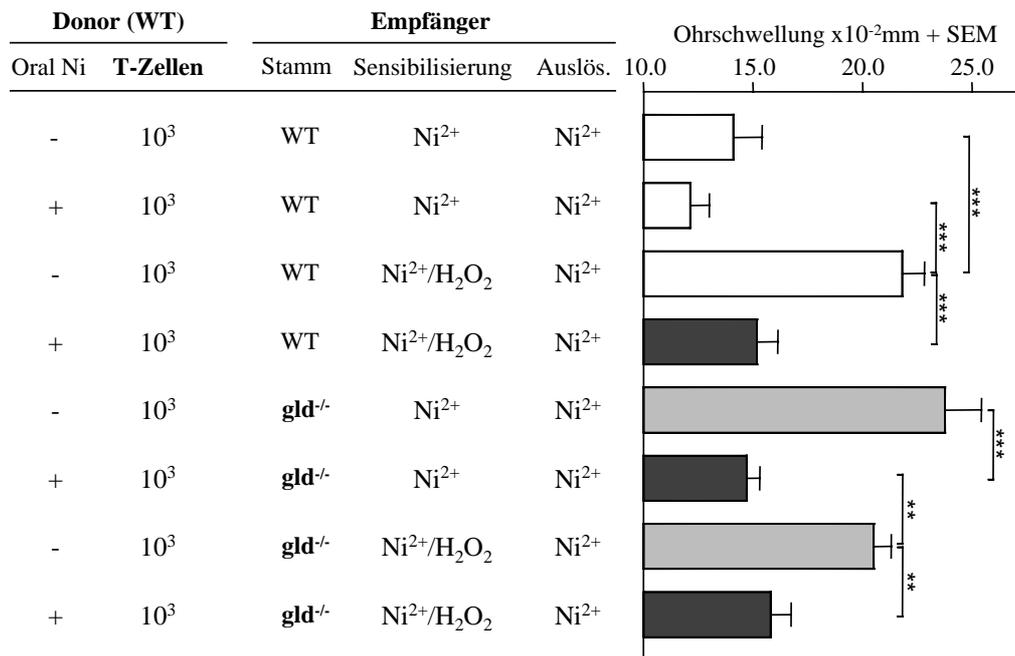


Abb. 14: T-Zellen toleranter WT Spender allein übertragen bereits die Toleranz auf FasL-defiziente Empfänger. Die toleranten Spender erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen 10 mM NiCl₂ oral über das Trinkwasser, die naiven Spender normales Trinkwasser. Anschließend wurden jeweils 10³ T-Zellen (APZ-depletierte Milzzellen) pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl₂ oder 10 mM NiCl₂ in 1% H₂O₂ (Ni²⁺/H₂O₂) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl₂ in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 - 4 zeigen das Ergebnis bei C57BL6 WT Empfängern, die Gruppen 5 - 8 bei *gld*^{-/-} Empfängern. Die Gruppen 2, 4, 6 und 8 erhielten T-Zellen toleranter Spender, die übrigen erhielten Zellen naiver Spender. Der Transfer toleranter T-Zellen führt zur Induktion der Toleranz sowohl in WT Empfängern (Gr. 4), als auch in FasL-defizienten Empfängern (Gr. 6 + 8), was nicht nur die Auslösung der Hypersensibilität durch Ni²⁺ (Gr. 6), sondern auch durch Ni²⁺/H₂O₂ (Gr. 8) in diesem Stamm verhindert.

Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, führt die Injektion von Ni^{2+} nicht zur Sensibilisierung von WT-Mäusen, bei erneuter Injektion von Ni^{2+} kommt es nicht zur Auslösung einer Zweitantwort, unabhängig davon, ob die Tiere zuvor einen T-Zelltransfer von naiven oder toleranten Spendern erhalten haben (Gr. 1 + 2). Erfolgt die Sensibilisierung jedoch mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, so entwickeln die Empfänger der T-Zellen naiver Spender eine deutliche Ohrschwellung nach Auslösung der Zweitantwort (Gr. 3), während die Empfänger der T-Zellen toleranter Spender nicht sensibilisiert werden, die Zweitantwort auf Nickel bleibt aus, sie zeigen keine erhöhte Ohrschwellung (Gr. 4). Wie bereits in Abb. 12 gezeigt, sind Mäuse des FasL-defizienten $\text{gld}^{-/-}$ Stammes bereits durch die Injektion von Ni^{2+} sensibilisierbar, und dies ändert sich auch durch den Transfer der T-Zellen unbehandelter Spender nicht, wie die Ausbildung der Zweitantwort zeigt (Gr. 5). Erhalten die Tiere vor der Sensibilisierung durch Ni^{2+} jedoch die T-Zellen eines toleranten WT-Spenders, so wird die Zweitantwort unterdrückt (Gr. 6). Analog dazu verhalten sich die $\text{gld}^{-/-}$ Empfänger naiver oder toleranter Spender-T-Zellen nach Sensibilisierung mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Die Empfänger von T-Zellen unbehandelter WT-Spender weisen eine deutliche Zweitreaktion auf (Gr. 7), während die Ohrschwellung bei den Empfängern toleranter Spender-T-Zellen niedrig ist (Gr. 8).

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt eindeutig, daß die Toleranz durch Transfer von T-Zellen, die einen funktionellen FasLiganden exprimieren, auf FasL-defiziente $\text{gld}^{-/-}$ Empfänger übertragen werden kann. Dies beweist, daß die Unfähigkeit dieser Tiere zur Toleranzinduktion gegen Nickel auf der fehlenden Expression des FasLiganden auf ihren T-Zellen beruht. Dies legt den Schluß nahe, daß die Aufgabe der T-Zellen während der Induktionsphase der Toleranz darin besteht, andere Zellen durch die Fas-FasL-vermittelte Apoptose zu töten.

3.5.3.4 Transfer von B-Zellen in FasL-Defiziente Mäuse

In diesem Experiment wurde analog zum Transfer von WT-T-Zellen, der in **3.5.3.3** beschrieben ist, eine identische Menge B-Zellen toleranter WT-Spender auf FasL-defiziente Empfänger übertragen, um festzustellen, ob die Expression des funktionellen FasLiganden auch auf der Oberfläche von B-Zellen während der Induktion der Nickel-Toleranz erforderlich ist. Nach dem Transfer wurden die Empfänger wie bereits beschrieben sensibilisiert, nach weiteren 10 Tagen wurde die Zweitantwort gegen Nickel in den Ohren ausgelöst. Wenn die Expression von FasL für die Toleranzinduktion von Bedeutung ist, dann sollten die übertragenen WT-B-Zellen das B-Zellrepertoire der Empfänger supplementieren können und so die Induktion der Toleranz ermöglichen. Die ermittelten Resultate stellt **Abbildung 15** dar.

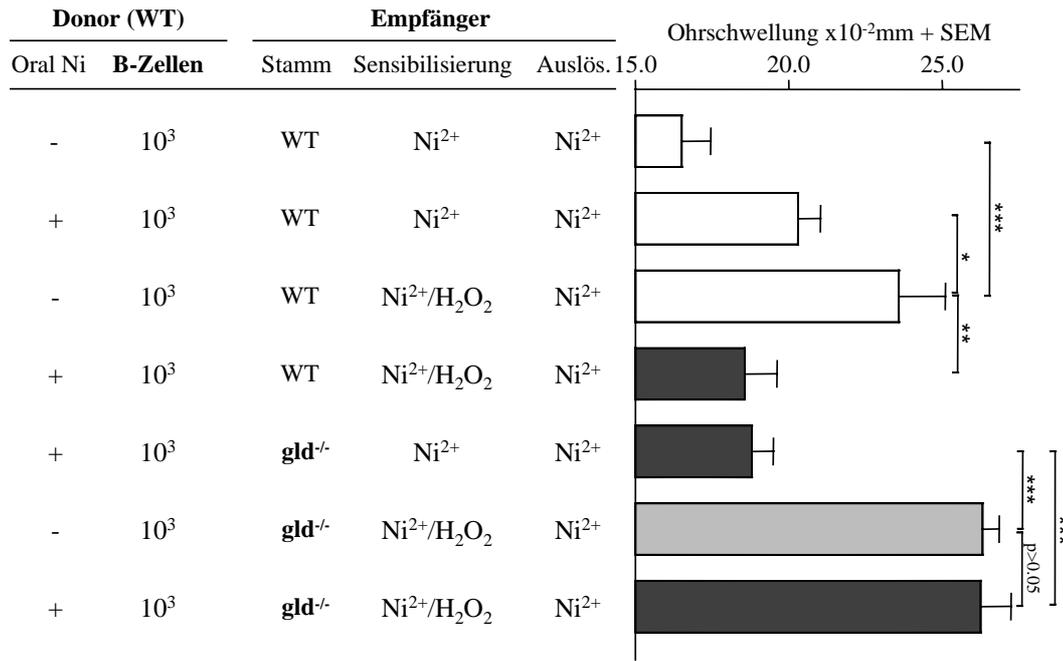


Abb. 15: B-Zellen toleranter WT Spender können keine Toleranz auf FasL-defiziente Empfänger übertragen. Die toleranten Spender erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen 10 mM NiCl₂ oral über das Trinkwasser, die naiven Spender normales Trinkwasser. Anschließend wurden jeweils 10³ B-Zellen (T-Zell- und DZ-depletierte Milzzellen) pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl₂ oder 10 mM NiCl₂ in 1% H₂O₂ (Ni²⁺/H₂O₂) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl₂ in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 - 4 zeigen das Ergebnis bei C57BL6 WT Empfängern, die Gruppen 5 - 7 bei gld^{-/-} Empfängern. Die Gruppen 2, 4, 5 und 7 erhielten B-Zellen toleranter Spender, die übrigen erhielten Zellen naiver Spender. Der Transfer toleranter B-Zellen führt zur Induktion der Toleranz in WT Empfängern (Gr. 4), jedoch nicht in FasL-defizienten Empfängern, die durch Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisiert werden (Gr. 7). Die Sensibilisierung der FasL-defizienten Empfänger durch Ni²⁺ wird jedoch verhindert (Gr. 5).

Wie bereits in vielen vorangegangenen Experimenten gezeigt, führt die Injektion von WT-Tieren mit Ni²⁺ alleine nicht zur Sensibilisierung (Gr. 1 + 2, Sensibilisierungskontrolle). Analog zum Transfer von T-Zellen (vgl. Abb. 14, Gr. 4), und wie von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) beschrieben, führt der Transfer von B-Zellen toleranter Spender zur Induktion der Nickel-Toleranz in WT-Empfängern (Gr. 4), während der Transfer von B-Zellen unbehandelter Spender die Sensibilisierung durch Ni²⁺/H₂O₂ nicht verhindern kann (Gr. 3). Werden B-Zellen toleranter WT-Spender in Empfänger des gld^{-/-} Stammes übertragen, so ist es nicht mehr möglich, diese Tiere durch die Injektion von Ni²⁺ alleine zu sensibilisieren (Gr. 5). Keinen Einfluß jedoch hat der Transfer tolerogener B-Zellen auf die Sensibilisierung durch Ni²⁺/H₂O₂, die gld^{-/-} Empfänger tolerogener WT-B-Zellen entwickeln nach wie vor eine Hypersensibilität gegen Nickel (Gr. 8), das Ausmaß dieser Immunantwort ist vergleichbar mit dem, welches Empfänger von B-Zellen unbehandelter WT-Spender zeigen (Gr.7).

Dieses Experiment zeigt, daß der Transfer von B-Zellen, die eine funktionelle Form des FasLiganden besitzen, nicht die Hypersensibilität gegen Nickel verhindern kann. Demzufolge spielt die Expression von FasL auf B-Zellen keine Rolle bei der Induktion der Nickel-Toleranz. Dabei besteht aber offensichtlich ein Unterschied hinsichtlich der Art der Sensibilisierung. Der Transfer tolerogener B-Zellen kann die Sensibilisierung durch Ni²⁺ alleine verhindern, nicht jedoch die Sensibilisierung durch Ni²⁺ zusammen mit dem Adjuvans Wasserstoffperoxid (H₂O₂). In diesem Zusammenhang kann aber nicht entschieden werden, ob dieser Unterschied von der Expression des FasLiganden abhängt, oder ob die Übertragung tolerogenen Materials durch die B-Zellen anderweitig für die Unterdrückung der Sensibilisierung durch Ni²⁺ verantwortlich ist. Hierbei scheint es sich nur um eine unvollständige Form der Toleranz zu handeln, da dieser Status durch die Verwendung eines Adjuvans bei der

Sensibilisierung durchbrochen wird. Für die Induktion einer vollständigen Toleranz gegen Nickel spielt die FasL-Expression durch B-Zellen jedenfalls keine Rolle.

3.5.4 Übertragung der Toleranz durch Zelltransfer von Fas und FasL defizienten Mäusen

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Daten wurden aufgrund der Supplementation des Zellrepertoires von Gen-defizienten Mäusen mit Zellen von WT-Spendern erlangt. In den folgenden Experimenten wird eine genau entgegengesetzte Strategie verfolgt. Nun werden Zellen Gen-defizienter Spender, die selber keine Toleranz entwickeln, auf C57BL6 WT-Empfänger übertragen. Dies dient zur Klärung der Frage, ob sich trotz des Apoptosedefektes toleranzübertragende Zellen entweder des einen oder des anderen Typs (T- oder B-Zellen) bilden können. Entspricht das den Tatsachen, so bedeutet dies, daß die Unfähigkeit der Gen-defizienten Mäuse zur Entwicklung der Toleranz gegen Nickel in der gestörten Induktion der Apoptose von Zellen des einen Typs durch die Zellen des anderen Typs begründet liegt.

3.5.4.1 Transfer von T-Zellen Fas-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger

Zunächst wurden aufgereinigte T-Zellen Fas-defizienter $lpr^{-/-}$ Spender, die über 4 Wochen Ni^{2+} durch orale Applikation im Trinkwasser erhalten haben, auf WT-Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung und Auslösung der Zweitantwort bei den Empfängern erfolgte wie bereits beschrieben (Abb. 16).

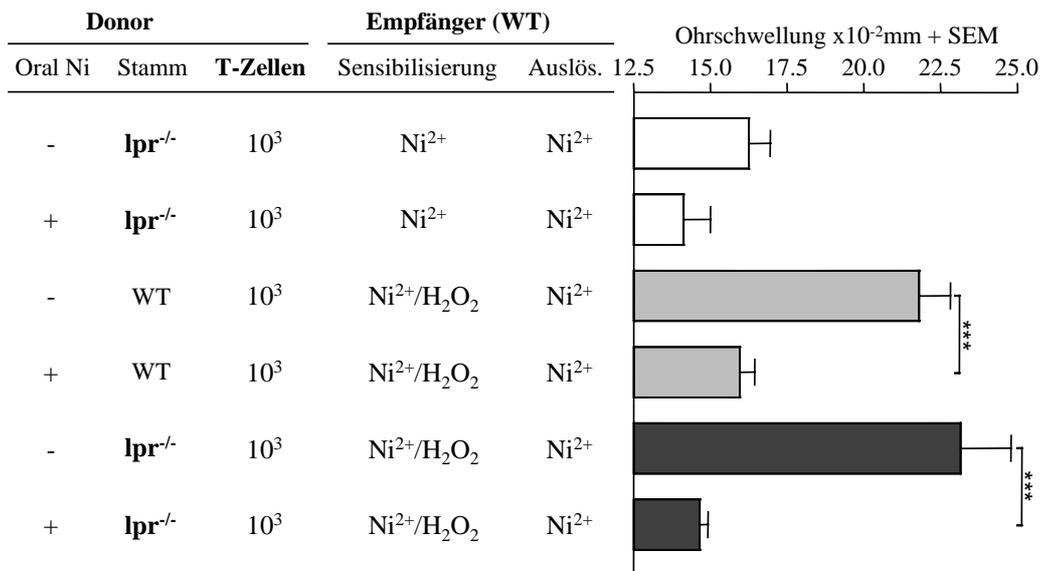


Abb. 16: T-Zellen können die Toleranz ohne Beteiligung von Fas (CD95) übertragen. In diesem Experiment wurden 10^3 T-Zellen (APZ-depletierte Milzzellen) von Fas-defizienten Spendern ($lpr^{-/-}$), die über 4 Wochen oral mit 10 mM $NiCl_2$ im Trinkwasser behandelt wurden, auf naive C57BL6 WT-Empfänger übertragen. Die Gruppen 1 + 2 dienen als Sensibilisierungskontrolle und zeigen, daß mit Ni^{2+} allein keine Sensibilisierung der Empfänger erfolgt. Der Transfer von WT-T-Zellen (Gruppe 3 + 4) führt zur Induktion der Toleranz im Empfänger, wenn die T-Zellen von toleranten Spendern stammen (Gruppe 4). Auch $lpr^{-/-}$ T-Zellen (Gruppe 5 + 6) sind zum Transfer der Toleranz in der Lage, wenn der Spender vorher oral mit Ni^{2+} behandelt wurde (Gruppe 6).

Die Ergebnisse zeigen, daß WT-Mäuse auch nach Transfer von $lpr^{-/-}$ T-Zellen nicht durch Ni^{2+} allein zu sensibilisieren sind, wobei es keine Rolle spielt, ob die übertragenen $lpr^{-/-}$ T-Zellen von unbehandelten oder oral mit Ni^{2+} behandelten Fas-defizienten Spendern stammen, die Empfänger zeigen keine erhöhte Ohrschwellung (Gr. 1 + 2, Sensibilisierungskontrolle). Erhalten die Tiere einen Transfer von WT-T-Zellen, die von unbehandelten naiven Spendern stammen, entwickeln sie nach Sensibilisierung mit Ni^{2+}/H_2O_2 eine deutliche Hypersensibilitätsreaktion, die sich in erhöhter Ohrschwellung zeigt (Gr. 3). Stammen die transferierten T-Zellen hingegen von oral tolerierten WT-Spendern, so bleibt die Zweitantwort gegen Nickel aus, die Empfänger werden tolerant (Gr. 4).

Analog dazu verhält es sich bei Transfer von T-Zellen unbehandelter oder oral tolerisierter *lpr*^{-/-} Spender. Stammen die T-Zellen von unbehandelten Fas-defizienten Spendern, führt die Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ zur Hypersensibilität gegen Nickel, die nach Auslösung der Zweitantwort entwickelte Ohrschwellung ist mit der von Empfängern naiver WT-T-Zellen vergleichbar (Gr. 5). Stammen die übertragenen Fas-defizienten T-Zellen jedoch von oral mit Nickel behandelten Tieren, wird die Sensibilisierung gegen Nickel unterdrückt, die Empfänger entwickeln Toleranz (Gr. 6).

Dieser Befund ist bemerkenswert, zeigt er doch, daß die Fas-defizienten Spender regulatorische T-Zellen bilden können, obwohl sie selber nicht tolerant werden. Die T-Zellen sind offensichtlich nicht die Ziele der Apoptose, sonst wäre die Übertragung der Toleranz im beschriebenen Experiment nicht möglich gewesen. Offensichtlich ist die Expression des Fas-Rezeptors auf der Oberfläche eines anderen Zelltyps erforderlich, der während der Toleranzinduktion durch Apoptose getötet wird. Hierfür kommen somit noch die B-Zellen in Frage, da sich auch mit ihnen die Toleranz gegen Nickel übertragen lässt. Diese Vermutung wurde im folgenden Experiment überprüft.

3.5.4.2 Transfer von B-Zellen Fas-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger

In diesem Experiment wurden aufgereinigte B-Zellen Fas-defizienter Spender, die über 4 Wochen oral mit Ni²⁺ behandelt wurden, auf naive WT-Spender übertragen, analog zu dem in Abschnitt 3.5.4.1 beschriebenen Transfer von T-Zellen. Daten eines identischen Transfers wurden auch in der Dissertation von M. Nowak (2005), Abb. 3.2.2, gezeigt. Dieser Versuch gibt Aufschluß darüber, ob die Expression von funktionellem Fas und somit die Apoptose der B-Zellen für die Induktion der Nickel-Toleranz erforderlich ist. Nach Sensibilisierung der Empfänger und Auslösung der Zweitantwort wurde die Induktion der Toleranz durch Ermittlung der Ohrschwellung überprüft (Abb. 17).

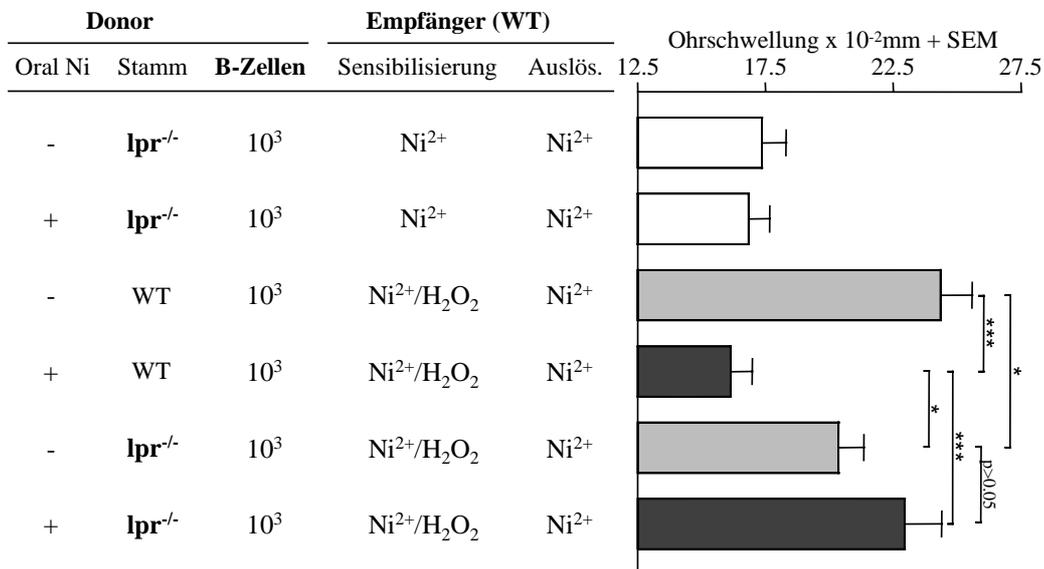


Abb. 17: B-Zellen müssen funktionelles Fas (CD95) exprimieren, um Toleranz zu übertragen. In diesem Experiment wurden 10³ B-Zellen (CD11c-depletierte APZ) von Fas-defizienten Spendern (*lpr*^{-/-}), die über 4 Wochen oral mit 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser behandelt wurden, auf naive C57BL/6 WT-Empfänger übertragen. Die Gruppen 1 + 2 dienen als Sensibilisierungskontrolle und zeigen, daß mit Ni²⁺ allein keine Sensibilisierung der Empfänger erfolgt. Der Transfer von WT-B-Zellen (Gruppe 3 + 4) führt zur Induktion der Toleranz im Empfänger, wenn die B-Zellen von toleranten Spendern stammen (Gruppe 4). B-Zellen von *lpr*^{-/-} Spendern (Gruppe 5 + 6) hingegen sind nicht dazu fähig, selbst wenn der Spender vorher oral mit Ni²⁺ behandelt wurde (Gruppe 6).

WT-Empfänger Fas-defizienter B-Zellen lassen sich nicht durch Ni^{2+} sensibilisieren, unabhängig davon, ob die Spenderzellen von naiven Mäusen (Gr. 1) oder von oral mit Ni^{2+} behandelten Tieren stammen (Gr. 2), in beiden Fällen entwickeln die Empfänger keine Zweitantwort gegen Nickel. Erhalten die Tiere einen Transfer von B-Zellen unbehandelter WT-Spender, so führt die Injektion mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ zur Sensibilisierung der Empfänger (Gr. 3), der Transfer von B-Zellen oral tolerisierter Spender hingegen bewirkt, daß die Sensibilisierung unterbleibt (Gr. 4). Diese Gruppe dient zur Kontrolle der Toleranzinduktion durch B-Zellen. Werden die Empfänger von B-Zellen unbehandelter Fas-defizienter Spender mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sensibilisiert, entwickeln auch sie nach Auslösung der Zweitantwort eine Hypersensibilitätsreaktion gegen Nickel, sie weisen eine erhöhte Ohrschwellung auf (Gr. 5). Anders als der Transfer von T-Zellen oral tolerisierter $\text{lpr}^{-/}$ Spender (vgl. Abb. 16, Gr. 6) verhindert der Transfer von B-Zellen dieser Tiere die Sensibilisierung nicht, die Empfänger dieser Versuchsgruppe weisen immer noch eine erhöhte Ohrschwellung auf (Gr. 6).

Dieses Ergebnis beweist, daß zur Übertragung der Toleranz durch B-Zellen die Expression von Fas auf der Oberfläche dieser Zellen erforderlich ist. Es bestätigt die Vermutung, daß es die B-Zellen sind, die während der Induktion der Toleranz durch Fas-vermittelte Apoptose sterben müssen. Bleibt die Induktion der Apoptose aus, entsteht keine Toleranz. Die Daten aus diesem und den vorangegangenen Experimenten deuten einen möglichen Mechanismus für die Induktion der Toleranz an: T-Zellen, die einen funktionellen FasLiganden exprimieren, können Toleranz auf FasL-defiziente Empfänger übertragen (**Abb. 14**), während B-Zellen dies nicht können (**Abb. 15**). Diese T-Zellen müssen jedoch kein funktionelles Fas-Molekül besitzen, um Toleranz zu übertragen (**Abb. 16**), während dies für die Toleranzübertragung durch B-Zellen Voraussetzung ist (**Abb. 17**). Dies legt die Vermutung nahe, daß T-Zellen die Apoptose von B-Zellen im Empfänger induzieren. Wenn die T-Zellen kein funktionelles FasL exprimieren, sind sie nicht dazu fähig, die B-Zellen durch Induktion der Apoptose zu töten, besitzen die B-Zellen kein funktionelles Fas, kann ebenfalls keine Apoptose bei ihnen ausgelöst werden, in beiden Fällen bleibt die Induktion der Toleranz aus.

Im umgekehrten Versuchsansatz soll nun die Bedeutung des FasLiganden geklärt werden. Zu diesem Zweck wird überprüft, ob auch FasL-defiziente Zellen die Toleranz auf WT-Empfänger übertragen können, und wenn ja, welche. Dazu wurden zunächst gesamte Lymphozyten FasL-defizienter Spender, die oral mit Ni^{2+} behandelt wurden, auf WT-Empfänger übertragen. Anschließend wurde die Induktion der Toleranz mit dem Mausohrschwellungstest untersucht.

3.5.4.3 Transfer von Milzzellen FasL-defizienter Mäuse auf WT-Empfänger

Zunächst wurden die Milzzellen FasL-defizienter Spender, die über einen Zeitraum von 4 Wochen oral mit Ni^{2+} behandelt wurden, auf WT-Empfänger übertragen. Nach der Sensibilisierung wurde die Induktion der Toleranz im Empfänger durch die Untersuchung der Zweitantwort kontrolliert. Zur Messung diente wiederum der Mausohrschwellungstest (**Abb. 18**).

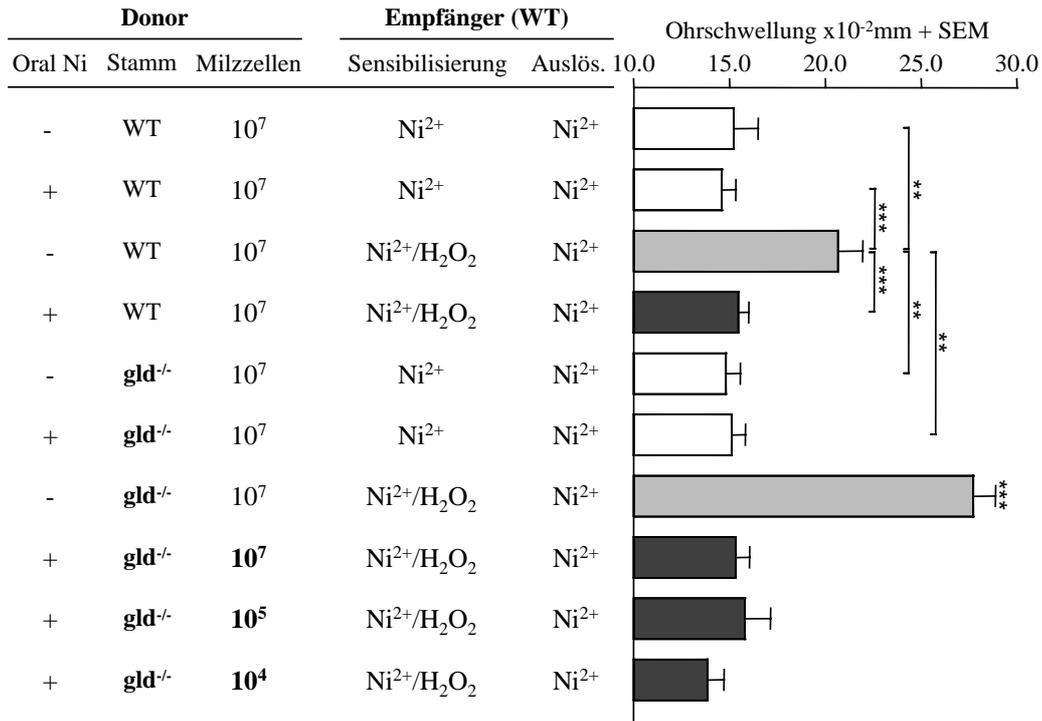


Abb. 18: Milzzellen oral behandelter FasL-defizienter Spender können Toleranz auf naive WT Empfänger übertragen. Die behandelten Spender erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen 10 mM NiCl₂ oral über das Trinkwasser, die naiven Spender normales Trinkwasser. Anschließend wurden jeweils 10⁷, bzw. im Falle von Zellen tolerisierter *gld*^{-/-} Spender auch 10⁵ und 10⁴, Milzzellen pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl₂ oder 10 mM NiCl₂ in 1% H₂O₂ (Ni²⁺/H₂O₂) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl₂ in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 - 4 haben WT Spenderzellen erhalten, die Gruppen 5 - 10 Zellen von *gld*^{-/-} Spendern. Die Gruppen 2, 4, 6, und 8 - 10 erhielten Milzzellen tolerisierter Spender, die übrigen erhielten Zellen unbehandelter Tiere. Der Transfer von tolerisierten FasL-defizienten Zellen induziert Toleranz in sensibilisierten WT Empfängern (Gr. 8 - 10), ebenso wie der Transfer von Zellen toleranter WT Spender (Gr. 4), obwohl die *gld*^{-/-} Spender selber nicht tolerant werden (Vergl. Abb. 11). Für den Transfer der Toleranz sind bemerkenswerterweise bereits 10⁵ sowie 10⁴ *gld*^{-/-} Milzzellen ausreichend (Gr. 9 + 10).

Die Daten zeigen wiederum, daß die Empfänger von WT-Zellen nicht durch Ni²⁺ sensibilisiert werden können (Gr. 1 + 2, Sensibilisierungskontrolle). Erhalten die Tiere jedoch eine Injektion von Ni²⁺/H₂O₂ zwecks Sensibilisierung, entwickeln die Empfänger der Milzzellen unbehandelter Spender eine Zweitantwort gegen Nickel (Gr. 3), während die Empfänger von Zellen toleranter WT-Spender keine Ohrschwellung zeigen, sie entwickeln Toleranz (Gr. 4). Auch nach dem Transfer von Milzzellen FasL-defizienter Spender sind die WT-Empfänger nicht durch Ni²⁺ zu sensibilisieren, unabhängig von der Behandlung des Zellspenders (Gr. 5 + 6, Sensibilisierungskontrolle). Werden die Empfänger der *gld*^{-/-} Spenderzellen hingegen mit Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisiert, so entwickeln nur die Empfänger von Zellen unbehandelter Spender eine Zweitantwort (Gr. 7), die Empfänger von Zellen oral mit Ni²⁺ behandelter FasL-defizienter Tiere hingegen weisen keine Ohrschwellung auf, sie werden tolerant (Gr. 8 - 10). Bemerkenswert dabei ist, daß für den Transfer der Toleranz bereits 10⁵ (Gr. 9) und sogar nur 10⁴ *gld*^{-/-} Spenderzellen ausreichend sind (Gr. 10), obwohl die Spender selber nicht tolerant werden und sogar durch Ni²⁺ alleine sensibilisiert werden können (vgl. Abb. 11). Als nächstes stellt sich die Frage, welche Zellen unter den FasL-defizienten Zellen für den Transfer der Toleranz verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Frage werden im nächsten Experiment die aufgereinigten T-Zellen FasL-defizienter Spender übertragen.

3.5.4.4 Transfer von T-Zellen FasL-defizienter Tiere auf WT-Empfänger

In diesem Versuch wurden 10³ aufgereinigte T-Zellen FasL-defizienter Spender, die oral mit Ni²⁺ behandelt wurden, auf WT-Empfänger übertragen. Nach Sensibilisierung mit Ni²⁺/H₂O₂ und

Auslösung der Zweitantwort durch Injektion von Ni^{2+} in die Ohren, wurde durch Messung der Ohrschwellung die Art der entstehenden Reaktion untersucht (**Abb. 19**).

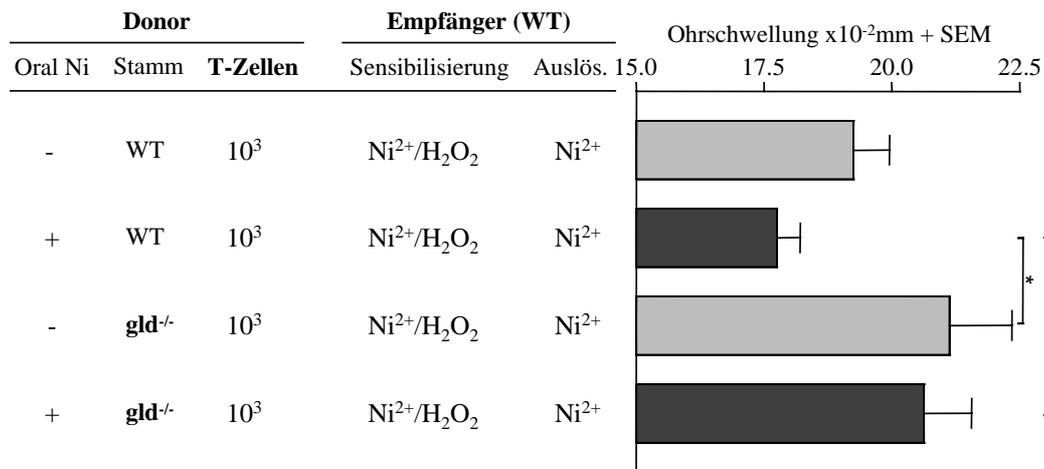


Abb. 19: T-Zellen oral behandelter FasL-defizienter Spender können keine Toleranz auf naive WT Empfänger übertragen. Die Spender wurden tolerisiert wie in Abb. 17 beschrieben. Anschließend wurden jeweils 10^3 T-Zellen (APZ-depletierte Milzzellen) pro Empfänger übertragen. Die Sensibilisierung erfolgte durch s.c. Injektion der Empfänger mit 10 mM NiCl_2 in 1% H_2O_2 ($\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) wie bereits beschrieben. Die Zweitantwort wurde durch Injektion von 10 mM NiCl_2 in die Ohren ausgelöst, 2 Tage später erfolgte die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 + 2 haben WT Spenderzellen erhalten, die Gruppen 3 + 4 Zellen von *gld*^{-/-} Spendern. Die Gruppen 2 + 4 erhielten Milzzellen tolerisierter Spender, die übrigen (Gr. 1 + 3) erhielten Zellen unbehandelter Tiere. Der Transfer von tolerisierten FasL-defizienten Zellen induziert keine Toleranz in sensibilisierten WT Empfängern (Gr. 4), im Gegensatz zum Transfer von Zellen toleranter WT Spender (Gr. 2).

Die Daten zeigen in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Experimenten, daß Empfänger von T-Zellen unbehandelter WT-Spender durch $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sensibilisiert werden, sie zeigen eine Zweitantwort (Gr. 1). Erhalten die Tiere jedoch T-Zellen von Spendern, die eine 4-wöchige Behandlung mit Ni^{2+} im Trinkwasser erhalten haben, so zeigen sie eine niedrigere Ohrschwellung, sie entwickeln Toleranz (Gr. 2). Im hier dargestellten Experiment ist der Unterschied in der Ohrschwellung zwischen Gruppe 1 und 2 nicht signifikant, zeigt jedoch die gleiche Tendenz wie in allen bisher durchgeführten Transfers von T-Zellen toleranter Spender auf naive WT-Empfänger. Signifikant hingegen sind die Unterschiede in der Ohrschwellung zwischen den Gruppen, die T-Zellen FasL-defizienter Spender erhalten haben (Gr. 3 + 4), und den Empfängern toleranter WT-T-Zellen (Gr. 2). Dabei ist es unerheblich, ob die übertragenen *gld*^{-/-} T-Zellen von unbehandelten (Gr. 3) oder oral mit Ni^{2+} behandelten Spendern stammen (Gr. 4), in beiden Fällen entwickeln die Empfänger eine Zweitantwort. Das bedeutet, daß FasL-defiziente T-Zellen Ni^{2+} -behandelter Spender keine Toleranz auf naive Empfänger übertragen können, obwohl die gesamten Milzzellen dieser Spender dazu in der Lage sind (vgl. Abb. 18, Gr. 8 – 10). In diesem Fall ist die Toleranzübertragung also auf andere Zellen unter den Lymphozyten zurückzuführen.

Nach den bisherigen Ergebnissen handelt es sich dabei um die B-Zellen der FasL-defizienten Spender. Für sie ist die Expression des FasL-Liganden ohne Bedeutung, sie exprimieren jedoch funktionelles Fas auf ihrer Oberfläche, analog zu WT-B-Zellen. Das bedeutet, daß die Induktion der Apoptose bei den *gld*^{-/-} B-Zellen nicht beeinträchtigt ist. Die T-Zellen hingegen müssen den funktionellen FasLiganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, um Toleranz übertragen zu können, also die Fähigkeit besitzen, andere Zellen in Apoptose zu schicken. Die Tatsache, daß sie jedoch kein funktionelles Fas besitzen müssen, schließt bereits die Möglichkeit aus, daß sie die Apoptose anderer T-Zellen (Brudermord, "fratricide") oder ihren eigenen Tod (Selbstmord, "suicide") induzieren. Die B-Zellen hingegen benötigen zum Transfer der Toleranz funktionelles Fas. Daher liegt es nahe, daß sie während der Induktion der Toleranz von den T-Zellen getötet werden, also das Ziel der Apoptoseinduktion sind. Bleibt die Induktion der Apoptose aus, entweder durch das Unvermögen der T-Zellen zu töten oder das Unvermögen der B-Zellen zu sterben, kommt es nicht zur Induktion der Toleranz. Dabei

spielt es offensichtlich keine Rolle, welche der beteiligten Parteien in ihrer Funktion beeinträchtigt ist. Diese Daten demonstrieren eindeutig, daß die Apoptose eine essentielle Voraussetzung für das Entstehen von Toleranz ist.

3.6 Rolle von iNKT-Zellen in der Nickelallergie

In der Literatur finden sich viele Hinweise darauf, daß NKT-Zellen wichtig für die Kontrolle von Autoimmunkrankheiten wie Diabetes und MS sind. Es konnte gezeigt werden, daß diese Zellpopulation neben den Treg-Zellen eine weitere regulatorische Lymphozytensubpopulation darstellt. Auch bei der Induktion der Toleranz im ACAID-Modell spielen diese Zellen eine wichtige Rolle. Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) haben gezeigt, daß NKT-Zell-defiziente Tiere des $J\alpha 18^{-/-}$ Stammes, die keine invarianten NKT-Zellen besitzen, zwar wie beschrieben sensibilisiert werden können, aber keine orale Toleranz gegen Nickel entwickeln. Adoptive Zelltransfers von oral mit Nickel behandelten NKT-Zell-defizienten Spendern haben gezeigt, daß mit APZ, also T-Zell-depletierten Milzzellen, die Toleranz auf naive WT-Empfänger übertragen werden kann, nicht jedoch mit deren T-Zellen. Offensichtlich entwickeln diese Tiere tolerogene APZ, jedoch keine Treg-Zellen. Substituiert man diese Tiere jedoch mit T-Zellen toleranter Wildtyp-Spender durch adoptiven Zelltransfer, entwickeln auch $J\alpha 18^{-/-}$ Tiere Nikeltoleranz. Hier zeigen sich deutliche Parallelen zur Situation in FasL-defizienten Tieren, die ebenfalls keine Treg-Zellen bilden, aber tolerogene APZ, speziell B-Zellen, besitzen.

Durch adoptiven Transfer von APZ eines toleranten Spenders lässt sich keine Toleranz auf NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen. Werden jedoch tolerogene APZ zusammen mit Milzzellen eines naiven Spenders transferiert, die unter anderen eben auch NKT-Zellen beinhalten, kann die Toleranz auf NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen werden. Diese NKT-Zellen müssen in der Lage sein, die Zytokine IL-4 und IL-10 zu bilden, werden Milzzellen von IL-4- oder IL-10-defizienten naiven Spendern für den Kotransfer verwendet, bleibt die Übertragung der Toleranz ebenfalls erfolglos (Roelofs-Haarhuis, 2004). Darüberhinaus müssen die in den kotransferierten Milzzellen enthaltenen NKT-Zellen den Fas-Liganden FasL (CD95L) exprimieren, ansonsten wird ebenfalls keine Toleranz übertragen (Roelofs-Haarhuis, unveröffentlicht, persönliche Kommunikation) (**Abb. 20**).

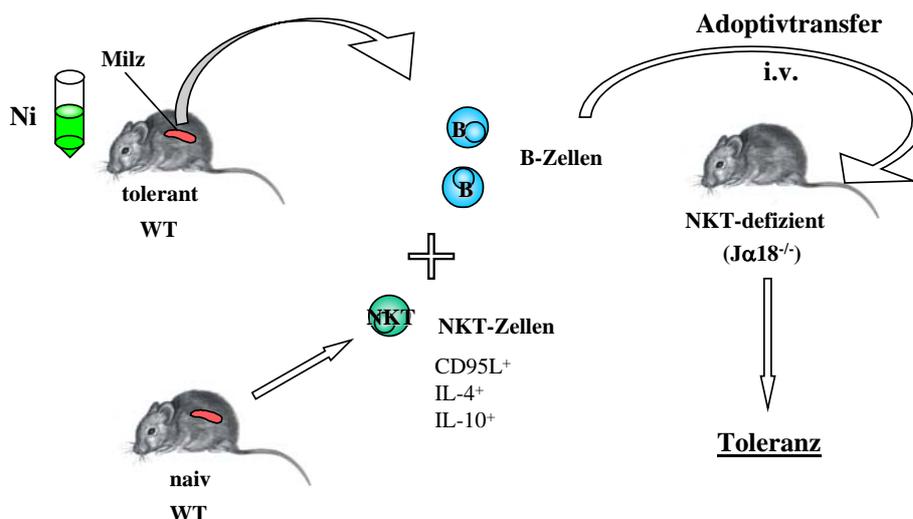


Abb. 20: Toleranzübertragung durch B-Zellen erfordert die Anwesenheit von NKT-Zellen im Empfänger. Schematisch dargestellt ist der Kotransfer von tolerogenen B-Zellen zusammen mit naiven NKT-Zellen, die FasL sowie die Zytokine IL-4 und IL-10 produzieren, in NKT-Zell-defiziente Empfänger. Ohne NKT-Zellen, die selber keinen Kontakt mit Nickel gehabt haben müssen, oder mit NKT-Zellen, die eines der aufgeführten Proteine nicht bilden können, entwickeln die Empfänger keine Toleranz.

Diese Beobachtungen zeigen, daß NKT-Zellen wichtige Funktionen bei der Induktion der oralen Toleranz gegen Nickel besitzen, und daß dafür sowohl die Expression von Zytokinen als auch die Induktion der Apoptose durch diese besonderen Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen zur Rolle der Apoptose in der oralen Induktion der Nickel-Toleranz zeigen, daß T-Zellen, die NKT-Zellen beinhalten, FasL exprimieren müssen, während B-Zellen Fas benötigen, um die Induktion der Toleranz zu ermöglichen. Die T-Zellen müssen also dazu in der Lage sein, die Apoptose in anderen Zellen auszulösen, während sie selber nicht sterben. B-Zellen hingegen müssen durch Apoptose getötet werden können, während die Fähigkeit, andere Zellen töten zu können für B-Zellen nicht erforderlich ist. Dies führt zu der Hypothese, daß während der Induktion der Nickel-Toleranz NKT-Zellen die Apoptose von B-Zellen induzieren, die dann von DZ aufgenommen und in tolerogener Weise präsentiert werden, was letztendlich zur Bildung Antigen-spezifischer Treg-Zellen und der Ausbildung der adaptiven regulatorischen Immunantwort führt. In den folgenden Experimenten soll versucht werden, die verschiedenen Punkte näher zu spezifizieren.

3.6.1 Transfer von B Zellen in iNKT-defiziente Empfänger

Im Gegensatz zu Roelofs-Haarhuis *et al.*, die für die beschriebenen Zelltransfers ausschließlich APZ, also ein Gemisch aus B-Zellen und DZ, verwendet haben, wurden in dieser Arbeit ausschließlich B-Zellen für die Transfers verwendet, also APZ, aus denen T-Zellen und DZ depletiert wurden, um explizit das Schicksal der B-Zellen, ohne den Einfluß der DZ, untersuchen zu können. Als Empfänger dienten NKT-Zell-defiziente Tiere des $J\alpha 18^{-/-}$ Stammes, um Aussagen über die Funktion der NKT-Zellen bei der Induktion der Toleranz durch den Transfer von B-Zellen machen zu können. Zunächst wurde überprüft, ob auch B-Zellen toleranter Wildtypspender, wie von Roelofs-Haarhuis für tolerogene APZ beschrieben, bei der Übertragung der Toleranz in NKT-Zell-defiziente Empfänger versagen (**Abb. 21**).

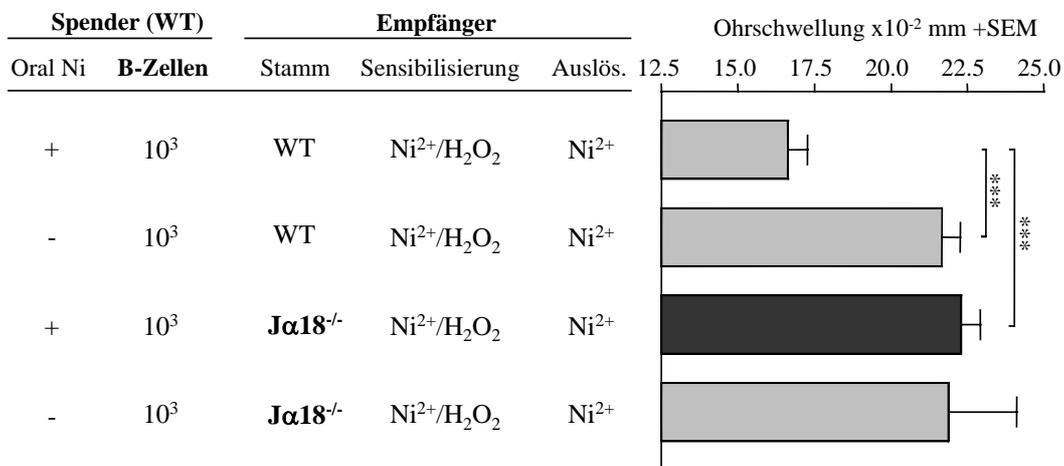


Abb. 21: Separierte B-Zellen Nickel-toleranter Spender können die Toleranz nicht in NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen. C57BL/6 Spendermäuse wurden entweder oral tolerisiert oder blieben unbehandelt. Die angegebenen Zahlen aufgereinigter B-Zellen aus der Milz wurden i.v. in naive syngene WT-Empfänger (Gruppe 1 + 2) oder in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger (Gruppe 3 + 4) injiziert. Nach Sensibilisierung der Empfänger mit Ni²⁺/H₂O₂ und Auslösung der Zweitantwort in den Ohren mit Ni²⁺ wurde die Ohrschwellung gemessen.

Wie die unseparierten APZ toleranter Wildtypspender (Roelofs-Haarhuis, 2004) sind auch deren aufgereinigte B-Zellen nicht dazu in der Lage, die Toleranz auf NKT-Zell-defiziente Empfänger zu übertragen (**Abb. 21**, Gr. 3), während sie die Toleranz auf Wildtypempfänger, die sich nur durch die Anwesenheit von NKT-Zellen unterscheiden, übertragen können (Gr. 1).

Tolerante T-Zellen können die Toleranz in NKT-Zell-defiziente Tiere übertragen (Roelofs-Haarhuis, 2004), APZ oder aufgereinigte B-Zellen jedoch nicht. Werden jedoch NKT-Zellen zusammen mit B-Zellen toleranter Spender transferiert, werden $J\alpha 18^{-/-}$ -Empfänger tolerant, selbst wenn die

übertragenen NKT-Zellen vorher keinen Kontakt mit Nickel hatten (**Abb. 20**). Diese NKT-Zellen müssen FasL exprimieren, die B-Zellen hingegen Fas, was darauf schließen lässt, daß sie für die Apoptose der B-Zellen verantwortlich sind (**Abb. 22A**). Besteht die Funktion der NKT-Zellen in der Apoptoseinduktion der B-Zellen, dann sollte die Übertragung der Toleranz in $J\alpha 18^{-/-}$ -Empfänger auch ohne Kotransfer von NKT-Zellen erfolgen, wenn die Apoptose der B-Zellen künstlich induziert wird, wie zum Beispiel durch γ -Bestrahlung. Tatsächlich findet der Transfer der Toleranz in $J\alpha 18^{-/-}$ -Empfänger durch apoptotische tolerogene B-Zellen oder *in vitro* mit Nickel beladene apoptotische B-Zellen statt (**Abb. 22B**) (Nowak, unveröffentlichte Daten), obwohl unbestrahlte B-Zellen dies nicht vermögen (**Abb. 21**, Gr. 3). Offensichtlich sind mit der Apoptoseinduktion einhergehende Veränderungen für die tolerogene Wirkung der B-Zellen verantwortlich.

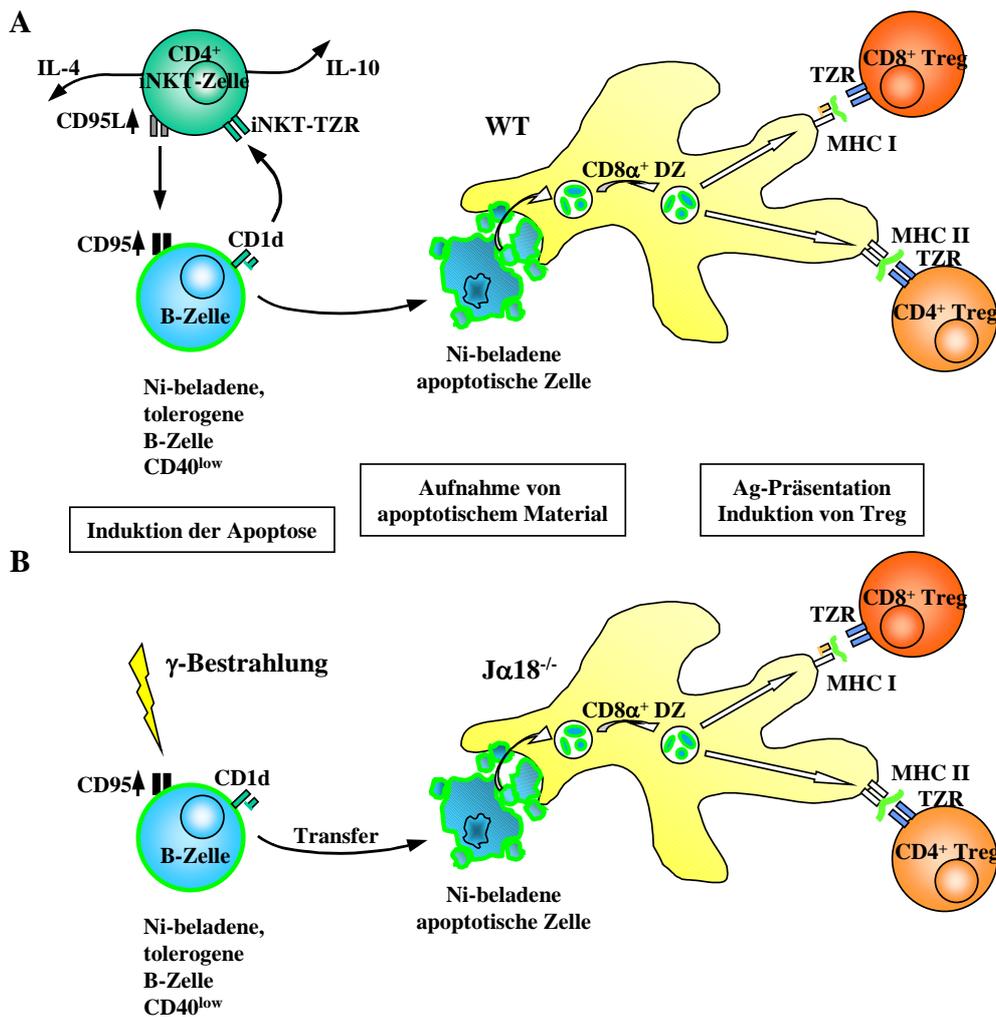


Abb. 22: Funktion von NKT-Zellen bei der Induktion der Nickel-Toleranz. NKT-Zellen können von tolerogenen B-Zellen, die CD1d exprimieren, aktiviert werden und regulieren die Expression von FasL (CD95L), sowie die Expression von Zytokinen wie IL-4 und IL-10 auf (A). Dies ist die Situation in WT-Tieren und bei Kotransfer von B-Zellen und NKT-Zellen in NKT-Zell-defiziente $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger. Die Folge ist die Apoptose der tolerogenen B-Zellen, die eine erhöhte Expression von Fas (CD95) aufweisen (Nowak, Dissertation). Das apoptotische Material wird von dendritischen Zellen aufgenommen und in tolerogener Weise präsentiert, was zur Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ Treg-Zellen führt (Artikel *et al.*, 2001). In (B) wird die Apoptose der tolerogenen B-Zellen durch γ -Bestrahlung ausgelöst. Diese Zellen sind in der Lage, nach Transfer die Nickel-Toleranz auch in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfängern zu induzieren (Nowak, pers. Kommunikation). Die Apoptoseinduktion durch NKT-Zellen kann dabei durch die Bestrahlung ersetzt werden. Dies deutet darauf hin, daß die Funktion von NKT-Zellen während der Toleranzinduktion gegen Nickel in der Induktion der Apoptose besteht.

Somit ergeben sich mehrere Fragen: 1. Welche Veränderungen bewirkt die Apoptose der B-Zellen? 2. Haben die von NKT-Zellen exprimierte Zytokine IL-4 und IL-10 eine Funktion bei der Apoptoseinduktion der B-Zellen? 3. Werden diese Zytokine eventuell von apoptotischen B-Zellen exprimiert? 4. Ist die Induktion der B-Zellapoptose die einzige Funktion der NKT-Zellen, oder spielen sie eine Rolle in einem späteren Schritt der Toleranzinduktion, der auf die Apoptoseinduktion folgt? Möglich wären hier Wechselwirkungen mit DZ des Empfängers, die entweder Zell-Zell-Kontakt erfordern, wie die Interaktion von CD1d mit dem invarianten TZR der NKT-Zelle, oder kontaktunabhängig sind, wie die Ausbildung einer spezifischen Mikroumgebung durch die Expression von IL-4 und IL-10. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob sich die Funktion der NKT-Zellen während der Toleranzinduktion auf die Apoptoseinduktion beschränkt.

3.6.2 Übertragung der Nickeltoleranz durch Transfer von "apoptotic bodies" apoptotischer B-Zellen toleranter Spender – Funktion der iNKT-Zellen bei der Induktionsphase der Ni-Toleranz

Ein Kennzeichen apoptotischer Zellen ist die Abschnürung von apoptotischen Vesikeln, den sogenannten "apoptotic bodies", die bisher nur wenig charakterisiert sind. Während über die Aufnahme apoptotischer Zellen Daten vorliegen (Witting, 2000; Chan, 2003), sind die Mechanismen der Aufnahme und Degradation kleiner apoptotischer Vesikel weitgehend unerforscht. Ob für dieses morphologisch verschiedene Material die gleichen Aufnahmemechanismen dienen, muß noch geklärt werden (Wiegand, 2001). Diese Vesikel enthalten apoptotisches Material der sterbenden Zellen, besitzen jedoch selber keine enzymatische Aktivität mehr (Stolzing, 2004). Sie werden durch rezeptorvermittelte Endozytose von phagozytierenden Zellen wie zum Beispiel Makrophagen aufgenommen und degradiert. Hierfür ist neben anderen Rezeptoren der "Scavenger receptor" CD36 erforderlich (Ren, 1995; Stolzing, 2004).

Möglicherweise stellt die Erkennung und Aufnahme dieser apoptotischen Vesikel das Signal für die tolerogene Präsentation von Antigen dar. Falls diese Hypothese zutrifft, sollte die Übertragung der Toleranz bereits durch den Transfer aufgereinigter "apoptotic bodies" alleine, ohne die Präsenz apoptotischer B-Zellen, möglich sein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Funktion der NKT-Zellen bei der Induktion der Toleranz gerichtet. Um zwischen den Effekten unterscheiden zu können, die durch die sterbenden B-Zellen bzw. die "apoptotic bodies" bewirkt werden, wurden in den folgenden Versuchen die "apoptotic bodies" von apoptotischen B-Zellen toleranter Spender präpariert und in Wildtyp- bzw. $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ Empfänger übertragen. Wenn die Funktion von NKT-Zellen bei der Toleranzinduktion in der Bereitstellung dieses Signals durch die Induktion der Apoptose besteht, müßten "apoptotic bodies" allein bereits ausreichend sein, um in Abwesenheit von NKT-Zellen Toleranz in $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ Empfängern zu induzieren (**Abb. 23**).

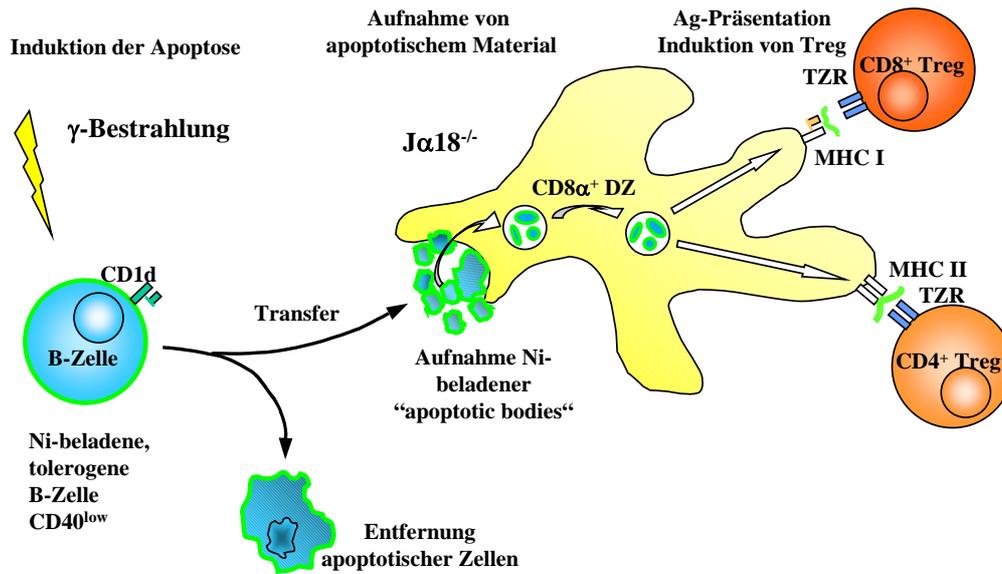


Abb. 23: Hypothese zur Induktion der Nickel-Toleranz durch "apoptotic bodies". Wenn die einzige Funktion von NKT-Zellen in der Induktion der Apoptose besteht, dann sollte der Transfer von apoptotischem Material ohne eigene physiologische Aktivität die Toleranz auf naive NKT-Zell-defiziente $J\alpha18^{-/-}$ Empfänger übertragen.

In einem Vorversuch erfolgte jedoch zunächst der Transfer der "apoptotic bodies" in WT-Empfänger, um festzustellen, ob diese Vesikel überhaupt das Potential zur Übertragung der Toleranz besitzen.

3.6.2.1 Transfer von "apoptotic bodies" toleranter Spender-B-Zellen in WT-Empfänger

Zunächst wurden Lymphozyten aus der Milz von toleranten und naiven WT-Spendern isoliert und B-Zellen durch Depletion von T-Zellen und DZ aufgereinigt. Die Apoptose wurde durch γ -Bestrahlung mit einer Dosis von 600 rad induziert. Anschließend wurden die "apoptotic bodies" dieser Zellen durch verschiedene aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte präpariert. Der Erfolg der Isolation wurde durch Bestimmung der Proteinmenge in der Vesikelfraktion ermittelt. Anschließend wurden "apoptotic bodies" in einer Menge äquivalent zu 10^5 bzw. 10^3 B-Zellen adoptiv auf WT-Empfänger übertragen. Nach Sensibilisierung gegen Nickel und Auslösung der Zweitantwort wie bereits beschrieben, wurde die Induktion der Nickel-Toleranz durch die Messung der Ohrschwellung überprüft. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abb. 24** dargestellt.

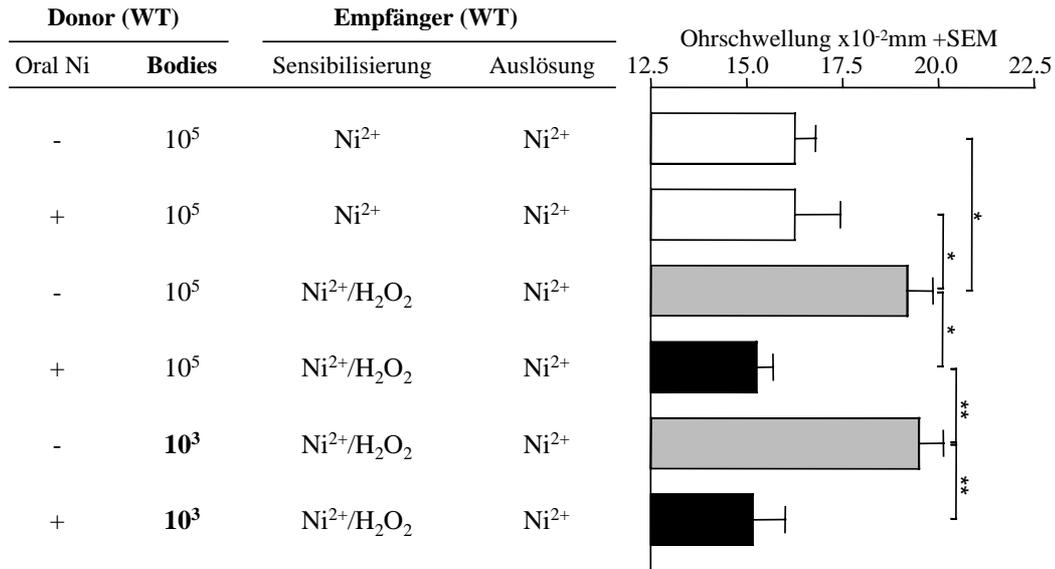


Abb. 24: Transfer der Toleranz durch "apoptotic bodies" toleranter B-Zellen. Nach Depletion von T-Zellen und DZ aus Milzzellen naiver und toleranter WT-Donor wird die Apoptose der B-Zellen durch γ -Bestrahlung mit einer Dosis von 600 rad ausgelöst. Die "apoptotic bodies" werden durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte präpariert, wie in Material und Methoden beschrieben. Der adoptive Transfer erfolgt durch i.v. Injektion von "apoptotic bodies" in einer Menge äquivalent zu 10⁵ bzw. 10³ B-Zellen auf naive WT-Empfänger. Nach Sensibilisierung durch Injektion von Ni²⁺ oder Ni²⁺/H₂O₂ und Auslösung der Zweitantwort mit Ni²⁺ in den Ohren erfolgt die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 + 2 dienen als Kontrolle, die Injektion von Ni²⁺ löst keine Sensibilisierung bei Empfängern von "apoptotic bodies" aus.

Die Beobachtungen zeigen, daß die Empfänger von "apoptotic bodies" nicht durch Injektion von Ni²⁺ zu sensibilisieren sind (Gr. 1 + 2, Sensibilisierungskontrolle). Stammen die übertragenen "apoptotic bodies" von naiven Spendern, kann durch adoptiven Transfer keine Toleranz übertragen werden, die Empfänger entwickeln nach Sensibilisierung und Auslösung der Zweitantwort eine erhöhte Ohrschwellung (Gr. 3 + 5). Werden die "apoptotic bodies" jedoch aus den B-Zellen toleranter Spender generiert, so können sie die Toleranz gegen Nickel analog zu den B-Zellen selbst auf naive WT-Empfänger übertragen, die Sensibilisierung dieser Tiere durch Ni²⁺/H₂O₂ ist nicht mehr möglich (Gr. 4 + 6). Bemerkenswert ist die geringe Menge der apoptotischen Vesikel, mit der die Übertragung der Toleranz möglich ist. Bereits "apoptotic bodies" in einer Menge, die äquivalent zu 10⁵ (Gr. 4) und sogar nur 10³ B-Zellen ist (Gr. 6), können die Toleranz auf naive Empfänger übertragen. Dabei entspricht dies einer für die Präparation der Vesikel eingesetzten Zahl von 10³ B-Zellen, die tatsächlich übertragene Materialmenge liegt durch Verluste während der Präparation wahrscheinlich noch darunter. Dieses Resultat verdeutlicht, daß "apoptotic bodies" ein sehr potentes Material zur Übertragung der Toleranz darstellen. Da es sich hierbei um einen Zell-freien Transfer gehandelt hat, kann ein aktiver Einfluß von übertragenen B-Zellen oder apoptotischen B-Zellen bei der Induktion der Toleranz ausgeschlossen werden.

In diesem Experiment konnte die Funktion der NKT-Zellen als Auslöser der Apoptose durch Bestrahlung der B-Zellen ersetzt werden, eine aktive Rolle der B-Zellen konnte durch die Verwendung von "apoptotic bodies" für den Transfer ausgeschlossen werden, da diese keine Stoffwechselaktivität mehr besitzen. Es stellt sich somit die Frage, ob die NKT-Zellen weitere Funktionen bei der Induktion der Toleranz im Empfänger haben, abgesehen von der Induktion der B-Zell-Apoptose. Diese Fragestellung wird im nächsten Experiment durch den Transfer von "apoptotic bodies" in NKT-Zell-defiziente Empfänger des Stammes J α 18^{-/-} untersucht.

3.6.2.2 Transfer von "apoptotic bodies" in iNKT-Zell-defiziente Empfänger

In diesem Experiment wurden zunächst analog zu 3.6.2.1 Lymphozyten aus der Milz von toleranten und naiven WT-Spendern isoliert und B-Zellen durch Depletion von T-Zellen und DZ aufgereinigt. Nach Induktion der Apoptose durch γ -Bestrahlung wurden die "apoptotic bodies" dieser Zellen durch verschiedene aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte präpariert. Anschließend wurden "apoptotic bodies" in einer Menge äquivalent zu 10^3 B-Zellen adoptiv auf naive $J\alpha 18^{-/-}$ oder WT-Empfänger übertragen. Nach Sensibilisierung gegen Nickel und Auslösung der Zweitantwort wie bereits beschrieben, wurde die Induktion der Nickel-Toleranz durch die Messung der Ohrschwellung überprüft. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abb. 25** dargestellt.

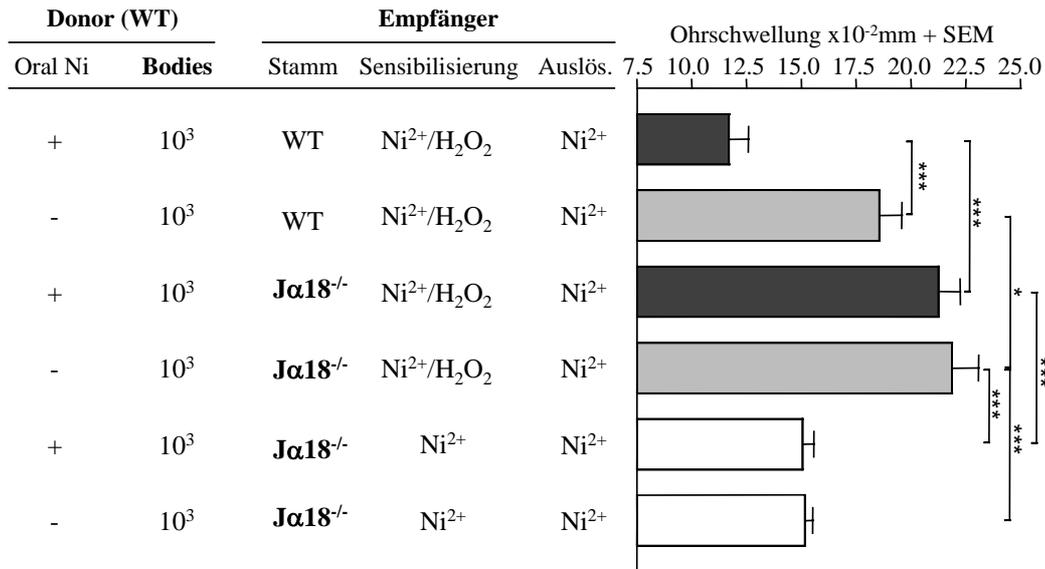


Abb. 25: Der Transfer der Toleranz durch "apoptotic bodies" toleranter B-Zellen erfordert NKT-Zellen des Empfängers. Nach Depletion von T-Zellen und DZ aus Milzzellen naiver und toleranter WT-Spender wird die Apoptose der B-Zellen durch γ -Bestrahlung mit einer Dosis von 600 rad ausgelöst. Die "apoptotic bodies" werden durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte präpariert, wie in Material und Methoden beschrieben. Der adoptive Transfer erfolgt durch i.v. Injektion von "apoptotic bodies" in einer Menge äquivalent zu 10^3 B-Zellen auf naive WT- oder $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger. Nach Sensibilisierung durch Injektion von Ni²⁺ oder Ni²⁺/H₂O₂ und Auslösung einer Zweitantwort mit Ni²⁺ in den Ohren erfolgt die Messung der Ohrschwellung. Die Gruppen 1 + 2 dienen als Toleranzkontrolle, sie zeigen, daß die "apoptotic bodies" Toleranz auf WT-Empfänger übertragen können, die Gruppen 5 + 6 dienen als Sensibilisierungskontrolle, um auszuschließen, daß bereits die Injektion von Ni²⁺ alleine die Sensibilisierung der $J\alpha 18^{-/-}$ Mäuse auslöst.

Die Daten in **Abb. 25** zeigen eindeutig, daß für den Transfer der Nickel-Toleranz durch "apoptotic bodies" toleranter Spender die Mitwirkung von NKT-Zellen im Empfänger erforderlich ist. Während sich die Toleranz durch "apoptotic Bodies" toleranter Spender auf naive WT-Empfänger übertragen läßt (Gr. 1), hat der Transfer auf naive NKT-Zell-defiziente Empfänger des $J\alpha 18^{-/-}$ Stammes keine Induktion der Toleranz zur Folge (Gr. 3). Der einzige Unterschied zwischen diesen Stämmen besteht in der Anwesenheit von NKT-Zellen. Stammen die "apoptotic bodies" von unbehandelten Empfängern, wird ebenfalls keine Toleranz übertragen, weder in WT- noch in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger (Gr. 2 + 4). Die Gruppen 5 + 6 dienen als Sensibilisierungskontrolle, sie zeigen, daß die Empfänger von "apoptotic bodies" nicht durch Ni²⁺ sensibilisiert werden können.

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß sich die Funktion von NKT-Zellen während der Toleranzinduktion gegen Nickel nicht nur auf die Induktion der Apoptose von B-Zellen bzw. APZ beschränkt, sondern noch darüber hinausgeht. Denkbar wäre hier eine Interaktion mit den DZ, denn auch DZ exprimieren CD1d, das Antigen-präsentierende Molekül, für das der invariante TZR der NKT-Zellen restriktiv ist. Dies könnte zur Aktivierung der NKT-Zellen und zur Expression der Zytokine IL-4 und IL-10 führen, die zur Ausbildung einer spezifischen tolerogenen Mikroumgebung mit der DZ führen. Selbst die Expression von IFN- γ könnte hierbei eine Rolle spielen, obwohl die

Expression dieses Zytokins durch die NKT-Zellen von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) ausgeschlossen wurde. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß von Roelofs-Haarhuis *et al.* gesamte APZ übertragen wurden, also auch DZ und Makrophagen, die selber in der Lage sind, bei Stimulation IFN- γ zu produzieren. Im vorliegenden Experiment wurden jedoch keine Zellen übertragen, die Produktion von Zytokinen durch andere Zellen des Spenders kann somit vollständig ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die Expression von IFN- γ durch NKT-Zellen doch erforderlich, wenn keine andere Quelle für dieses Zytokin vorhanden ist. Dafür spricht die Tatsache, daß dieses Zytokin von NKT-Zellen in großen Mengen produziert wird, wenn sie durch ihren invarianten TZR aktiviert werden. Eine mögliche Erklärung für die Funktion von IFN- γ könnte in der Induktion vonIDO liegen. Möglich wäre auch, daß NKT-Zellen für die Apoptoseinduktion weiterer Zellen verantwortlich sind. Dies kann in diesem System durch den Kotransfer von "apoptotic bodies" zusammen mit verschiedenen Gen-defizienten NKT-Zellen in NKT-Zell-defiziente Empfänger weiter untersucht werden.

Das vorliegende Experiment impliziert jedoch auch noch eine Funktion für die Körper der sterbenden B-Zellen, da der Transfer von apoptotischen B-Zellen toleranter Spender die Toleranz auf J α 18^{-/-} Empfänger zu übertragen vermag (Nowak, pers. Kommunikation). Dieses Inokulat beinhaltet zusätzlich zu den "apoptotic bodies" auch apoptotische B-Zellen, also geht die Induktion der Toleranz in diesem Fall wohl auf die sterbenden B-Zellen selbst zurück.

3.7 PM als Adjuvant

Die Sensibilisierung von konventionell gehaltenen Mäusen gegen Nickel erfordert die Verwendung eines Adjuvans, in dem hier vorgestellten Modell wird zu diesem Zweck H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, daß auch Staubpartikel, die in der Umwelt vorkommen, eine Adjuvansfunktion ausüben können. Dazu gehören zum Beispiel auch Dieselrußpartikel, wie sie in den Abgasen von Dieselfahrzeugen in großer Menge vorkommen. Die Adjuvansfunktion zeigt sich in der Expression von Zytokinen durch Zellen des respiratorischen Traktes, aber auch durch Lymphozyten, zum Beispiel Zellen der drainierenden Lymphknoten, bei subkutaner Applikation der Stäube. Die Aufgabe im zweiten Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines In-vivo-Assays zur Evaluierung des Gefahrenpotentials verschiedener in der Umwelt gesammelter Stäube. Eine Methode zur Abschätzung des Gefahrenpotentials besteht in der intratrachealen Instillation der Stäube, gefolgt von der sogenannten broncheo-alveolären Lavage. Die so erhaltenen Zellen des respiratorischen Traktes werden anschließend auf ihre Zytokinexpression hin untersucht. Anhand der Art des exprimierten Zytokinprofils wird auf die biologische Wirkung des verwendeten Staubes geschlossen, die Expression eines Th1-gerichteten Zytokinprofils hat die Auslösung von Entzündungsreaktionen in den Atemwegen zur Folge, während die Auslösung eines Th2-gerichteten Profils eher die Entstehung allergischer Reaktionen der Atemwege, wie Asthma, begünstigt. Diese Methode ist jedoch kompliziert und erfordert einen hohen finanziellen und personellen Aufwand. Daher sollte eine einfach durchzuführende Alternative etabliert werden, die in kurzer Zeit und mit relativ geringem Aufwand eine Risikoabschätzung verschiedener Stäube *in vivo* ermöglicht. Hier bietet sich die Verwendung des PLN-Assays an. Bisher wurde die Zytokinexpression der Zellen aus den PLN nur mittels ELISA untersucht. Dabei ist aber immer nur die Untersuchung weniger Zytokine in einem Experiment möglich. Aus diesem Grund wurde die durchflußzytometrische Untersuchung der Zytokinexpression von PLN-Zellen für eine umfangreiche Anzahl von Zytokinen etabliert.

Eine weitere Aufgabe im Zusammenhang mit Stäuben bestand darin, eine mögliche Adjuvansfunktion bei der Sensibilisierung gegen Nickel zu untersuchen. Es existieren viele Hinweise darauf, daß die Exposition mit hohen Mengen Dieselruß beispielsweise die gesteigerte Sensibilisierung gegen alltägliche Allergene zur Folge hat (Ishizaki, 1987). Diese Sensibilisierung wird begleitet von einem Th2-orientierten Zytokinprofil, erhöhten IgE-Titern im Blut und verstärkten Entzündungen der Atemwege bei Mäusen (Takano, 1997; Muranaka, 1986; Fujimaki, 1994 und 1997) und beim Menschen (Diaz-Sanchez, 1997a). Auch die Sensibilisierung gegen neue Antigene ist durch

Koexposition mit Dieselruß über die Mukosa möglich (Diaz-Sanchez, 1999). Diese experimentellen Beobachtungen bestätigen die Hinweise aus epidemiologischen Studien, die eine erhöhte Gefahr der Sensibilisierung bei Exposition mit Umwelstäuben andeuten (van Vliet, 1997). Dazu kommt die Eigenschaft, daß Stäube aus der Umwelt eine ganze Reihe von Schwermetallen, und darunter auch Nickel, auf ihrer Oberfläche tragen (Dreher, 1997; Lambert, 2000). Somit sind alle Voraussetzungen für eine mögliche Sensibilisierung gegen Nickel erfüllt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden eine ganze Reihe von Stäuben, sowohl natürliche als auch kommerziell erhältliche, auf ihre Fähigkeit zur Sensibilisierung gegen Nickel untersucht. Dazu wurde das beschriebene Mausmodell der Nickelallergie eingesetzt.

3.7.1 Vergleich verschiedener Filtermaterialien

In den Experimenten zur Untersuchung des Adjuvanspotentials von Partikeln und ihrer Auswirkung auf die lokale Expression von Zytokinen, war auch die Verwendung von in der Umwelt gesammelten Stäuben vorgesehen. Die Sammlung von Stäuben definierter Größe erfolgt durch schrittweise Filterung der Luft durch Filter mit bestimmten Porengrößen. Die zur Verfügung stehenden Proben waren jedoch auf Filtern aus unterschiedlichen Materialien gesammelt worden. Als Filtermaterial waren Nitrozellulose, Teflon und Polyurethanschaum zum Einsatz gekommen. Da die Partikelsuspensionen zur Verwendung im PLN-Assay, also zur Injektion in die Fußsohlen der Versuchstiere vorgesehen waren, mußte zuerst die jeweilige Hintergrundreaktion, die möglicherweise durch das Material des Filters hervorgerufen werden kann, ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Extrakte injiziert, die aus unbenutzten Filtern hergestellt worden waren, und die resultierende Reaktion in den poplitealen Lymphknoten ermittelt (**Abb. 26**).

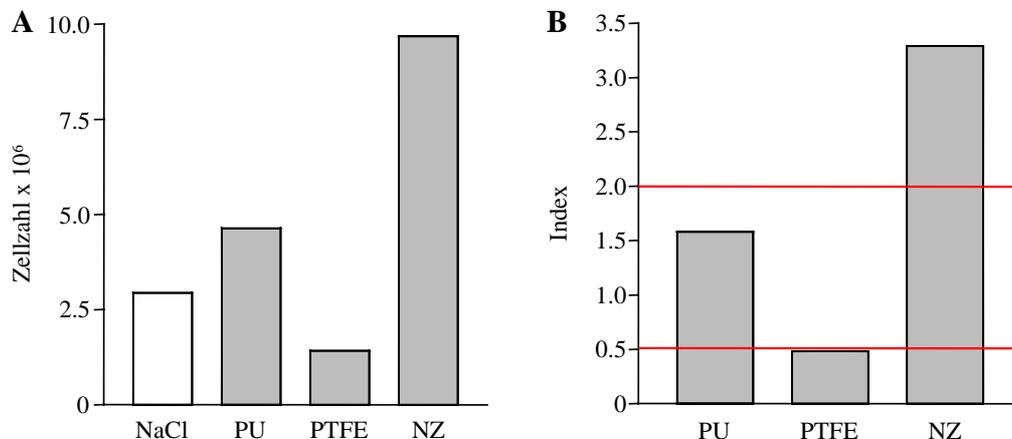


Abb. 26: Verschiedene Filtermaterialien haben unterschiedliche Effekte im PLN-Assay. Für den Vergleich wurden Extrakte unbenutzter Filter aus Polyurethanschaum (PU), Teflon (PTFE) und Nitrozellulose (NZ) in die Fußsohlen von Mäusen injiziert und nach 7 Tagen die Zellzahlen in den drainierenden poplitealen Lymphknoten (PLN) ermittelt. Zur Kontrolle wurde eine weitere Gruppe mit 0,9% NaCl injiziert und ebenfalls die Zellzahlen in den PLN ermittelt. Die Graphen repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Mäusen (A). Der Index gibt den Faktor wieder, um den sich die Zellzahl nach Injektion mit dem jeweiligen Filterextrakt verändert, bezogen auf die Zellzahl nach Injektion von NaCl, er repräsentiert den Quotient der Zellzahlen der experimentellen Gruppe und der NaCl-injizierten Kontrollgruppe (B). Die roten Linien repräsentieren jeweils die 2-fache Veränderung der Zellzahl im Vergleich zur NaCl-behandelten Gruppe.

Abbildung 26A zeigt die ermittelten Zellzahlen in den PLN 7 Tage nach der Injektion. Die Zellzahl in den PLN nach Injektion einer sterilen physiologischen NaCl-Lösung, die ebenfalls zur Herstellung der Filterextrakte verwendet wurde und auch zur Resuspension der später verwendeten Partikel diente, zeigt **Abb. 26A**, Gr. 1 (NaCl). Diese Gruppe bildet den Bezugswert für die Beurteilung der Eignung der Filtermaterialien. Die Injektion des Filterextraktes, der aus dem Polyurethanfilter hergestellt wurde, bewirkt eine Zunahme der Zellzahl (**26A**, Gr. 2) um den Faktor 1,58 (**26B**, Gr. 1). Bei Injektion des Extraktes aus dem Teflonfilter ist die Anzahl der PLN-Zellen deutlich reduziert (**Abb. 26A**, Gr. 3),

die Abnahme ist größer als 2-fach (**Abb. 26B**, Gr. 2). Eine deutliche Zunahme der Zellzahl auf mehr als das 3-fache ist nach Injektion des NZ-Filterextraktes zu beobachten (**Abb. 26A**, Gr. 4; **Abb. 26B**, Gr. 3), offensichtlich bewirkt dieses Filtermaterial selbst einen deutliche Antwort im PLN-Assay. In der Literatur existieren Hinweise darauf, daß durch mechanische Bearbeitung dieses Materials, wozu bereits das Zurechtschneiden auf eine vergleichbare Fläche zählt, Partikel entstehen, die von Zellen wie Makrophagen aufgenommen werden können und diese zur Aktivierung von T-Zellen befähigen. In älteren Arbeiten von Prof. Gleichmanns Arbeitsgruppe wurden mit Protein beladene Nitrozellulose-Partikel sogar zur Aktivierung spezifischer T-Zellhybridome verwendet (Kubicka-Muranyi, 1995). Im direkten Vergleich der verschiedenen Filter zeigte sich, daß sowohl Filter aus Nitrozellulose als auch Filter aus Teflon eine mehr als 2-fache Änderung der Zellzahlen in den PLN zur Folge haben. Die geringste Beeinträchtigung der Zellzahlen stellte sich mit dem Filter aus PU ein. Aus diesem Grund wurden in den weiteren Experimenten ausschließlich Stäube eingesetzt, die auf PU-Filtern gesammelt wurden, um bei der Etablierung des Systems den Einfluß des Filtermaterials so gering wie möglich zu halten.

3.7.2 Etablierung von Modellstaub SRM 1648

Ein stets aktuelles Problem bei der Untersuchung von Umweltstäuben besteht in der Limitierung ihrer Menge. Selbst wenn zwei Stäube am selben Ort, aber zu unterschiedlichen Zeiten gesammelt wurden, sind sie nicht mehr äquivalent, sie unterscheiden sich bereits in ihrer Zusammensetzung und somit auch in ihren Eigenschaften. Dafür reicht bereits das Sammeln zu unterschiedlichen Tageszeiten. Dies ist verständlich, beachtet man tageszeitliche Unterschiede in der Schadstoff- und Partikelemission, bedingt durch Hauptverkehrszeiten im Straßenverkehr beispielsweise. Noch gravierender sind die Unterschiede, wenn die Sammlung zu unterschiedlichen Jahreszeiten erfolgt. Proben, die im Winter gesammelt werden, sind gekennzeichnet durch erhöhte Emissionen, die durch das Heizen von Privathaushalten entstehen, während Proben aus dem Sommer erhöhte Anteile von Pollen aufweisen. Für die Etablierung eines In-vivo-Assays zur Untersuchung des Gefahrenpotentials von Stäuben sind zunächst zahlreiche Wiederholungen erforderlich, zudem wird eine unveränderliche Referenzgruppe benötigt, die zum Vergleich stets im Experiment enthalten ist. Zu diesem Zweck wurde ein kommerziell in entsprechenden Mengen erhältlicher Staub sowohl im PLN-Assay als auch in der Durchflußzytometrie mit einem in der Umwelt gesammelten Staub verglichen.

3.7.2.1 Vergleich des kommerziell erhältlichen Staubes SRM1648 mit einem gesammelten PM₁₀ im PLN-Assay

In diesem Experiment wurde der kommerziell erhältliche Staub mit der Bezeichnung SRM1648 mit einem PM₁₀ verglichen, welches in der Umwelt auf einem Filter aus Polyurethan gesammelt wurde. Zu diesem Zweck wurden den für diesen Versuch verwendeten Tieren gleiche Mengen PM₁₀ und SRM1648 in die Hinterpfoten injiziert. Nach 3 bzw. nach 7 Tagen wurden die PLN präpariert und die Zellzahlen ermittelt. Die Indizes der Zellzahlen wurden in Abwandlung des normalen PLN-Assays durch Bildung des Quotienten aus der Zellzahl der mit Staub injizierten Versuchsgruppen und der Zellzahl der nur mit NaCl-injizierten Gruppe errechnet (**Abb. 27**).

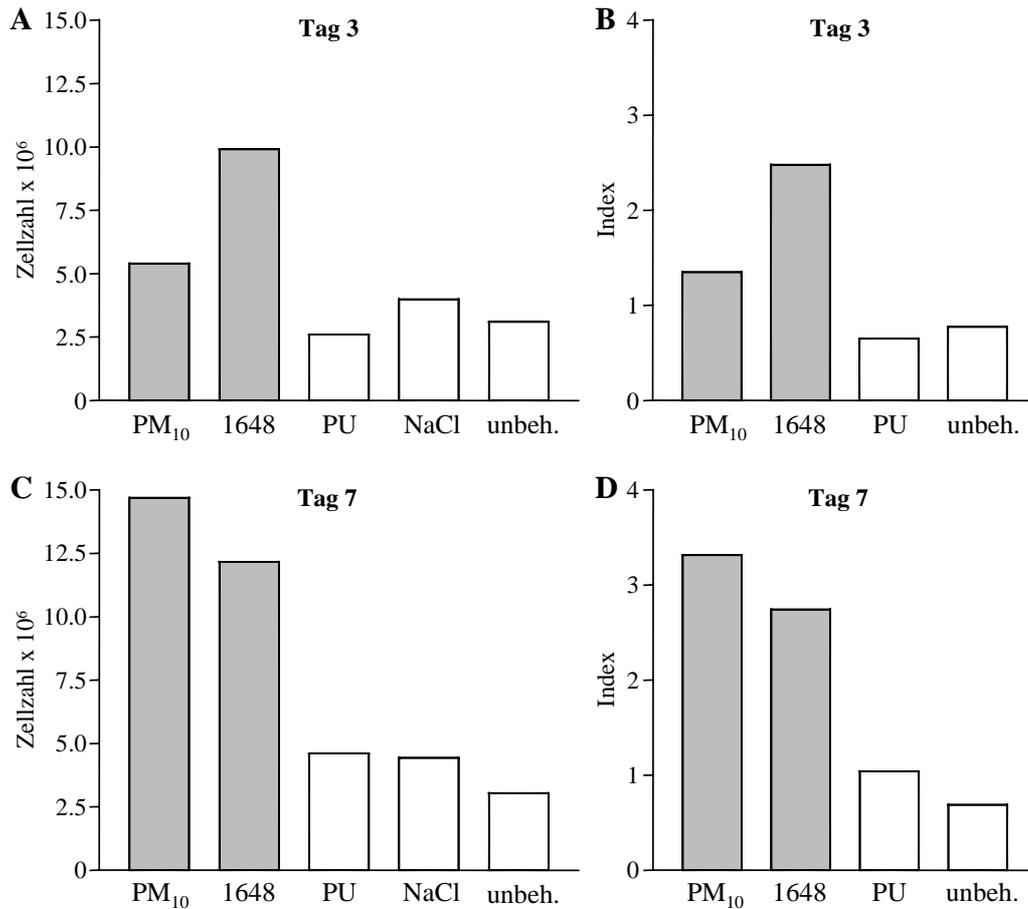


Abb. 27: Vergleich des kommerziell erhältlichen Modellstaubes SRM1648 mit einem in der Umwelt gesammelten PM₁₀ im PLN-Assay. **A)** Die Zellzahlen in den PLN wurden 3 Tage nach Injektion von 50 µl Staubsuspension (3 mg/ml in NaCl) in beide Fußsohlen ermittelt (PM₁₀). Zum Vergleich der Eigenschaften wurde ein identisches Volumen einer SRM1648-Suspension der gleichen Konzentration injiziert (1648). Als Filterkontrolle diente der Extrakt eines unbenutzten Polyurethanfilters (PU), eine weitere experimentelle Gruppe erhielt Injektionen einer physiologischen NaCl-Lösung. Als Vergleichsbasis diente die Zellzahl in den PLN von unbehandelten Tieren. **B)** Index der Zellzahlen in den PLN an Tag 3 nach Injektion, errechnet als Quotient aus Zellzahl in den PLN der experimentellen Gruppen und der NaCl-behandelten Gruppe. **C)** Zellzahlen in den PLN an Tag 7 nach Injektion. **D)** Index der Zellzahlen in den PLN an Tag 7 nach Injektion. PM₁₀ wurde freundlicherweise von F. Cassee, RIVM Bilthoven, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

Dieses Experiment zeigt, daß sowohl der gesammelte PM₁₀ als auch der kommerziell erhältliche Staub eine vergleichbare Erhöhung der Zellzahlen in den PLN bewirken (**Abb. 27C**, Gr. 1 + 2). Allerdings unterscheiden sich die verwendeten Stäube hinsichtlich ihrer Kinetiken, der PM₁₀ erreicht sein Maximum erst nach 7 Tagen (**Abb. 27C**, Gr. 1), während SRM1648 das Maximum der Zellzahl bereits an Tag 3 annähernd erreicht hat (**Abb. 27A**, Gr. 2) und die Zellzahl in den folgenden 4 Tagen nur noch geringfügig zunimmt (**Abb. 27C**, Gr. 2). Eine nur geringfügige Zunahme der Zellzahl ist in den PLN der PU-behandelten Gruppe zu beobachten, die Steigerung der Zellzahl von Tag 3 (**Abb. 27A**, Gr. 3) zu Tag 7 (**Abb. 27C**, Gr.3) ist nur gering. Keine Veränderung erfahren die Zellzahlen in den PLN der mit NaCl behandelten (**Abb. 27A + C**, Gr. 4) und der unbehandelten Gruppe (**Abb. 27A + C**, Gr. 5), wobei die Zellzahl in den PLN der unbehandelten Tiere an beiden Tagen geringfügig unter der der NaCl-Gruppe liegt. Das zeigt, daß selbst die Injektion von NaCl eine geringe Zunahme der Zellzahl auslöst. Bestätigt werden die hinsichtlich der Zellzahlen gemachten Beobachtungen durch die errechneten Indizes, die die ermittelte Zellzahl in Relation zur NaCl-Kontrollgruppe setzen. An Tag 3 nach der Injektion ist der Index der PM₁₀-behandelten Gruppe nur wenig größer als 1, das bedeutet, das die Zellzahl nicht viel höher als die in den PLN der NaCl-behandelten Gruppe war (**Abb. 27B**, Gr. 1), während der Index der SRM1648-behandelten Gruppe mit einem Wert von etwa 2,5 zeigt,

daß die Zellzahl mehr als doppelt so hoch war wie die der NaCl-Gruppe (Abb. 27B, Gr. 2). Bis Tag 7 hat der Index der PM₁₀-Gruppe deutlich zugelegt und erreicht einen Wert von mehr als 3 (Abb. 27D, Gr. 1), während sich der Index der SRM1648-behandelten Gruppe nicht mehr erwähnenswert verändert hat (Abb. 27D, Gr. 2). Dies bestätigt die unterschiedlichen Kinetiken der verwendeten Stäube. Im Gegensatz dazu verändern sich die Indizes der PU-behandelten und der unbehandelten Gruppe nur geringfügig (Abb. 27B + D, Gr. 3) bzw. gar nicht (Abb. 27B + D, Gr. 4). Diese Beobachtung zeigt, daß das Material des Filters keinen Einfluß auf die beschriebenen Veränderungen der Zellzahl in diesem Experiment hatte.

3.7.2.2 Vergleich der Zytokinprofile nach Injektion von PM₁₀ und Modellstaub SRM1648

Wie zuvor beschrieben bewirkt sowohl die Injektion des PM₁₀ als auch die Injektion des Modellstaubes SRM1648 in die Fußsohlen von Mäusen vergleichbare Zunahmen der Zellzahl in den PLN, die sich lediglich hinsichtlich ihrer Kinetik unterscheiden. Im folgenden Experiment wird untersucht, inwiefern sich die durch die beiden Stäube hervorgerufenen Primärreaktionen qualitativ unterscheiden. Gegenstand der Untersuchung ist das resultierende Zytokinprofil in den PLN. Anhand der exprimierten Zytokine wird eine Beurteilung des Reaktionstyps vorgenommen. Dabei wird zwischen einer Reaktion des Th1- oder des Th2-Typs unterschieden. Zu diesem Zweck wurden den Versuchstieren Suspensionen von PM₁₀ oder SRM1648 in gleicher Konzentration in die Sohlen beider Hinterpfoten injiziert. Als Kontrollgruppen dienten Tiere, denen der Extrakt eines unbenutzten PU-Filters bzw. eine physiologische NaCl-Lösung injiziert wurde. Eine weitere Versuchsgruppe blieb unbehandelt, diese Tiere erhielten keine Injektion. Die Extraktion der PLN erfolgte an Tag 7 nach der Behandlung. Die ermittelten Zellzahlen und die zugehörigen Indizes (Daten nicht gezeigt) waren mit den in Abb. 28 gezeigten Daten vergleichbar. Anschließend wurden die PLN-Zellen gruppenweise vereinigt und jeweils 2×10^5 Zellen intrazellulär mit Fluorochrom-gekoppelten Zytokin-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Anteile Zytokin-exprimierender Zellen wurden durchflußzytometrisch bestimmt (Abb. 28).

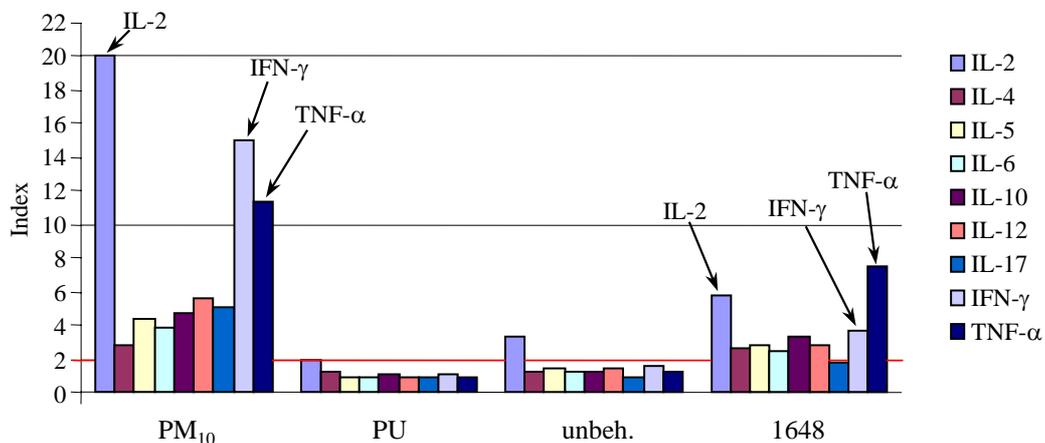


Abb. 28: Vergleich der Zytokinexpression in den PLN 7 Tage nach Injektion von PM₁₀ und SRM1648.

Die Versuchstiere erhielten jeweils eine Injektion von 150 μ g des angegebenen Staubes in 50 μ l physiologischer NaCl-Lösung in jede Hinterpfote, jede Versuchsgruppe bestand aus 3 Tieren. Die Tiere der PU-Gruppe erhielten jeweils 50 μ l des Extraktes eines unbenutzten Filters in NaCl in jede Hinterpfote, Tiere der unbehandelten Gruppe erhielten keine Injektion. Nach 7 Tagen wurden die PLN präpariert und die Zellzahlen sowie die zugehörigen Indizes bestimmt (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis war mit den in Abb. 28 dargestellten Daten vergleichbar. Danach wurden die PLN-Zellen gruppenweise vereinigt und jeweils 2×10^5 Zellen einer intrazellulären Färbung mit Zytokin-spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für eines der aufgeführten Zytokine unterzogen. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte mit einem FACScalibur, Becton Dickinson. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software von Becton Dickinson. Die dargestellten Indizes der Zytokinexpression wurden durch Bildung des Quotienten aus der Zahl Zytokin-exprimierender Zellen in den experimentellen Gruppen und der NaCl-Kontrollgruppe errechnet.

Das Ergebnis dieser Messung demonstriert die Expression eines ähnlichen Zytokinprofils nach Injektion von PM₁₀ oder SRM1648. Die PLN der mit PM₁₀ injizierten Gruppe (**Abb. 28, PM₁₀**) weisen stark erhöhte Anteile von Zellen auf, die durch die Expression der Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α gekennzeichnet sind. Die Zahl der IL-2-exprimierenden Zellen ist etwa 20-fach höher als in den PLN der NaCl-injizierten Kontrollgruppe. Die Expression von IFN- γ ist etwa 15-fach höher, die Zahl TNF- α -exprimierender Zellen ist 11-fach erhöht. Allerdings ist auch die Expression der übrigen hier untersuchten Zytokine etwa 3- bis 6-fach erhöht, dies gilt sowohl für Zytokine des Th1-Typs, wie IL-6, IL-12 und IL-17, als auch für die Zytokine des Th2-Typs, wie IL-4, IL-5 sowie IL-10. Die starke Dominanz der Expression von IL-2, IFN- γ und TNF- α jedoch spricht für die Ausprägung eines Th1-Profiles nach Injektion des speziellen, hier untersuchten PM₁₀. Ähnlich verhält es sich nach Injektion von SRM1648 (**Abb. 28, 1648**), auch hier ist insbesondere die Expression von IL-2, IFN- γ und TNF- α erhöht. Allerdings ist die Zunahme der Zytokin-Expression nicht so ausgeprägt wie nach Injektion des PM₁₀, die Zahl der Zellen, die IL-2 exprimieren, ist ungefähr 6-fach erhöht, die Zahl der IFN- γ -exprimierenden Zellen etwa 4-fach, und die TNF- α -Expression ist 7,5-fach höher als in der NaCl-behandelten Kontrollgruppe. Außerdem ist nach Injektion von SRM1648 die Expression von TNF- α höher als die von IFN- γ , im Gegensatz zum Expressionsmuster nach Injektion von PM₁₀. Auch die Expression der übrigen Zytokine ist leicht erhöht, es ist jedoch übereinstimmend mit der Injektion von PM₁₀ keine besondere Tendenz zu erkennen. Obwohl die Zunahme der Zytokinexpression nach Injektion von SRM1648 deutlich schwächer ausfällt, ist die Übereinstimmung der am stärksten exprimierten Zytokine eindeutig. Auch die Injektion des Modellstaubes hat die Ausprägung eines Th1-Profiles zur Folge. Im Gegensatz dazu zeigen weder die mit dem Extrakt des unbenutzten Filters injizierten Tiere (**Abb. 28, PU**), noch die Tiere der unbehandelten Gruppe (**Abb. 28, unbeh.**) eine Veränderung in der Expression ihrer Zytokinprofile.

Eines der Hauptprobleme bei der Etablierung eines In-vivo-Untersuchungssystems für PM bestand bisher in der limitierten Verfügbarkeit von PM mit identischen Eigenschaften. Um die Höhe der Dosis und den richtigen Untersuchungszeitpunkt nach Applikation zu ermitteln, damit der Test für eine möglichst große Zahl verschiedener Stäube eingesetzt werden kann, sind umfangreiche Testreihen erforderlich. Die Ähnlichkeit der Zytokinprofile der mit Staub behandelten Gruppen in diesem Experiment zeigt, daß durch die Verwendung des kommerziell erhältlichen Staubes SRM1648 das Hauptproblem bei der Etablierung eines In-vivo-Systems zur Untersuchung von PM, die limitierte Verfügbarkeit, umgangen werden kann. Hier wurde zum ersten Mal ein gesammelter Staub direkt mit einem kommerziell erhältlichen Staub verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß die resultierenden Reaktionen vergleichbar sind, weshalb sich dieser Staub für die Etablierung eines In-vivo-Systems anbietet. Darüberhinaus ist dieser Staub dazu geeignet, die Grundlagen der durch PM ausgelösten Immunreaktionen zu untersuchen. Hier wurde ein Modell etabliert, das sich von den anderen durch einen frühen Endpunkt unterscheidet. Während alle anderen In-vivo-Modelle auf der Ausbildung eines Krankheitsbildes, wie einer Allergie oder einer anderen chronischen Schädigung der Atemwege, als Ausleseparameter basieren, welches sich erst nach längerer Zeit einstellt, ist hier eine Aussage über die Wirkung eines Staubes bereits nach 7 Tagen möglich. Hiermit besteht auch erstmals die Möglichkeit, eine größere Zahl gesammelter Stäube in kurzer Zeit auf ihre biologische Funktion hin anhand des von ihnen induzierten Zytokinprofils zu untersuchen.

Die Injektion von Staub repräsentiert zwar nicht die natürliche Route, über die PM normalerweise in den Organismus gelangt, im Gegensatz zur In-vitro-Untersuchung bietet diese Methode jedoch den Vorteil, daß alle Zellen des Immunsystems in den Lymphknoten vorhanden sind, während es sich bei den gebräuchlichen In-vitro-Kokulturen von PM mit verschiedenen Zelltypen nur um artifizielle Systeme handelt.

3.7.3 Adjuvansfunktion von PM bei der Induktion der Nickelallergie

Die Ergebnisse der PLN-Assays und die Untersuchung der Zytokinexpression zeigen eine stark erhöhte Zellzahl und die Ausprägung eines Th1-Zytokinprofils in den drainierenden PLN nach Injektion von PM in die Fußsohlen. Hier besteht eine auffällige Übereinstimmung mit der Situation bei der Sensibilisierung von Mäusen gegen Nickel. Bei Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ in die Flanke kommt es kurze Zeit nach der Injektion zur Zunahme der Zellzahl in den die Injektionsstelle drainierenden axillären Lymphknoten und zur Expression des Th1-Zytokins IFN- γ (vgl. Abb. 3 und 5). Das erweckt den Anschein, daß diese Parameter kennzeichnend und gleichzeitig notwendig für die Sensibilisierung sind. Für die Aufregulation der Kostimulation und die Ausbildung der Entzündungsreaktion bei der Auslösung der Nickelallergie ist das verwendete Adjuvans H_2O_2 verantwortlich. Somit stellt sich die Frage, ob die durch Staub ausgelöste Primärreaktion ebenfalls zur Sensibilisierung gegen Nickel führen kann, also ob PM die notwendige Adjuvansfunktion besitzt. Zu diesem Zweck wurden Mäusen analog zur Sensibilisierung mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ Kombinationen verschiedener Dosen von Stäuben und Nickelkonzentrationen in die Flanken injiziert, die Sensibilisierung gegen Nickel wurde durch die Kontrolle der Ohrschwellung nach Auslösung der Zweitantwort untersucht. Als PM wurden zum einen Carbon Black-Partikel verwendet, die den karbonösen Kern von PM ohne adsorbierte Metalle oder organische Verbindungen repräsentieren, zum anderen der bereits beschriebene kommerziell erhältliche Staub SRM1648. Die eingesetzten Nickelkonzentrationen umfaßten die übliche 10 mM Ni^{2+} -Lösung (Abb. 29) sowie eine 30 mM Ni^{2+} -Lösung (Abb. 30). Die dargestellten Daten entstammen demselben Experiment, wurden jedoch zur besseren Überschaubarkeit in zwei Abbildungen aufgeteilt. Die Meßwerte der NaCl-behandelten Gruppe sowie die Werte der CBP-behandelten Kontrollgruppen wurden in beiden Abbildungen zum besseren Vergleich mit den Daten der experimentellen Gruppen dargestellt. Es handelt sich hierbei um dieselben Werte.

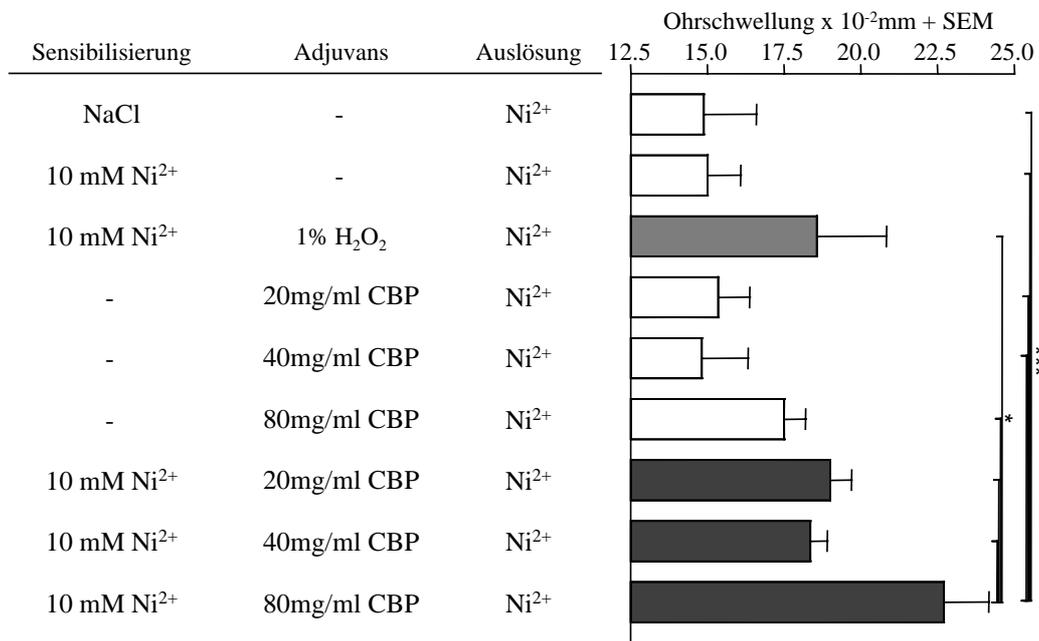


Abb. 29: Partikel als Adjuvans bei der Sensibilisierung gegen Nickel. C57BL6 WT-Mäuse erhielten eine Injektion von 50 μl physiologischer NaCl-Lösung oder 50 μl einer 10 mM Ni^{2+} -Lösung zur Sensibilisierung, entweder ohne Adjuvans, oder mit 1% H_2O_2 , oder unterschiedlichen Dosen CBP (Carbon Black Particles; Acetylene Carbon Black). Die Auslösung der Zweitantwort erfolgte durch Injektion von 50 μl einer 10 mM Ni^{2+} -Lösung in die Ohren, analog zu den vorangegangenen Experimenten. Gruppe 1 dient als Injektionskontrolle, Gruppe 2 als Sensibilisierungskontrolle, die zeigt, daß die Sensibilisierung ohne Adjuvans nicht möglich ist. Gruppe 3 dient als Positivkontrolle der Sensibilisierung gegen Nickel bei Verwendung eines Adjuvans (H_2O_2). Die Gruppen 4 - 6 sind Partikelkontrollen, sie zeigen, daß die Injektion von CBP alleine keine Sensibilisierung gegen Nickel bewirkt. Die experimentellen Gruppen 7 - 9 zeigen eine mögliche Sensibilisierung gegen Nickel bei Verwendung von Partikeln als Adjuvans, in Abhängigkeit von der Partikeldosis.

In **Abbildung 29** ist das Ergebnis der Sensibilisierung mit 10 mM Ni^{2+} in Verbindung mit verschiedenen Partikeldosen dargestellt. Tiere, die lediglich eine Injektion von NaCl in die Flanken erhalten haben, zeigen keine Ohrschwellung nach Injektion von Ni^{2+} in die Ohren (Gr. 1). Diese Kontrolle zeigt, daß das Auftreten der Ohrschwellung nicht durch die Injektion zur Auslösung der Zweitantwort hervorgerufen wird. Die Injektion einer Ni^{2+} -Lösung ohne Adjuvans hat ebenfalls keine Ohrschwellung zur Folge (Gr. 2), durch die Injektion von Ni^{2+} ohne Verwendung eines Adjuvans kommt es nicht zur Sensibilisierung. Wird jedoch H_2O_2 als Adjuvans zusammen mit Ni^{2+} injiziert, bewirkt dies die Sensibilisierung und die Auslösung der Zweitantwort bei erneuter Injektion (Gr. 3).

Bei Injektion von CBP-Suspensionen der Konzentrationen 20 mg/ml und 40 mg/ml ist keine erhöhte Ohrschwellung zu beobachten (Gr. 4 + 5), ohne Nickel kommt es nicht zur Sensibilisierung. Nicht ganz so eindeutig stellt sich die Situation nach Injektion der CBP-Suspension mit 80 mg/ml CBP dar, bei diesen Tieren ist die Ohrschwellung nach der Injektion von Ni^{2+} in die Ohren leicht erhöht (Gr. 6). Ob diese Beobachtung auf eine Sensibilisierung gegen Nickel, möglicherweise hervorgerufen durch eine Kontamination der Partikel mit Nickel, zurückzuführen ist, oder aber auf einen Zustand allgemein erhöhter Aktivierung des Immunsystems, hervorgerufen durch eine massive Entzündungsreaktion in Folge der sehr hohen Partikeldosis, ist aufgrund dieses Experimentes nicht zu entscheiden.

Wird zur Sensibilisierung eine 10mM Ni^{2+} -Lösung zusammen mit Partikeln der Konzentrationen 20 mg/ml und 40 mg/ml injiziert (Gr. 7 + 8), so liegt die resultierende Ohrschwellung auf einem ähnlichen Niveau wie das der mit H_2O_2 als Adjuvans sensibilisierten Tiere. Da die Ohrschwellung der mit $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sensibilisierten Tiere in diesem Experiment allerdings sehr niedrig im Vergleich zu früheren Experimenten war, ist es schwierig zu entscheiden, ob bei Verwendung der Partikel eine Sensibilisierung gegen Nickel vorliegt, oder ob dies der Effekt einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems infolge der Entzündungsreaktion ist. Werden die Tiere allerdings mit Ni^{2+} und einer Dosis von 80 mg/ml CBP sensibilisiert, kommt es zur deutlichen Ausbildung einer Ohrschwellung, der höchsten im Experiment (Gr. 9), bestätigt durch signifikante Unterschiede zu allen anderen Versuchsgruppen. Die Unterschiede zu den Gruppen 7 + 8 sind dabei geringer als die zu den negativen Kontrollgruppen. Dies spricht für einen Adjuvanseffekt von CBP bei der Sensibilisierung gegen Nickel, der von der Partikeldosis abhängig ist. Die bei Gruppe 6 beobachtete erhöhte Ohrschwellung ist demnach tatsächlich auf einen erhöhten Aktivierungszustand des Immunsystems zurückzuführen.

Es ist nicht bekannt, ob CBP im Vergleich zu H_2O_2 stärkere oder schwächere Adjuvanseigenschaften besitzen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob bei Verwendung von CBP als Adjuvans bei der Sensibilisierung gegen Nickel die möglicherweise schwächeren Adjuvanseigenschaften der Partikel durch die Verwendung einer höheren Nickeldosis ausgeglichen werden können. Dazu wurden die gleichen Mengen CBP, wie in Abb. 29 beschrieben, zusammen mit einer 30 mM Ni^{2+} -Lösung verabreicht, zusätzlich wurde der Adjuvanseffekt von SRM1648, welches erwiesenermaßen die Ausprägung eines Th1-Profiles in den drainierenden Lymphknoten zur Folge hat, bei der Sensibilisierung gegen Nickel getestet (**Abb. 30**).

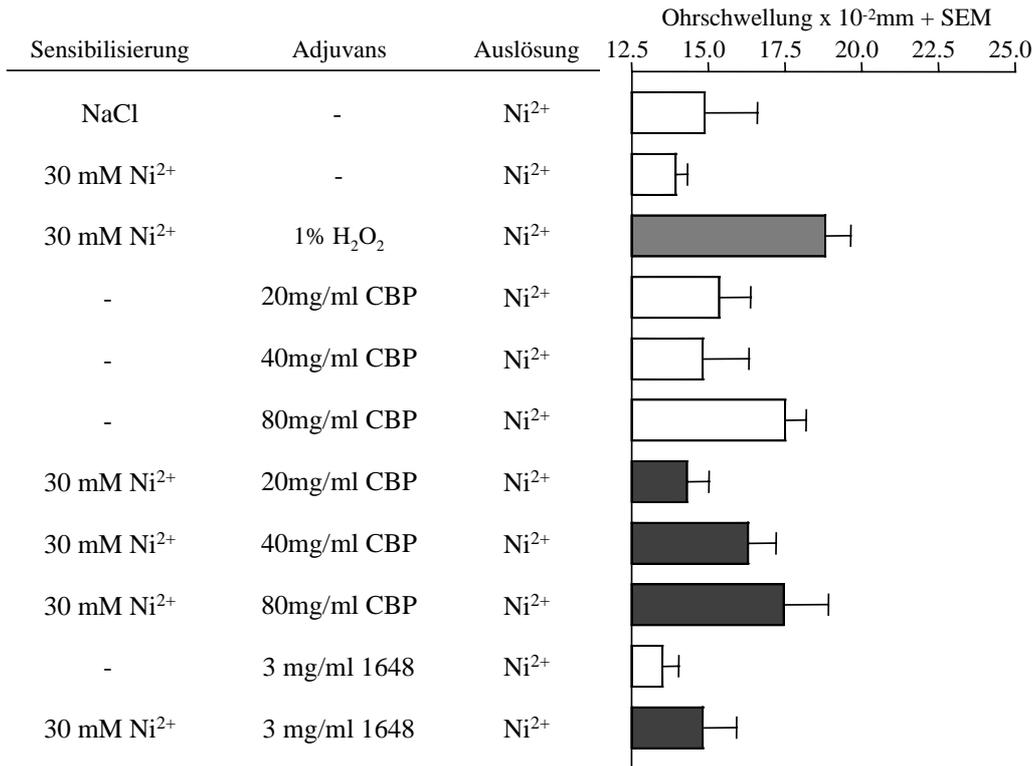


Abb. 30: Partikel als Adjuvans bei der Sensibilisierung gegen Nickel. C57BL6 WT-Mäuse erhielten eine Injektion von 50 µl physiologischer NaCl-Lösung oder 50 µl einer 30 mM Ni²⁺-Lösung zur Sensibilisierung, entweder ohne Adjuvans, oder mit 1% H₂O₂, oder unterschiedlichen Dosen CBP (Carbon Black Particles; Acetylene Carbon Black). Die Auslösung der Zweitantwort erfolgte durch Injektion von 50 µl einer 10 mM Ni²⁺-Lösung in die Ohren, analog zu den vorangegangenen Experimenten. Gruppe 1 diente als Injektionskontrolle, Gruppe 2 als Sensibilisierungskontrolle, die zeigt, daß die Sensibilisierung ohne Adjuvans nicht möglich ist. Gruppe 3 diente als Positivkontrolle der Sensibilisierung gegen Nickel bei Verwendung von H₂O₂ als Adjuvans. Die Gruppen 4 - 6 sind Partikelkontrollen, sie zeigen, daß die Injektion von CBP alleine keine Sensibilisierung gegen Nickel bewirkt. Die Daten der Gruppen 4 - 6 sind identisch mit denen in **Abb. 29**, es handelt sich hierbei um dasselbe Experiment, das wegen der besseren Überschaubarkeit in zwei Abbildungen aufgeteilt wurde. Aus diesem Grund werden diese Daten zu Vergleichszwecken erneut dargestellt. Die experimentellen Gruppen 7 - 9 zeigen eine mögliche Sensibilisierung gegen Nickel bei Verwendung von Partikeln als Adjuvans, in Abhängigkeit von der Partikeldosis, allerdings bei Verwendung einer höheren Ni²⁺-Konzentration (30 mM). Gruppe 10 erhielt eine Injektion des Modellstaubes SRM1648 (3 mg/ml), jedoch kein Nickel, um festzustellen, ob die Injektion dieses Staubes alleine bereits die Sensibilisierung gegen Nickel auslösen kann. Den Mäusen der Gruppe 11 wurde eine Injektion von 50 µl einer 30 mM Ni²⁺-Lösung zusammen mit SRM1648 als Adjuvans verabreicht.

Gruppe 1 wurde bereits in Abbildung 29 dargestellt, sie wurde zum Vergleich erneut in Abbildung 30 aufgenommen, ebenso die Versuchsgruppen, die nur CBP, jedoch kein Nickel zur Sensibilisierung erhalten haben (Gr. 4 – 6). Die Injektion von 30 mM Ni²⁺ in Verbindung mit H₂O₂ als Adjuvans bewirkt die Sensibilisierung der Tiere und hat bei Auslösung der Zweitantwort in den Ohren eine erhöhte Ohrschwellung zur Folge (Gr. 3). Die Stärke ist nahezu identisch mit der bei Verwendung von 10 mM Ni²⁺/H₂O₂ beobachteten Ohrschwellung (vgl. Gr. 3, Abb. 29), ist also ebenfalls im Vergleich mit vorangegangenen Experimenten sehr niedrig. Die durch Injektion von 80 mg/ml CBP ohne Ni²⁺ ausgelöste Ohrschwellung ist bereits ähnlich hoch (Gr. 6, vgl. Beschreibung zu Abb. 29). Werden ansteigende CBP-Dosen zusammen mit 30 mM Ni²⁺ zur Sensibilisierung verwendet, zeigen die Tiere eine parallel mit der Partikeldosis zunehmende Ohrschwellung (Gr. 7 - 9), wobei die höchste beobachtete Reaktion (Gr. 9) auf ähnlichem Niveau wie nach Verwendung von 80 mg/ml CBP ohne zusätzliches Ni²⁺ (Gr. 6), bzw. nach Sensibilisierung mit H₂O₂ als Adjuvans (Gr. 3) liegt. Da die Unterschiede zu den negativen Kontrollgruppen jedoch so gering sind, daß sie keinerlei Signifikanz aufweisen, ist es nicht möglich zu entscheiden, ob hier tatsächlich eine Sensibilisierung erfolgt ist. Die Injektion von 3mg/ml des kommerziellen Staubes SRM1648 alleine bewirkt keine Zunahme der Ohrschwellung (Gr. 10), und auch die gleichzeitige Injektion von SRM1648 zusammen mit einer 30

mM Ni²⁺-Lösung hat keine signifikante Zunahme der Ohrschwellung zur Folge (Gr. 11). Allerdings war die injizierte Menge dieses Staubes relativ gering, verglichen mit den verwendeten CBP-Dosen. Sie war mit den Mengen, die für die PLN-Assays injiziert wurden, identisch (vgl. Abb. 27 + 28). Möglicherweise ist der Adjuvanseffekt der verwendeten Menge für eine vollständige Sensibilisierung gegen Nickel zu gering. Aufschluß hierüber kann nur eine Wiederholung des Versuches mit einer höheren Dosis SRM1648 und möglicherweise einer geringeren Konzentration von Ni²⁺ geben.

Die mit zunehmender CBP-Dosis beobachtete gestaffelte Zunahme der Ohrschwellung erweckt den Eindruck, daß ähnlich wie bei Verwendung einer 10 mM Ni²⁺-Lösung in Abhängigkeit von der Partikelmenge eine Sensibilisierung erfolgt, die resultierende Ohrschwellung jedoch unterdrückt wird. Dies würde mit bisher unveröffentlichten Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Prof. Gleichmann übereinstimmen, die besagen, daß die Sensibilisierung gegen Nickel mit zunehmender Nickelkonzentration ebenfalls stärker wird, bis ab einer bestimmten Konzentration die resultierende Reaktion nachläßt und mit weiter steigender Nickelkonzentration irgendwann ganz ausbleibt. Nickel selbst scheint mit zunehmender Konzentration einen immunsuppressiven Effekt zu entwickeln. Die hier gemachten Beobachtungen könnten darauf zurückzuführen sein.

4 Diskussion

4.1 Der Mechanismus der Nickeltoleranz

4.1.1 Die Induktionsphase der Nickeltoleranz

In der vorliegenden Dissertation wurde die Induktionsphase der Nickeltoleranz an einem Mausmodell untersucht. In diesem Modell besteht die Möglichkeit, Mäuse durch die Injektion von Ni^{2+} zusammen mit dem endogenen Adjuvans H_2O_2 gegen Nickel zu sensibilisieren. Darüber hinaus ist es möglich, in den Tieren durch die orale Applikation von Nickel-haltigem Trinkwasser über einen Zeitraum von 4 Wochen Nickel-spezifische Toleranz zu induzieren. Diese Form der Toleranz ist dominant, sie ist durch den Transfer von sowohl T-Zellen als auch APZ, die neben DZ auch B-Zellen beinhalten, auf unbehandelte, naive WT-Empfänger übertragbar. Im Empfänger findet die Verbreitung der Toleranz durch einen Amplifikationsmechanismus statt, der die Übergabe der Toleranz von T-Zellen des Spenders an APZ, im speziellen DZ, des Empfängers, sowie von B-Zellen an T-Zellen des Empfängers unter Beteiligung der DZ umfaßt, und als infektiöse Toleranz bekannt ist (Roelofs-Haarhuis, 2003). Die Transfers zeigen, daß die Induktion der Toleranz mit der Bildung von Treg-Zellen sowie tolerogener B-Zellen einhergeht.

Die beim Transfer der Toleranz erfolgenden Vorgänge sind mit denen im oral tolerisierten Tier nach der Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ vergleichbar, die für die Verbreitung der Toleranz erforderlich ist. Durch den Transfer verschiedener Zelltypen konnte gezeigt werden, daß an der Entstehung der Toleranz unterschiedliche Zellsubpopulationen beteiligt sind, so unter anderen B-Zellen, T-Zellen sowie NKT-Zellen (Roelofs-Haarhuis, 2004). Bei Sensibilisierung mit Antigen erfolgt normalerweise der Transport des Antigens zu den drainierenden Lymphknoten der Injektions- oder Applikationsstelle, wo die Präsentation erfolgt und die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen stattfindet. In diesem Modell sind dies die axillären Lymphknoten. Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) haben gezeigt, daß die APZ der axillären Lymphknoten auf die Injektion von $\text{Ni}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ mit der Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 reagieren. Demzufolge sollte auch die Aktivierung von intravenös transferierten Zellen toleranter Spender in den axillären Lymphknoten erfolgen. Während alle Lymphozyten früher oder später durch einfachen Transport mit dem Blutstrom in die Milz gelangen, erfolgt die Migration in die Lymphknoten nicht zufällig. Für den Eintritt in die Lymphknoten ist die Expression spezieller Adhäsionsmoleküle erforderlich, die ihnen den Übergang aus den Venolen mit hohem Endothel in die Lymphknoten ermöglichen.

4.1.2 Aktivierung toleranter Zellen in den axillären Lymphknoten

Tatsächlich konnte durch den Transfer von CFSE-markierten Milzzellen gezeigt werden, daß die übertragenen Zellen sowohl in den Lymphknoten als auch der Milz anzutreffen sind. Obwohl gleiche Anzahlen sowohl naiver als auch toleranter Zellen übertragen wurden, ist die Zahl der Zellen toleranter Spender nach Sensibilisierung geringer als die der naiven Spenderzellen. Allerdings weisen die Zellen der toleranten Spender eine höhere CFSE-Fluoreszenz als ihre naiven Pendanten auf (Abb. 2). Dies reflektiert den anergischen Zustand der T-Zellen toleranter Spender und bestätigt die *In-vitro*-Daten von Artik *et al.* (2001), die belegen, daß die toleranten T-Zellen weder proliferieren noch IL-2 produzieren können, während die naiven Zellen nach Aktivierung stark proliferieren, was die Abnahme der Fluoreszenz im vorliegenden Experiment erklärt. Dies zeigt, daß tatsächlich die Aktivierung der transferierten Zellen erfolgt ist. Da für die Aktivierung die Expression kostimulatorischer Moleküle erforderlich ist, ist es sehr wahrscheinlich, daß dieser Prozeß in den axillären Lymphknoten erfolgt, da die Aufregulation der Kostimulation hier bereits demonstriert werden konnte (Roelofs-Haarhuis, 2003), während andere Lymphknoten nach der Sensibilisierung keine Veränderung aufweisen (Roelofs-Haarhuis, pers. Kommunikation). Zu beachten ist, daß in dem

dargestellten Experiment gesamte Milzzellen übertragen wurden. Unter den transferierten Zellen sind nicht nur T-Zellen, sondern auch B-Zellen. Die B-Zellen toleranter Spender befinden sich in einem prä-apoptotischen Zustand (Nowak, Dissertation). Somit bietet sich die Apoptose dieser B-Zellen als eine weitere mögliche Erklärung für die Reduzierung der Zellen toleranter Spender an.

4.1.3 Expression von IFN- γ während der Induktion der Toleranz

Da sich die Zellen naiver und toleranter Spender offensichtlich in ihren Reaktionen unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, daß sich diese Unterschiede außer in der Expression von IL-2 auch im Charakter der Expressionsprofile weiterer Zytokine äußern. Während der Sensibilisierung nach dem Transfer naiver Spenderzellen sollte sich ein Inflammations-orientiertes Zytokinprofil einstellen, welches gekennzeichnet ist durch die Expression von Zytokinen des Th1-Typs, wie IL-2, IFN- γ und TNF- α , während nach dem Transfer toleranter Spenderzellen ein eher Th2-gerichtetes Zytokinprofil zu erwarten ist, welches durch Zytokine wie IL-4, IL-10 oder TGF- β , die in anderen Toleranzmodellen wie Kolitis (Groux, 1997), IBD (Powrie, 1994) und ACAID (Sonoda, 2001) eine Rolle spielen, gekennzeichnet ist (Watanabe, 2002). Aus dieser Überlegung heraus wurde die Expression der Zytokine IFN- γ und IL-10 als typische Vertreter einer Th1- bzw. einer Th2-Antwort in den drainierenden axillären Lymphknoten und der Milz naiver und toleranter Tiere, sowie von Empfängern naiver oder toleranter Spenderzellen nach der Sensibilisierung untersucht.

In Anbetracht der Erwartung stellt sich das Ergebnis umso überraschender dar. In den axillären Lymphknoten toleranter Mäuse ist nur nach Sensibilisierung mit Nickel und Adjuvans eine geringfügig niedrigere Expression von IFN- γ zu verzeichnen, verglichen mit den Lymphknoten naiver Tiere. Dies bestätigt erneut, daß die Sensibilisierung der Mäuse erforderlich ist, um die Toleranz zu initiieren. Keinerlei Veränderung erfährt die Expression von IL-10, unabhängig vom Status oder der Sensibilisierung der Tiere. Noch deutlicher ist das Ergebnis nach dem Transfer toleranter oder naiver Spenderzellen. In den axillären Lymphknoten der Empfänger toleranter Zellen ist die Expression von IFN- γ mit der in toleranten Mäusen, die keinen Transfer erhalten haben, vergleichbar. Im Gegensatz dazu ist die Expression in den Lymphknoten der Empfänger naiver Zellen deutlich erhöht. Wiederum weist die Expression von IL-10 keinerlei Unterschiede auf. Völlig entgegen der Erwartung präsentiert sich dagegen die Situation in der Milz, hier ist die Expression von IFN- γ bei toleranten Tieren unabhängig von der Art der Sensibilisierung deutlich höher als bei naiven Tieren. Diese Beobachtung tritt noch deutlicher bei den Empfängern toleranter Zellen hervor, die Expression von IFN- γ ist deutlich erhöht verglichen mit den Empfängern naiver Zellen, die keine Veränderung in der IFN- γ -Expression aufweisen. Auch in der Milz zeigt sich keine Veränderung in der Expression von IL-10, auch nicht nach dem Transfer von Spenderzellen.

Entgegen der landläufigen Auffassung, daß die Induktion und die Aufrechterhaltung der Toleranz von der Expression von IL-10 gekennzeichnet ist (Groux, 1997; Powrie, 1994; Sonoda, 2001), finden sich in den hier präsentierten Ergebnissen keine Anhaltspunkte dafür, daß die Expression von IL-10 für die Induktion und Verbreitung der Toleranz gegen Nickel erforderlich ist. Die Ergebnisse sprechen eher dafür, daß die Induktion und infektiöse Verbreitung der Toleranz durch die feinregulierte Expression von IFN- γ beeinflusst wird, nicht von IL-10. Die Aktivierung der T-Zellen durch Interaktion mit APZ in den axillären Lymphknoten findet bei verringertem Spiegel des inflammatorischen Zytokins IFN- γ statt, jedoch ohne Beitrag von IL-10. In der Literatur existieren Hinweise darauf, daß die aktivierten T-Zellen in die Milz wandern, wo die infektiöse Verbreitung der Toleranz von T-Zellen auf DZ und von DZ auf T-Zellen unter Mitwirkung von NKT-Zellen erfolgt. Wird die Interaktion in der Milz gestört, bleibt das Entstehen von Toleranz aus (Faunce, 2002).

Die Expression von IFN- γ paßt somit eigentlich nicht in die gängigen Vorstellungen der Toleranzentwicklung. Die Ergebnisse deuten jedoch eine Funktion für IFN- γ in der Toleranz gegen Nickel an. Offensichtlich erfordert die in der Milz stattfindende infektiöse Verbreitung der Toleranz die Expression von IFN- γ . Dafür existieren mehrere mögliche Begründungen. Zum einen kann der

Zeitpunkt der Expression eines bestimmten Zytokins während der Immunreaktion seine Funktion bestimmen. Werden pro-inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ , früh während einer Immunreaktion exprimiert, induzieren sie eine inflammatorische Th1-Antwort, werden sie hingegen spät exprimiert, so kann dasselbe Zytokin die terminale Differenzierung und den Tod von T-Zellen auslösen. Dies beinhaltet auch solche, die an Autoimmunreaktionen beteiligt sind. Weiteren Einfluß haben der Ort und die Höhe der Expression (Falcone, 1999). IFN- γ könnte somit ein Beispiel für die ambivalente Rolle eines pro-inflammatorischen Zytokins in der Autoimmunität darstellen.

4.1.4 IFN- γ induziert die Expression des Tryptophan-abbauenden Enzyms IDO

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung von Immunantworten durch Zytokine besteht darin, daß sie unterschiedliche Wirkungen auf unterschiedliche Subpopulationen eines bestimmten Zelltyps haben. Dies ist der Fall bei CD8 α^+ DZ und CD8 α^- DZ in der Milz der Maus. Während die IFN- γ Behandlung keinen Einfluß auf die Funktion der CD8 α^- DZ-Subpopulation hat, entwickeln die CD8 α^+ DZ die Fähigkeit, die Antigenpräsentation durch andere DZ zu verhindern (Grohmann, 2000). Diese Funktion wird durch das Tryptophan-abbauende Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) vermittelt. Die Beeinflussung des Tryptophan-Katabolismus, die durch IDO katalysiert wird, stellt einen weiteren Mechanismus der Immunsuppression dar. So besteht eine biologische Funktion dieses Enzyms in der Suppression der allogenen Abstoßung des foetalen Gewebes während der Schwangerschaft, wird seine Funktion gestört, kommt es zum Verlust des Foetus. Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieses Enzyms ist seine Induzierbarkeit durch das eigentlich pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ (**Abb. 31**), weshalb es möglicherweise auch eine Rolle bei der Immuntoleranz gegen Nickel spielt.

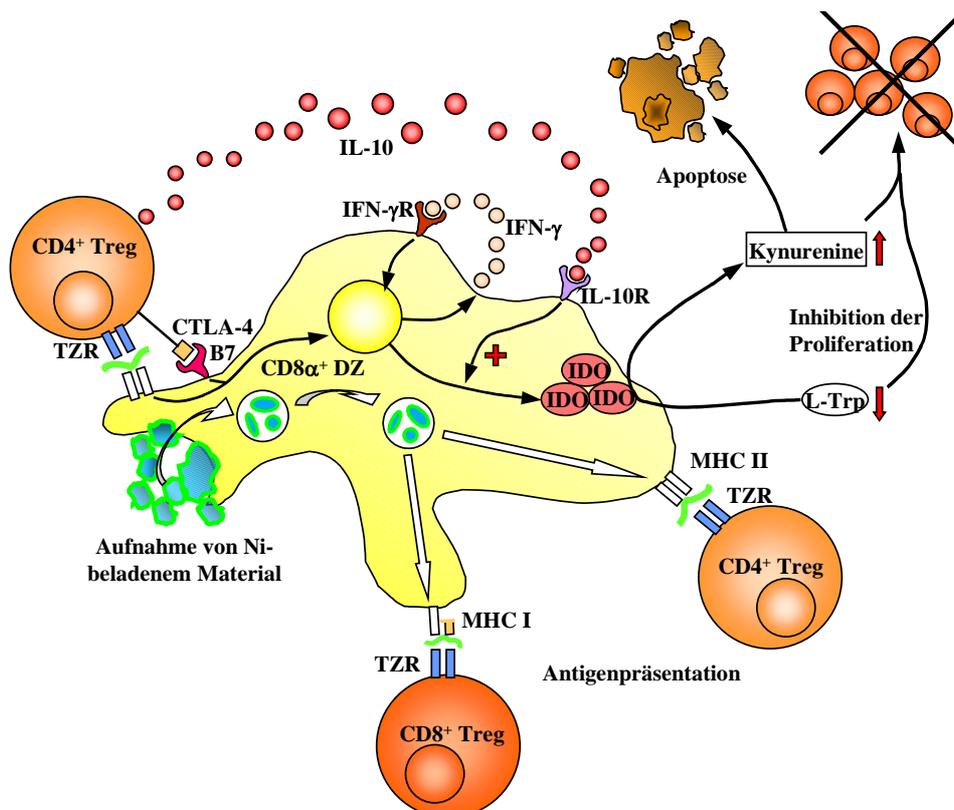


Abb. 31: Schema der IDO-Induktion (Finger, 2002), kombiniert mit der postulierten Präsentation von Ni-spezifischen Antigenen. Die Expression von IDO wird durch IFN- γ autokrin oder parakrin induziert. Die autokrine IFN- γ -Produktion der DZ wird durch die Bindung von Treg-Zellen an MHCII und die gleichzeitige Signalgebung über CTLA-4 an B7 ausgelöst. Die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor induziert die Expression von IDO, die durch IL-10 stabilisiert und verstärkt wird. IDO katalysiert den ersten Schritt im Trp-Katabolismus und verringert das Angebot an Trp, was die Proliferation von T-Effektorzellen inhibiert. Die gebildeten Abbauprodukte tragen zusätzlich zu diesem Effekt bei. Darüberhinaus induzieren sie selektiv die Apoptose von Th1-Zellen. Dies trägt zur weiteren Bildung von Treg-Zellen bei.

Die Expression von IDO durch DZ der CD8 α ⁺ Subpopulation kann sowohl autokrin als auch parakrin durch IFN- γ induziert werden. Die Expression von IFN- γ durch die DZ wird normalerweise während der Effektorphase der Toleranz durch die Interaktion von CTLA-4 auf Treg-Zellen mit B7 auf der Oberfläche der DZ ausgelöst (Grohmann, 2003, Fallarino, 2003) und führt zur autokrinen Induktion von IDO. Die enzymatische Aktivität des Enzyms führt zu einer Verringerung des Tryptophanangebots, was sich inhibierend auf die Proliferation von T-Effektorzellen auswirkt und somit die T-Zell-vermittelte Immunantwort beeinträchtigt (Mellor, 1999; Munn, 1999). Eine weitere Folge der Aktivität von IDO ist die Bildung von Reaktionsprodukten des Tryptophanabbaus. IDO katalysiert den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Kynurenin-Abbauweg (Shimizu, 1978). Die in weiteren Schritten entstehenden Metabolite wie 3-Hydroxyantranilsäure (3-HAA) oder Quinolinsäure (QUIN), die ebenfalls inhibierend auf die T-Zellproliferation wirken (Terness, 2002), induzieren darüber hinaus selektiv die Apoptose von Th1-Zellen, während Zellen des Th2-Typs wesentlich resistenter gegen diese Form der Apoptoseinduktion sind (Fallarino, 2002). Dabei handelt es sich allerdings um einen *In-vitro*-Befund, der jedoch auch *in-vivo* nicht auszuschließen ist. Der selektive Tod der Th1-Effektorzellen bzw. das Überleben der Th2-Zellen begünstigt die Bildung von Treg-Zellen und stellt einen wichtigen Mechanismus für die differentielle Regulation der beiden Zellpopulationen dar. Er hat somit einen entscheidenden Einfluß auf den Ausgang der Immunantwort (Zhang, 1997; Varadhachary, 1997).

Im hier untersuchten Modell der Nickeltoleranz zeigte sich eine hohe Expression von IFN- γ in der Milz. Somit ergibt sich die Vermutung, daß die Anwesenheit dieses Zytokins die Expression von IDO durch DZ der Milz induziert. Ein immer wiederkehrendes Problem hinsichtlich dendritischer Zellen besteht in ihrer geringen Zahl und ihrer nicht immer unproblematischen Isolierung. Aus diesem Grund wurde die Beantwortung dieser Frage auf indirektem Weg in Angriff genommen. Um ausreichende Zellzahlen zur Untersuchung zu erhalten, wurden dendritische Zellen aus den Knochenmarkszellen unter dem Einfluß von GM-CSF kultiviert (bone marrow-derived DCs: BMDCs) (Inaba, 1992). Auf solche Weise generierte DZ werden in der Immunologie häufig verwendet und dienen als potentielle APZ *in vivo* und *in vitro*, wenn anderweitig nicht genügend Zellen zur Verfügung stehen (Schreurs, 1999).

Die Behandlung der BMDCs mit IFN- γ hat die Aufregulation von IDO-mRNA (Abb. 7) und -Protein (Abb. 8) zur Folge und bestätigt die Angaben in der Literatur, außerdem regulieren die DZ das Antigen-präsentierende Molekül MHC-II und den für DZ typischen Antigenrezeptor DEC205, sowie CD8 α auf (Abb. 8). Die erhöhte Expression von MHC-II und von DEC205 spricht dafür, daß es sich bei den verwendeten Zellen um DZ des "semi-mature" Reifezustands handelte, also jener Population, der die tolerogenen Eigenschaften zugeschrieben werden (Lutz, 2002). Auch Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) beschreiben für die DZ toleranter Tiere eine erhöhte Expression von DEC205, die Expression von MHC-II hingegen zeigte keine Veränderung, der Zustand dieser DZ läßt sich daher am treffendsten als "immature" beschreiben. Dies ist dadurch zu erklären, daß die DZ bei Roelofs-Haarhuis *et al.* vorher nicht durch Injektion von Nickel und Adjuvans aktiviert wurden, während die Behandlung mit IFN- γ einer Aktivierung gleichkommt und die erhöhte Expression von MHC-II erklärt. Der Befund, daß die Expression von IDO in den generierten DZ durch die Behandlung mit IFN- γ aufreguliert wurde, impliziert eine mögliche Funktion dieses Enzyms bereits bei der Induktion der Nickeltoleranz. Die Expression von IFN- γ war in der Milz bereits 6 h nach der Aktivierung des Immunsystems durch die Injektion erhöht (Abb. 3D - F; Abb. 5D - F), selbst bei Applikation von Ni²⁺ oder NaCl.

Für eine Rolle von IDO bereits in der Induktionsphase der Toleranz spricht weiterhin, daß die Expression von IDO bereits durch virale oder bakterielle Faktoren, wie LPS, ausgelöst werden kann (Fujigaki, 2001), also bevor eine adaptive Immunreaktion ausgeprägt werden kann. Diese Eigenschaft kann auch die seit langem bekannte Beobachtung erklären, daß eine Kontamination mit LPS die Auslösung von DTH-Reaktionen, wie der Hypersensibilität gegen Nickel, verhindern kann.

4.1.5 Induktion der IDO-Expression durch UVB-Bestrahlung

Ein weiteres System zur systemischen Toleranzinduktion umfaßt die Bestrahlung mit UVB-Licht (Schwarz, 1998; Schwarz, 2004; Hill, 1999). Bemerkenswert ist, daß zwischen der UVB-induzierten systemischen Toleranz und der oralen Toleranz gegen Nickel viele Gemeinsamkeiten bestehen. Beide Systeme sind charakterisiert durch die Induktion von Treg-Zellen, durch die der Transfer auf unbehandelte naive Empfänger möglich ist, und in beiden Systemen ist für die Ausbildung der Toleranz die Apoptose durch Fas/FasL von Bedeutung. Für die UVB-induzierte Immunsuppression ist außerdem die Expression von CTLA-4 erforderlich, was für die oral induzierte Toleranz gegen Nickel bisher nicht bestätigt, jedoch auch nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die vielen Parallelen zur Nickeltoleranz und die Beteiligung von CTLA-4, welches in der Literatur als der Hauptauslöser der IFN- γ -Expression durch DZ beschrieben wird, führen zu der Frage, ob die Funktion von CTLA-4 bei der UVB-induzierten Immunsuppression in der Aufregulation von IDO besteht. Eine der Eigenschaften der CTLA-4⁺ T-Zellen UVB-bestrahlter toleranter Spender, die von Schwarz *et al.* (2000) beschrieben wurden, ist die Expression von IL-10, TGF- β und großen Mengen IFN- γ , weshalb sie den Tr1-Zellen zugeordnet wurden (Groux, 1997; Groux, 1999). Diese Beobachtungen wurden jedoch bei Kokultur mit Antigen-behandelten BMDCs gemacht, und die exprimierten Zytokine mittels ELISA im Überstand gemessen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die beobachtete IFN- γ -Produktion nicht auf die CTLA-4⁺ T-Zellen, sondern die DZ zurückzuführen war. Möglicherweise ist aber auch die Expression von IFN- γ in der Milz bei der Nickeltoleranz teilweise auf CTLA-4⁺ Tr1-Zellen zurückzuführen, keine der Möglichkeiten läßt sich ausschließen. Der resultierende Effekt, die Expression von IDO, wäre allerdings identisch.

Die in dieser Dissertation vorgelegten Daten zeigen jedoch, daß IDO in DZ bereits durch UVB-Bestrahlung selbst ausgelöst werden kann, ohne daß weitere Zellen beteiligt sind. Die IDO-Expression durch die bestrahlten dendritischen Zellen könnte die Bildung von Th1-Effektorzellen verhindern und die Bildung von Treg-Zellen begünstigen, was die Ausbildung eines sich selbst verstärkenden Netzwerkes mit CTLA-4⁺ Treg-Zellen zur Folge hätte (Finger, 2002), außerdem würde die Antigen-Präsentation benachbarter DZ im bestrahlten Tier inhibiert. Über mögliche Mechanismen der direkten IDO-Induktion kann nur spekuliert werden. Ein möglicher Kandidat ist der Transkriptionsfaktor p53, der durch UV-Bestrahlung in den Nukleus transloziert wird und dort unter anderem die Aktivierung diverser pro-apoptotischer Gene der Bcl-2-Familie, wie Bax, BID und PUMA bewirkt, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind (Chipuk, 2004; Fridman, 2003; Miyashita, 1994; Sax, 2002; Nakano, 2001). Auch in den B-Zellen Nickel-toleranter Tiere ist eine erhöhte Expression dieser Moleküle zu beobachten, es hat den Anschein, daß auch die Behandlung mit Ni²⁺ die Translokation von p53 in den Zellkern auslöst (Nowak, pers. Kommunikation).

Aus den Beobachtungen geht hervor, daß die Expression von IDO einer der grundlegenden Mechanismen der peripheren Toleranz sein könnte, der in den verschiedensten Toleranzmodellen eine Rolle spielt. Um Zweifel auszuräumen, daß IDO tatsächlich zur Toleranz gegen Nickel beiträgt, steht noch die direkte Bestätigung aus, daß in der Milz toleranter Tiere nicht nur IFN- γ , sondern auch IDO exprimiert wird.

4.1.6 Die Rolle der Apoptose in der Induktion der Nickeltoleranz

In der UVB-induzierten Toleranz spielt außerdem die Induktion der Apoptose über die Interaktion von Fas/FasL eine entscheidende Rolle (Schwarz, 1998; Hill, 1999). Kommt diese Interaktion nicht mehr zustande, entweder durch das Fehlen von Fas in *lpr*^{-/-} Mäusen oder von FasL in *gld*^{-/-} Mäusen, bleibt die Immunsuppression nach der Bestrahlung mit UVB aus, bzw. ist wie im Falle der *lpr*-Mutation stark beeinträchtigt (Hill, 1999). Die Begründung für das nur teilweise Ausbleiben der Immunsuppression in den Fas-defizienten Mäusen liegt in der Natur der *lpr*-Mutation, die nur lückenhaft ist (Chu, 1993; Mariani, 1994). So ist es zum Beispiel möglich, die Expression von Fas in Mäusen des *lpr*^{-/-} Stammes durch γ -Bestrahlung aufzuregulieren (Booker, 1998). Hill *et al.* (1999)

beschreiben die Erfordernis von FasL im Spender, dagegen ist laut Schwarz *et al.* (1998) die Expression von Fas und FasL im Empfänger für die Übertragung der UVB-induzierten Immunsuppression erforderlich. Diese widersprüchlichen Aussagen wurden in der vorliegenden Arbeit am Modell der oral induzierten Nickeltoleranz untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß weder Fas- noch FasL-defiziente Tiere orale Toleranz gegen Nickel entwickeln (Abb. 10 + 11). Eine Besonderheit zeigen dabei die Fas-defizienten Tiere. Sie können nach der oralen NiCl₂-Behandlung durch Ni²⁺/H₂O₂ sensibilisiert werden, nicht jedoch durch Ni²⁺ ohne zusätzliches Adjuvans, zeigen also eine Art "unvollständiger" Toleranz. Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten von Hill *et al.* (1999) überein, die zeigen, das durch UVB-Bestrahlung Immunsuppression, wenn auch in schwächerer Form, in Fas-defizienten Tieren induziert werden kann. Vermutlich ist dieser Effekt auf die unvollständige Mutation des Fas-Gens zurückzuführen. Im Gegensatz dazu werden oral behandelte FasL-defiziente Tiere bereits durch Ni²⁺ allein sensibilisiert. Die Unterschiede bei der Sensibilisierbarkeit weisen Parallelen zu den Beobachtungen von X. Wu an Mäusen auf, die in Nickel-freier Umgebung gehalten werden (Ni^{very low}-Mäuse, Veröffentlichung in Vorbereitung). Diese Tiere können ebenfalls bereits durch Ni²⁺ sensibilisiert werden. Während das Unvermögen von Ni²⁺ zur Sensibilisierung naiver, konventionell gehaltener Tiere einer fehlenden Adjuvansfunktion von Ni²⁺ zugeschrieben wurde (Artik, 1999), deuten die neuen Daten von Wu *et al.* darauf hin, daß bereits durch die orale Aufnahme geringer Mengen Ni²⁺ aus den Edelstahlkappen der Trinkflaschen und den Käfiggittern Nickel-spezifische Treg-Zellen in diesen Tieren gebildet werden. Die Entstehung von FasL⁺ Treg-Zellen nach oraler Applikation hoher Antigendosen wurde bereits beschrieben (Watanabe, 2002). Die gebildeten Treg-Zellen verhindern die Sensibilisierung durch Ni²⁺ alleine und machen die Verwendung eines Adjuvans erforderlich. Es besteht also die Möglichkeit, daß das Ausbleiben der Toleranzinduktion in den FasL-defizienten Mäusen auf der Unfähigkeit zur Bildung von Treg-Zellen beruht, während sich in Fas-defizienten Tieren Treg-Zellen bilden, die die Sensibilisierung durch Ni²⁺ verhindern können, nicht jedoch durch Ni²⁺ in Verbindung mit einem Adjuvans.

Um die Entstehung von Treg-Zellen und die Funktion von Fas und FasL während der Induktion der Nickeltoleranz zu untersuchen, wurden adoptive Zelltransfers mit Fas- und FasL-defizienten Tieren als Empfängern sowie als Spendern verschiedener Zellpopulationen durchgeführt. Die Daten zeigen, daß sowohl Fas- als auch FasL-defiziente Tiere durch den Transfer von Milzzellen toleranter Wildtyp-Spender tolerant gegen Nickel werden (Abb. 12 + 13). Das beweist, daß durch die Fas- bzw. die FasL-Mutation, also die Unterbrechung der Apoptoseinduktion, die Induktion der Toleranz verhindert wird. Ist die Toleranz jedoch bereits etabliert, das bedeutet, sind bereits Treg-Zellen gebildet worden, dann ist die Übertragung der Toleranz auch in FasL-defiziente Empfänger möglich (Abb. 14). Werden jedoch B-Zellen toleranter Spender auf FasL-defiziente Empfänger übertragen, erfolgt kein Transfer der Toleranz (Abb. 15). Weitere Transfers von sortierten T- und B-Zellen Fas- bzw. FasL-defizienter Spender haben gezeigt, daß für die Übertragung der Toleranz die Expression von Fas auf B-Zellen (Abb. 17) und von FasL auf T-Zellen (Abb. 19) oral tolerisierter Tiere erforderlich ist. Umgekehrt hat die Expression von Fas durch T-Zellen (Abb. 16) und von FasL durch B-Zellen (Abb. 18, in den Milzzellen enthalten) keine Bedeutung für die Toleranzentwicklung.

Offenbar sind für die Entstehung der Toleranz FasL⁺ T-Zellen und Fas⁺ B-Zellen erforderlich, fehlt eine dieser beiden Komponenten, kann sich keine Toleranz entwickeln. Dies impliziert die Tötung der mit Nickel beladenen B-Zellen durch die T-Zellen während der Induktionsphase der Nickeltoleranz. Die apoptotischen B-Zellen können dann von DZ aufgenommen werden und führen zur tolerogenen Präsentation von Antigenen, was zur Bildung von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Treg-Zellen führt (Abb. 32). Die tolerogene Präsentation von Antigenen und die Induktion regulatorischer T-Zellen durch DZ nach der Aufnahme von apoptotischem Material ist bereits allgemein akzeptiert (Ferguson, 2002; Koh, 2000; Sauter, 2000).

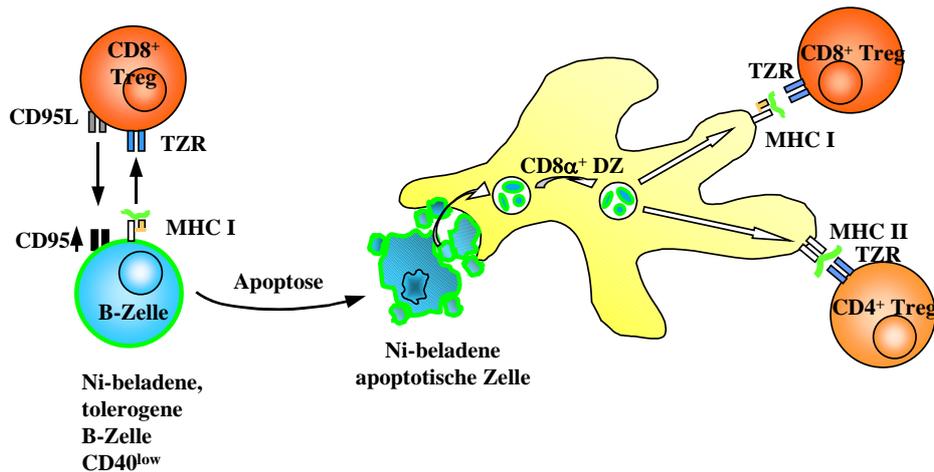


Abb. 32: Während der Induktion der Toleranz gegen Nickel induzierten T-Zellen die Apoptose von B-Zellen. Dafür ist die Expression von FasLigand (CD95L) auf der Oberfläche der T-Zellen und die Expression von Fas (CD95) durch die mit Nickel beladenen B-Zellen erforderlich. Ist die Expression eines dieser Moleküle bei einer der beteiligten Zellpopulationen gestört, findet keine Induktion der Toleranz mehr statt. Die apoptotischen B-Zellen werden von DZ aufgenommen, die Antigene prozessiert und an naive T-Zellen präsentiert, die sich daraufhin zu Treg-Zellen differenzieren.

Sind erst einmal Treg-Zellen gebildet worden, dann erfolgt die Generation weiterer regulatorischer T-Zellen durch die infektiöse Verbreitung der Toleranz. Die gebildeten Treg-Zellen interagieren mit anderen DZ und bewirken die Entstehung weiterer tolerogener DZ (Min, 2003; Cederbom, 2000; Frasca, 2002). Auch die Induktion vonIDO über das koinhibitorische Molekül CTLA-4 der Treg-Zellen steht in der Diskussion, die tolerogenen Funktionen der exprimierenden DZ auszulösen, ähnlich einem intrazellulären "second-messenger" System (Mellor, 2004). Die Interaktion zwischen diesen Zelltypen ist vermutlich für die Amplifikation während der Toleranzinduktion verantwortlich, da die Treg-Zellen mit vielen DZ interagieren können, die ihrerseits die Bildung vieler neuer regulatorischer T-Zellen bewirken. Die von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2003) präsentierten Daten belegen, daß der Transfer der Toleranz von T-Zellen des Spenders auf T-Zellen des Empfängers nicht direkt erfolgt, sondern die Toleranzübertragung auf APZ des Empfängers als Zwischenschritt beinhaltet. Der Transfer der Toleranz auf Zellen des gleichen Typs erfordert mehr Zeit und auch das zweimalige Sensibilisieren der Tiere, was die Notwendigkeit zur Aktivierung der APZ verdeutlicht. Durch die Mitwirkung vonIDO könnte die infektiöse Verbreitung der Toleranz noch zusätzlich verstärkt werden, daIDO auch einen Effekt auf benachbarte DZ ausübt (Grohmann, 2000).

4.1.7 NKT-Zellen induzieren Apoptose während der Induktion der Nickeltoleranz

Weitere Daten von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) zeigen, daß noch ein weiterer Zelltyp für die Toleranzinduktion erforderlich ist: NKT-Zellen, neben Treg-Zellen gelten sie als zweiter Typ regulatorischer T-Zellen (Hong, 2001; Sharif, 2001; Miyamoto, 2001). Sie sind beteiligt an der Kontrolle und der Unterdrückung diverser Autoimmunkrankheiten. Sie erkennen Phospho- und Glykolipide (Gumperz, 2000; Zhou, 2004), die ihnen auf CD1d von DZ und B-Zellen präsentiert werden (Kronenberg, 2002; Brigl, 2004). Viele Autoimmunkrankheiten gehen mit einer verringerten Zahl der NKT-Zellen einher. Ihre Stimulation durch α -GalCer kann den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen (Hong, 2001; Poulton, 2001; Yang, 2003). Auch in Fas-defizienten Mäusen ist die Zahl der NKT-Zellen reduziert (Yang, 2003). Die Beteiligung von NKT-Zellen an der Induktion der Nickeltoleranz geht daraus hervor, daß NKT-Zell-defiziente Tiere des $J\alpha 18^{-/-}$ Stammes bei oraler Behandlung mit Nickel keine Toleranz entwickeln. Während durch den Transfer von T-Zell-depletierten Milzzellen (APZ) keine Toleranz auf $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger übertragen werden kann, werden die Empfänger von toleranten T-Zellen sehr wohl tolerant. Nach oraler Behandlung NKT-Zell-defizienter Tiere mit Ni^{2+} können die APZ dieser Spender Toleranz auf naive WT-Empfänger

übertragen, nicht jedoch die T-Zellen. Offensichtlich werden in NKT-Zell-defizienten Mäusen keine regulatorischen T-Zellen gebildet, die NKT-Zellen sind für die Entwicklung von Treg-Zellen erforderlich (Roelofs-Haarhuis, 2004).

Werden jedoch Lymphozyten, die NKT-Zellen enthalten, zusammen mit APZ toleranter Spender in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger transferiert, ist es möglich Toleranz zu übertragen. Dafür ist es nicht erforderlich, daß die NKT-Zellen ebenfalls aus einem toleranten Spender stammen. Werden die NKT-Zellen aus diesen Lymphozyten depletiert, findet kein Transfer der Toleranz mehr statt. Allerdings müssen die NKT-Zellen dazu in der Lage sein, die Zytokine IL-4 und IL-10 zu produzieren, eine Erfordernis zur Produktion von $IFN-\gamma$ bestand dagegen nicht (siehe Abb. 20). Die übertragenen NKT-Zellen sind also dazu fähig, das Zellrepertoire der NKT-Zell-defizienten Empfänger zu substituieren (Roelofs-Haarhuis, 2004). Es konnte außerdem beim Kotransfer von tolerogenen B-Zellen zusammen mit Lymphozyten FasL-defizienter Spender gezeigt werden, daß die Expression des FasLiganden durch die NKT-Zellen für die Induktion der Toleranz erforderlich ist (Nowak, Dissertation). Die FasL-Expression der NKT-Zellen kann zusätzlich durch IL-4 autokrin verstärkt werden (Kaneko, 2000).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten und die Literatur bestätigen somit die Hypothese, daß NKT-Zellen die B-Zellen durch Induktion von Apoptose während der Induktionsphase der Toleranz töten (Nowak, Dissertation). Die Aufnahme apoptotischen Materials durch DZ, speziell der $CD8\alpha^+$ Subpopulation, hat die tolerogene Präsentation von Antigenen zur Folge, was zur Aktivierung von naiven T-Zellen unter tolerogenen Bedingungen führt und ihre Differenzierung zu Treg-Zellen auslöst (Abb. 33). Für diese Hypothese spricht, daß die B-Zellen der marginalen Zone der Milz CD1d exprimieren (Sonoda, 2002) und somit NKT-Zellen stimulieren können, die B-Zellen toleranter Tiere zeigen zudem eine erhöhte Expression von Fas (Nowak, Dissertation).

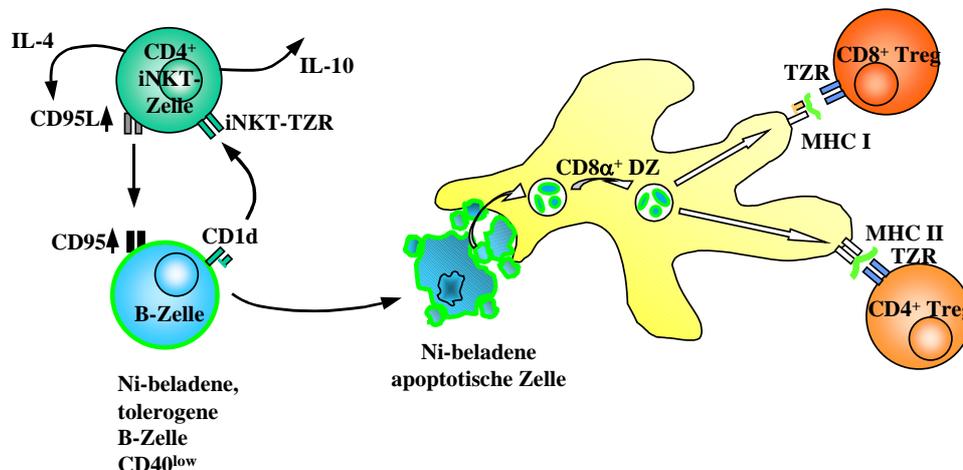


Abb. 33: NKT-Zellen induzieren die Apoptose von B-Zellen während der Induktion der Nickel-toleranz. Die Induktion der Toleranz erfordert die Expression von FasL durch die NKT-Zellen und von Fas durch die B-Zellen. Tolerogene B-Zellen weisen eine erhöhte Expression von Fas auf und besitzen CD1d, sie können somit die NKT-Zellen stimulieren, die ihrerseits mit der Aufregulation von FasL und Zytokinen reagieren. Die apoptotischen B-Zellen werden von DZ aufgenommen und in tolerogener Weise an naive T-Zellen präsentiert, was zur Differenzierung zu Treg-Zellen führt.

NKT-Zellen sind also für die Induktion der Toleranz erforderlich, neben Zytokinen müssen sie ebenfalls FasL exprimieren. Es stellt sich somit die Frage, ob die Induktion der Apoptose die einzige Funktion der NKT-Zellen bei der Entstehung der Toleranz ist, oder ob sie noch weitere Funktionen in späteren Phasen nach der Apoptoseinduktion ausüben, für die die Zytokine von Bedeutung sind.

4.1.8 Die Übertragung der Toleranz durch "apoptotic bodies" erfordert NKT-Zellen

Falls die ausschließliche Funktion der NKT-Zellen in der Bereitstellung von apoptotischem Material durch die Induktion der B-Zellapoptose besteht, die durch die Produktion der Zytokine möglicherweise unterstützt wird, dann sollte der Transfer der Toleranz unter Umgehung dieses Schrittes möglich sein, indem die Induktion der Apoptose künstlich, zum Beispiel durch γ -Bestrahlung der B-Zellen, ausgelöst wird. Die entstehenden apoptotischen B-Zellen sollten von DZ aufgenommen werden und prozessierte Antigene auf tolerogene Weise präsentiert werden. (Abb. 22B, Hypothese der Toleranzinduktion durch apoptotisches Material von Nickel-behandelten Spendern). Während unversehrte B-Zellen toleranter Spender, analog zu tolerogenen APZ, keine Toleranz in NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen können (Abb. 21), sind apoptotische B-Zellen toleranter Spender dazu in der Lage (Nowak, Dissertation; **Abb. 34**).

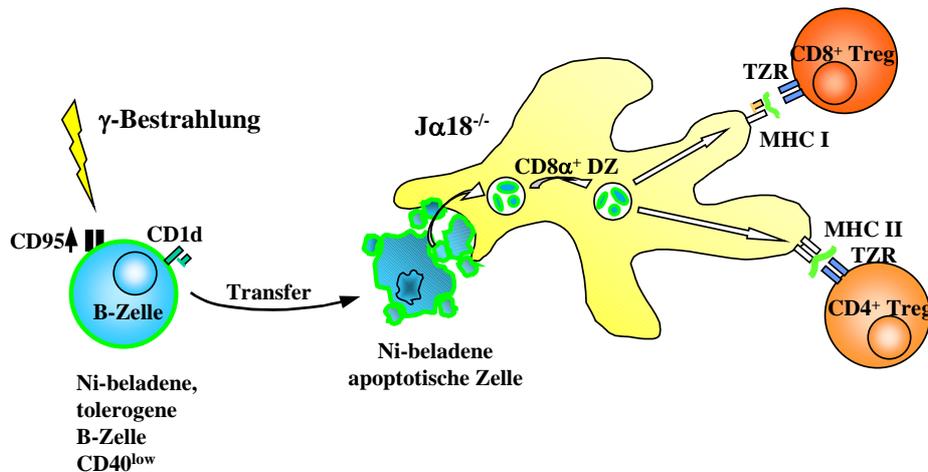


Abb. 34: Apoptotische B-Zellen übertragen die Toleranz gegen Nickel in NKT-Zell-defiziente Empfänger. Die übertragenen apoptotischen B-Zellen werden von DZ aufgenommen, die Antigene prozessiert und an naive T-Zellen präsentiert, die sich daraufhin zu Treg-Zellen differenzieren. Die Mitwirkung von NKT-Zellen ist hierfür nicht erforderlich

Wenn tatsächlich das Vorhandensein von apoptotischem Material die einzige Voraussetzung für die Toleranzinduktion darstellt, dann sollte bereits apoptotisches Material in Form apoptotischer Vesikel ("apoptotic bodies") für die Übertragung der Toleranz in NKT-Zell-defiziente Empfänger ausreichen (**Abb. 35**). Das ist jedoch nicht der Fall (Abb. 25, Gr. 3).

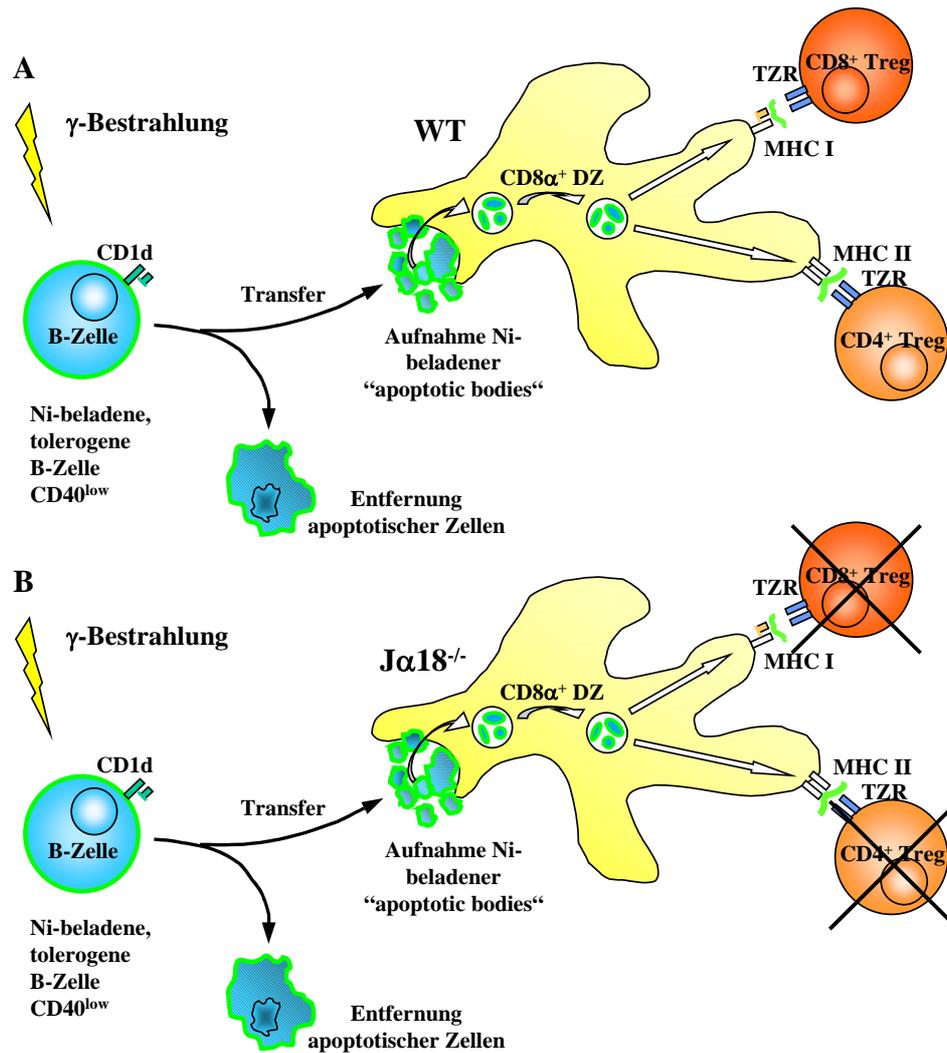


Abb. 35: Induktion der Nickel-Toleranz durch "apoptotic bodies" erfordert die Beteiligung von NKT-Zellen. Während apoptotische Vesikel die Toleranz auf WT-Empfänger übertragen können (A), erfolgt bei Transfer der „apoptotic bodies“ auf NKT-Zell-defiziente Tiere keine Induktion der Toleranz (B). Das beweist, daß die Funktion der NKT-Zellen nicht nur in der Induktion der Apoptose von B-Zellen besteht.

In der Tat besitzen "apoptotic bodies" das Potential, die Toleranz in WT-Empfänger zu übertragen (Abb. 35A; Abb. 24, Gr. 4 + 6), nicht jedoch in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger (Abb. 35B; Abb. 25, Gr. 3). Die in Abbildung 23 dargestellte Hypothese konnte somit nicht bestätigt werden. Dieser Befund führt zu zwei Schlußfolgerungen:

1. Die Funktion der NKT-Zellen ist nicht auf die Apoptoseinduktion von B-Zellen beschränkt. Das wird durch die Beobachtung von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) bestätigt, daß NKT-Zellen dazu in der Lage sein müssen, IL-4 und IL-10 zu produzieren. Es zeigt auf indirekte Weise, daß die Produktion dieser Zytokine nach der Induktion der Apoptose erforderlich ist.
2. Die sterbenden B-Zellen üben noch eine spezielle Funktion aus, da sie die Toleranz nicht nur auf WT-Empfänger, sondern auch auf NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen können. Möglich wäre die Produktion von Zytokinen durch apoptotische B-Zellen oder die Expression spezieller Oberflächenmarker, die andere Signale an die phagozytierende Zelle liefern als die apoptotischen Vesikel.

Somit stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, über den die "apoptotic bodies" erkannt und aufgenommen werden. Die Unterschiede zwischen "apoptotic bodies" und apoptotischen Zellen sind bisher nur unzureichend aufgeklärt. Während der Apoptose durchlaufen die sterbenden Zellen eine

Reihe von Prozessen, die mit dem Tod der Zelle enden und von der Fragmentierung der DNA, der Kondensation und dem Schrumpfen des Zellkerns, sowie der Bildung der "apoptotic bodies" gekennzeichnet sind (Bedner, 1999). Diese Vesikel enthalten Teile des Zytoplasmas und der Organellen, die von Fragmenten der Plasmamembran umhüllt sind (Anderson, 2001), ihre Größe liegt zwischen 0,5 und 2 μm (Ihara, 1998). Sie besitzen jedoch keine enzymatische Aktivität mehr (Stolzing, 2004). Bei der Aufnahme besteht Konkurrenz zwischen apoptotischen Vesikeln und anderen, nicht-apoptotischen Lipidvesikeln, was die Aufnahme über gemeinsame Mechanismen vermuten läßt. Die Beteiligung des Scavenger-Rezeptors CD36 an der Aufnahme von apoptotischen Vesikeln konnte eindeutig nachgewiesen werden (Stolzing, 2004). Dieser Rezeptor erkennt und bindet oxidierte Lipoproteine (Fadok, 1998; Savill, 1997). Es wurde postuliert, daß die Überbleibsel apoptotischer Zellen und apoptotische Vesikel unter Mitwirkung verschiedener Rezeptoren phagozytiert werden, die Phosphatidylserin und andere, bisher nicht identifizierte Liganden erkennen (Parthasarathy, 1990), die einzigartig für die Oberflächen apoptotischer Zellen sind (Husemann, 2002). Zur Diskussion stehen hierfür oxidierte Proteine und Lipide apoptotischer Partikel. CD36 ist jedoch nicht der einzige beteiligte Rezeptor, es sind noch weitere Rezeptoren, unter anderem auch für Phosphatidylserin, beteiligt (Stolzing, 2004; Kagan, 2002). Selbst die gleichzeitige Blockade multipler Rezeptoren kann die Aufnahme der "apoptotic bodies" nicht vollständig unterbinden (Fadok, 1998). Der Abbau oxidierter Proteine aus apoptotischen Vesikeln erfolgt unter Beteiligung sowohl des lysosomalen als auch des proteasomalen Abbauweges (Stolzing, 2002; Stolzing, 2004). Definitive Unterschiede zwischen den Oberflächenmolekülen apoptotischer Zellen und apoptotischer Vesikel sind bisher jedoch nicht beschrieben, aus diesem Grund ist das unterschiedliche Verhalten von apoptotischen Zellen und "apoptotic bodies" bei der Übertragung der Toleranz höchstwahrscheinlich auf die fehlende enzymatische Aktivität der Vesikel zurückzuführen.

4.1.9 Weitere mögliche Funktionen von NKT-Zellen

Das in dieser Arbeit etablierte System der Toleranzübertragung durch apoptotische Vesikel ermöglicht zum ersten Mal die Unterscheidung zwischen den Effekten der übertragenen Spender B-Zellen und der NKT-Zellen im Empfänger, da hier in einem zellfreien Transfer die Nickeltoleranz nur durch apoptotisches Material übertragen wurde. Es hat sich gezeigt, daß dafür die Präsenz von NKT-Zellen im Empfänger erforderlich ist, also die Induktion der B-Zell-Apoptose nicht die einzige Funktion dieser speziellen Lymphozyten-Subpopulation ist.

Eine mögliche Funktion der NKT-Zellen besteht in der Produktion von Zytokinen. NKT-Zellen exprimieren große Mengen von Zytokinen wie IFN γ , IL-4 und IL-10 schon wenige Stunden nach ihrer Aktivierung durch CD1d (Faunce, 2002; Chen, 1997; Bendelac, 1995; Sonoda, 2001), im Gegensatz zu konventionellen Lymphozyten, die dafür mehrere Tage benötigen. Diese Eigenschaft könnte die Ausbildung einer speziellen Mikroumgebung zur Folge haben, die die DZ beeinflusst und für die tolerogene Präsentation von Antigenen erforderlich ist. Die Expression von IL-4 und IL-10 während der Kontrolle von Immunantworten ist allgemein akzeptiert. Obwohl Roelofs-Haarhuis *et al.* keine Notwendigkeit für die IFN- γ -Produktion durch NKT-Zellen gefunden haben, stellt dies dennoch keinen Widerspruch zu den in dieser Arbeit präsentierten Daten dar, die eine hohe Expression von IFN- γ in der Milz nach dem Transfer toleranter Zellen zeigen (Abb. 4 + 6) (Kopp, 2004). In den Transfers von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) wurden gesamte APZ, d.h. T-Zell-depletierte Milzzellen übertragen, daher ist nicht auszuschließen, daß bei diesen Transfers keine Erfordernis für die IFN- γ -Produktion durch NKT-Zellen bestand, weil die Produktion von IFN- γ durch andere Zellen im Inokulat übernommen wurde. Die hier beschriebene Expression von IFN- γ in der Nickeltoleranz könnte auf die Induktion des Trp-abbauenden Enzyms IDO hindeuten, das auf mehrere Arten zur Verhinderung unerwünschter Immunreaktionen beitragen kann. Die Expression von IDO wird zusätzlich durch IL-10 stabilisiert und verstärkt (Munn, 2002), was zu der von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) beobachteten Erfordernis der IL-10-Produktion paßt.

Eine weitere mögliche Funktion für NKT-Zellen besteht in einer direkten Zell-Zell-Interaktion mit DZ. CD1d wird insbesondere von tolerogenen DZ und B-Zellen exprimiert (Takeuchi, 1998; Sonoda, 2002). Möglicherweise sind für eine vollständige Induktion der Toleranz sogar beide Funktionen notwendig. Die Aktivierung der NKT-Zellen durch CD1d könnte für die Produktion von Zytokinen und Chemokinen erforderlich sein, die letztendlich zur Ausbildung einer spezifischen Mikroumgebung führen (Faunce, 2002). Auch ist die Induktion der Apoptose weiterer Zellen im Empfänger durch NKT-Zellen in Betracht zu ziehen, möglicherweise sind B-Zellen nicht das einzige Ziel der FasL-vermittelten Apoptoseinduktion (**Abb. 36**).

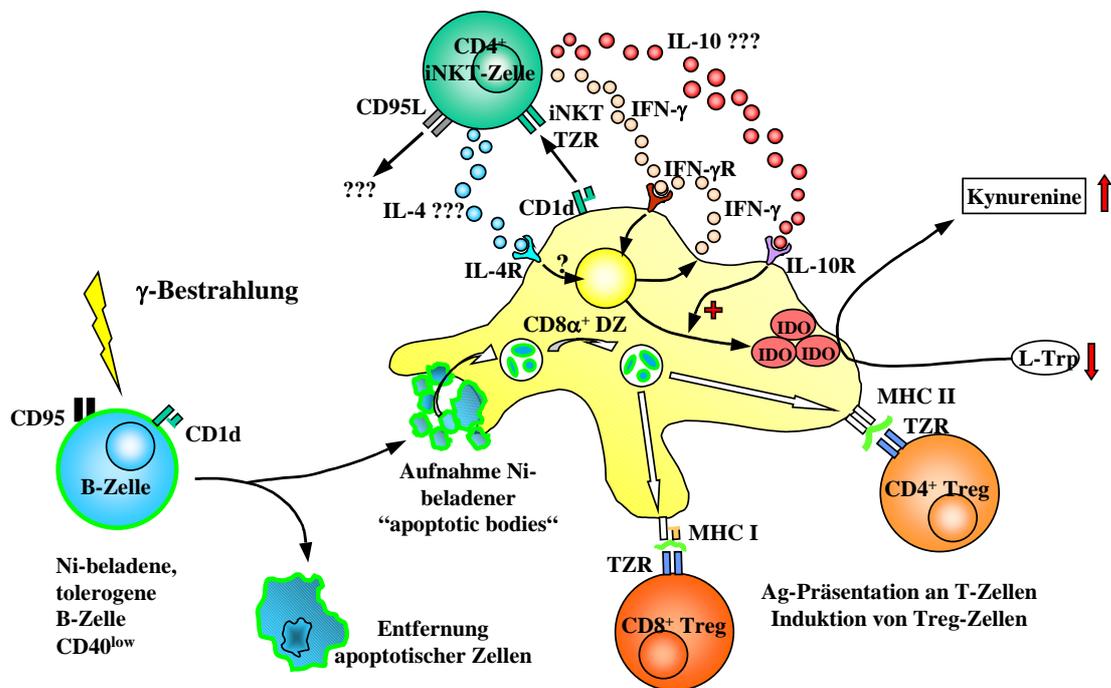


Abb. 36: Mögliche Funktionen von NKT-Zellen während der Induktion der Toleranz. Zum einen könnten die produzierten Zytokine die Ausbildung einer speziellen Mikroumgebung bewirken, die auf die DZ wirkt. Die beobachtete IFN- γ -Produktion könnte die Induktion von IDO bewirken, die durch IL-10 stabilisiert und verstärkt wird. IDO verhindert die Proliferation von T-Effektorzellen durch Trp-Verbrauch und bewirkt die Bildung von Kynureninen, die diesen Effekt unterstützen und die Apoptose von Th1-Zellen auslösen, wodurch die Bildung von Treg-Zellen begünstigt wird. Eine zweite Möglichkeit besteht in einer direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen NKT-Zelle und DZ über CD1d. Denkbar wäre auch die Induktion der Apoptose weiterer Zellen durch den FasL-Liganden der NKT-Zellen. Möglicherweise kann auch IL-4 Einfluß auf die DZ nehmen.

4.1.10 Ausblick: Neue Möglichkeiten für künftige Transfers von "apoptotic bodies"

Neben den neuen Erkenntnissen, die zur Aufklärung der Toleranzinduktion beitragen, werfen die hier präsentierten Daten jedoch auch neue Fragen auf. Diese Fragen können in dem hier beschriebenen Kotransfer-System durch die gezielte Supplementation der übertragenen "apoptotic bodies" mit NKT-Zellen von Gen-defizienten Tieren untersucht werden, die beobachteten Effekte gehen ausschließlich auf die Eigenschaften der übertragenen NKT-Zellen zurück, da die apoptotischen Vesikel selber keine enzymatische Aktivität mehr besitzen (Stolzing, 2004).

Zum einen stellt sich die Frage nach der Funktion der Zytokine, die von den NKT-Zellen exprimiert werden, sind sie für die Induktion der Apoptose erforderlich, oder üben sie einen Einfluß auf die DZ aus? Diese Frage kann durch den Kotransfer von NKT-Zellen verschiedener Zytokin-defizienter Spender untersucht werden. Erfolgt der Transfer der Toleranz bei Verwendung Zytokin-defizienter NKT-Zellen zusammen mit apoptotischen Vesikeln, würde dies zeigen, daß die Zytokine nur für die Induktion der Apoptose durch die NKT-Zellen erforderlich sind. So hat IL-4 zum Beispiel die

Fähigkeit, autokrin die Expression von FasL auf NKT-Zellen aufzuregulieren (Kaneko, 2000). Erfolgt kein Transfer der Toleranz, demonstriert dies, daß die Zytokine für einen späteren Schritt erforderlich sind. Als Ziel für die Wirkung von Zytokinen kommen vor allem die DZ in Frage, die Rezeptoren für IFN- γ , IL-10 und IL-4 exprimieren. Die Verwendung von IFN- γ ^{-/-} NKT-Zellen wird zur Klärung der Frage beitragen, ob die Expression von IFN- γ durch NKT-Zellen doch für die Induktion der Toleranz erforderlich ist, wenn der Transfer der Toleranz nicht durch APZ, sondern Zell-frei durch apoptotische Vesikel erfolgt. Das würde zeigen, daß bei den von Roelofs-Haarhuis *et al.* (2004) beschriebenen Kotransfers die Expression von IFN- γ durch andere Zellen des Inokulats oder auch des Empfängers selbst erfolgt ist, und könnte ebenfalls die in dieser Arbeit beobachtete hohe IFN- γ Expression in der Milz erklären.

In der Immuntoleranz, die durch Applikation von Antigen über einen immunprivilegierten Bereich, die Vorkammer des Auges, induziert wird (ACAID), wird die direkte Interaktion von NKT-Zellen mit DZ und B-Zellen in einem Mikromilieu in der marginalen Zone der Milz beschrieben (Sonoda, 2002). Die NKT-Zellen der Milz unterscheiden sich von den NKT-Zellen anderer Organe durch die exklusive Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 (Johnston, 2003), der sie als Reaktion auf das B-Zell-spezifische Chemokin BCA-1/CXCL13 in die B-Zellzonen der Milz migrieren läßt. Durch die Verwendung von NKT-Zellen CXCR5-defizienter Spender können Aussagen darüber gemacht werden, ob die Interaktion von NKT-Zellen mit B-Zellen während der Induktion der Nickeltoleranz tatsächlich in der Milz erfolgt.

Durch Kotransfer von NKT-Zellen FasL-defizienter Spender mit "apoptotic bodies" toleranter Spender läßt sich feststellen, ob NKT-Zellen nur für die Apoptoseinduktion der B-Zellen verantwortlich sind, oder ob im Verlauf der Toleranzinduktion noch weitere Zelltypen durch Apoptose getötet werden. In diesem Fall würde keine Übertragung der Toleranz erfolgen.

Durch Verwendung des in dieser Arbeit etablierten Systems der Toleranzübertragung durch "apoptotic bodies" kann ebenfalls die Möglichkeit der Zell-Zell-Interaktion von NKT-Zellen und DZ bei der Induktion der Toleranz untersucht werden. Dazu werden lediglich Empfänger eines anderen Stammes, CD1d^{-/-}, benötigt. CD1d^{-/-} Tiere besitzen zum einen kein CD1d, zum anderen fehlen diesen Tieren ebenfalls NKT-Zellen. Substituiert man diese Empfänger durch einen Transfer mit NKT-Zellen von WT-Spendern, können die übertragenen NKT-Zellen keine Verbindung mit den DZ des Empfängers aufnehmen. Findet trotzdem die Induktion der Toleranz statt, beweist dies, daß keine Interaktion zwischen NKT-Zellen und DZ für die Toleranzinduktion erforderlich ist.

Interessanterweise haben auch Fas-defiziente Tiere des *lpr*^{-/-} Stammes kein CD1d oder β_2 -Mikroglobulin, sie besitzen aber trotzdem NKT-Zellen (Yang, 2003). Möglicherweise beruht die beobachtete Störung der Induktion der Nickel-Toleranz in diesen Tieren nicht nur auf dem Unvermögen der B-Zellen, durch Apoptose zu sterben, sondern auch auf der Beeinträchtigung der NKT-Zellaktivierung durch DZ. Auch hier bieten sich weitere Versuche an, zum Beispiel die Stimulation der vorhandenen NKT-Zellen durch Behandlung der Tiere mit α -GalCer, oder der Transfer α -GalCer-behandelter DZ vor oder während der oralen Behandlung mit Nickel.

4.1.11 Hypothese der Toleranzinduktion unter Beteiligung des Tryptophankatabolismus

Der hier etablierte Transfer von "apoptotic bodies" ermöglicht neue Möglichkeiten der detaillierten Untersuchung der Vorgänge während der Induktion der Toleranz gegen Nickel in einem *In-vivo*-Modell. Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen fügen sich in die bereits bestehenden Befunde über die Entstehung der Toleranz ein. Aufgrund der neuen Beobachtungen und der bisherigen Befunde der Arbeitsgruppe von Prof. Gleichmann läßt sich die Hypothese hinsichtlich der Induktion der Toleranz erweitern (Abb. 37).

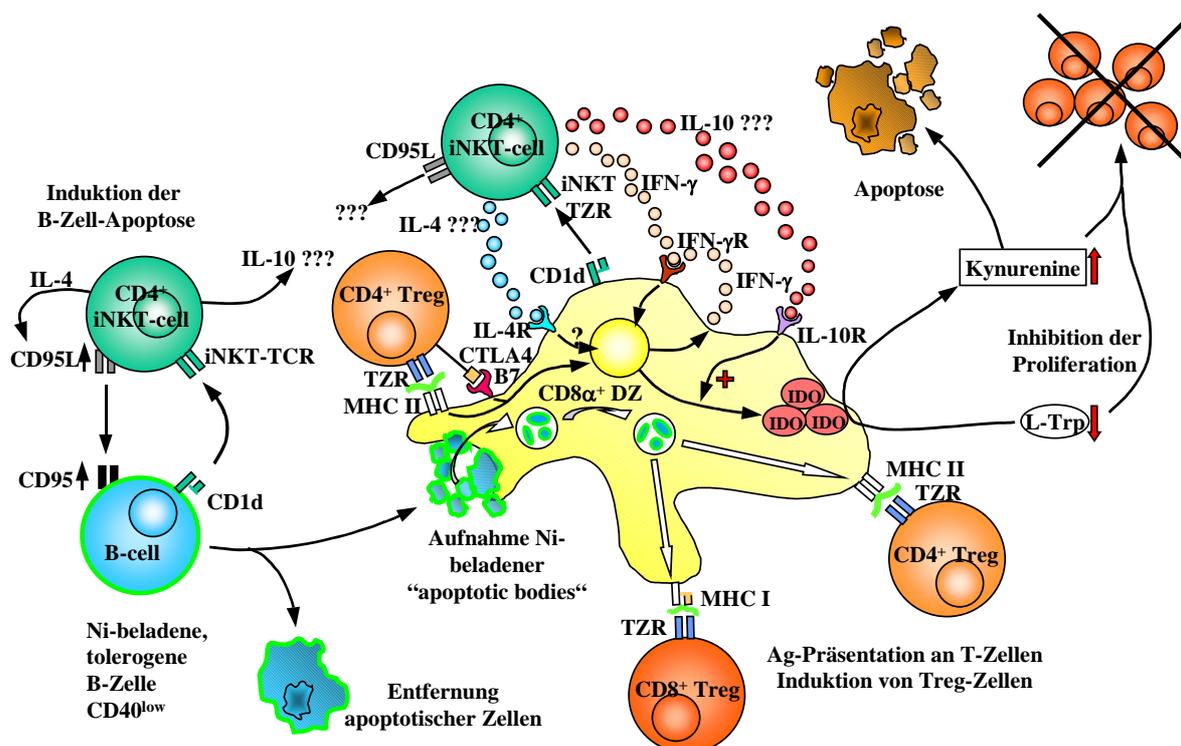


Abb. 37: Hypothese der Toleranzinduktion gegen Nickel unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse. Neu in dieser Darstellung ist die Funktion der NKT-Zellen als Auslöser der Apoptose und die Möglichkeit, die Funktion der NKT-Zellen bei der Induktion der Toleranz unabhängig von den Einflüssen anderer übertragener Zellen durch den Zell-freien Transfer von "apoptotic bodies" untersuchen zu können. Durch dieses neue Transfersystem konnte gezeigt werden, daß NKT-Zellen, abgesehen von der Apoptoseinduktion, noch weitere Funktionen bei der Induktion der Nickeltoleranz ausüben. Die beobachtete Expression von IFN-γ deutet eine mögliche Beteiligung des Tryptophankatabolismus auch an der Induktion der Nickeltoleranz an. Die hier dargestellte Hypothese basiert auf dem Modell von Finger und Bluestone (2002) und verbindet die Erkenntnisse von Roelofs-Haarhuis *et al.* über die Induktionsphase der Nickeltoleranz mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten.

Neu ist in diesem Zusammenhang der Beitrag der Arbeitsgruppe um Prof. Gleichmann zur Klärung der Rolle der NKT-Zellen während der Induktion der Nickel-Toleranz. Die Befunde hinsichtlich der Funktion der Apoptose und die Klärung der Frage, welche Zellen im Verlauf der Toleranzinduktion durch Apoptose sterben, und welche für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind, gehen auf gemeinsam durchgeführte Experimente mit Michael Nowak zurück, der Transfer von Fas-defizienten B-Zellen wird auch in seiner Dissertation dargestellt. Die Notwendigkeit der Apoptoseinduktion von B-Zellen durch NKT-Zellen während der Toleranzinduktion wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Ein weiterer wichtiger Beitrag der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der Induktionsphase der Nickeltoleranz besteht in der Etablierung eines Systems, welches die Untersuchung der Funktionen von NKT-Zellen während der Toleranzinduktion ohne den Einfluß weiterer Zelltypen ermöglicht. Die damit ermittelten Resultate beweisen, daß die Funktion der NKT-Zellen nicht ausschließlich auf die

Induktion der B-Zellapoptose beschränkt ist, sondern daß dieser spezielle Treg-Typ noch weitere unersetzliche Funktionen innehat.

Außerdem deuten die hier präsentierten Daten erstmals die Möglichkeit der Beteiligung des Trp-Katabolismus an der Entstehung der Nickeltoleranz an. Völlig unerwartet war die Expression des Zytokins IFN- γ , das fälschlicherweise oft als rein pro-inflammatorisch betrachtet wird, in der Milz während der Induktion der Toleranz. Die mögliche Konsequenz besteht in der Expression vonIDO durch die DZ. Die Funktionen des Trp-Katabolismus während der Effektorphase der Toleranz sind allgemein akzeptiert, das bekannteste Beispiel ist die Suppression der allogenen Abstoßung des foetalen Gewebes durch das Immunsystem der Mutter während der Schwangerschaft (Mellor, 1998). Die Induzierbarkeit von IDO durch IFN- γ und bereits durch UV-Bestrahlung von DZ erlaubt jedoch die Hypothese, daß die Expression von IDO bereits sehr früh in der Induktionsphase der Toleranz die Proliferation von T-Effektorzellen verhindert und den resultierenden Reaktionstyp durch Tötung von Th1-Zellen beeinflußt. Somit wird die Entwicklung von Th2- und Treg-Zellen gefördert. Dafür spricht weiterhin, daß IDO bereits durch bakterielle Stimuli wie LPS induziert werden kann (Fujigaki, 2001). Die gefundenen Daten ergänzen in vielen Punkten den in der Literatur präsentierten Mechanismus der Toleranz durch Beteiligung des Tryptophankatabolismus. Die Immunsuppression durch IDO könnte eine weitere wichtige Säule der Toleranz gegen Nickel repräsentieren und einen möglichen Amplifikationsmechanismus darstellen, da die Expression von IDO durch DZ auch die Funktion der benachbarten DZ beeinflusst (Grohmann, 2000). Sobald Treg-Zellen gebildet worden sind, können sie die weitere Expression von IDO durch die Vermittlung von CTLA-4 induzieren. Dies führt zur Ausbildung einer sich selbst begünstigenden Wirkungsbeziehung (positive feedback loop).

4.2 Auswirkungen von Stäuben auf das Immunsystem

4.2.1 *In vivo* Untersuchung von PM im PLN-Assay

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Umweltstäuben ("particulate matter", PM) auf das Immunsystem und die Induktion von Entzündungen und Allergien untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein *In-vivo*-System etabliert, mit dem eine schnell und vergleichsweise einfach durchzuführende Risikoabschätzung auch einer größeren Zahl von Stäuben möglich ist.

Die meisten Untersuchungen der von PM hervorgerufenen Effekte erfolgen durch Exposition von Zellen mit Staub *in vitro*. Dieses System birgt den großen Nachteil, daß die beobachteten Effekte jeweils nur die Auswirkungen auf den exponierten Zelltyp zeigen. Die komplizierten und umfangreichen Wechselwirkungen, die zwischen den Zellen des Immunsystems im Organismus bestehen, können hierbei nicht berücksichtigt und somit auch nicht untersucht werden, es handelt sich hierbei um ein sehr artifizielles System. Zudem erfolgte die Auswertung der meisten dieser *In-vitro*-Experimente durch die Messung der Zytokinproduktion im Überstand der Zellkulturen mittels ELISA, was nur die Untersuchung weniger Parameter zuläßt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Exposition mit einem bestimmten PM *in vivo* erfolgt in den meisten Fällen die Instillation des zu untersuchenden Staubes in die Trachea der Versuchstiere, gefolgt von der broncheo-alveolären Lavage, um die Zusammensetzung und Zytokinproduktion der Lymphozyten in den Atemwegen zu untersuchen. Dazu ist es erforderlich, die Lunge der Tiere zu präparieren, die Prozedur ist also sehr aufwendig und kann daher nur an einer beschränkten Zahl von Tieren durchgeführt werden. Daraus folgt, daß auch die Untersuchung einer größeren Zahl von Stäuben Probleme bereiten würde.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein System etabliert, das die Vorteile der *In-vivo*-Applikation mit einem vertretbaren Arbeitsaufwand vereint. Zu diesem Zweck wurde der PLN-Assay für die Untersuchung von Stäuben modifiziert. Aus den verschiedenen Stäuben wurden Suspensionen gleicher Konzentration in steriler physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und Mäusen in beide Fußsohlen injiziert. Nach unterschiedlichen Wartezeiten wurden die Zellzahlen und die Expression einer umfassenden Auswahl verschiedener Zytokine in den drainierenden poplitealen Lymphknoten (PLN) ermittelt, die typische Vertreter von sowohl Th1- als auch Th2-Reaktionen repräsentieren.

Anhand der Art des ermittelten Zytokinprofils, Th1 oder Th2, wurde entschieden, ob der untersuchte Staub eher die Entstehung von Entzündungsreaktionen, oder aber die Entstehung von Allergien zur Folge hat. Die Untersuchung der Zytokinexpression erfolgte mittels Durchflußzytometrie, die neben der Messung der Zytokinexpression auch Aussagen über die Art der beteiligten Zellen ermöglicht.

4.2.2 Hintergrundreaktionen unterschiedlicher Filtermaterialien

Vor der Injektion der Tiere mit unterschiedlichen Stäuben wurde jedoch zunächst der Einfluß des verwendeten Filtermaterials auf die beobachtete Reaktion untersucht. Zur Sammlung der Stäube kommen verschiedene Filtermaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften zur Verwendung. Aus der Literatur waren Hinweise bekannt, daß die verschiedenen Materialien unterschiedliche Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse haben (Dick, 2000), die Effekte zeigten sich nach der Instillation von Extrakten unbenutzter Filter *in vivo*.

Die zur Verfügung stehenden Stäube waren ebenfalls auf unterschiedlichen Filtern gesammelt worden. Um die resultierenden Effekte im PLN-Assay den Stäuben zuordnen und einen Einfluß des Filtermaterials auf die Ergebnisse ausschließen zu können, wurden die Hintergrundreaktionen der unterschiedlichen Filter ermittelt. Ein Teil der zur Verfügung stehenden Proben war auf Polyurethanfiltern (PU-Filtern) gesammelt worden. Über die Hintergrundreaktionen dieses Materials

waren keine Angaben verfügbar, daher war vor der Verwendung speziell dieser Proben zunächst die Untersuchung der Hintergrundreaktion im PLN-Assay erforderlich.

Das Ergebnis des PLN-Assays demonstriert einen sehr starken Effekt der Filter aus Nitrozellulose (NZ), während die Filter aus PTFE und PU die geringsten Nebeneffekte aufweisen (Abb. 26). Aus diesem Grund wurde entschieden, die Stäube, die auf NZ-Filtern gesammelt worden waren, nicht im PLN-Assay zu verwenden, da es die hohe Hintergrundreaktion unmöglich macht, zwischen den Effekten des Staubes und den Effekten des Filtermaterials zu unterscheiden. Dieses Ergebnis ist eigentlich wenig verwunderlich, da in früheren Arbeiten von Kubicka-Muranyi *et al.* (1995) bereits an NZ-Partikel adsorbierte Proteine zur *In-vitro*-Stimulation von T-Zellhybridomen verwendet wurden. Die starke Reaktion der NZ-Filter im PLN-Assay bestätigt die von Dick *et al.* (2000) nach der Instillation gemachten Beobachtungen. Davon abgesehen belegt der PLN-Assay, daß die Filter aus PU und PTFE besser zur Sammlung von Stäuben geeignet sind, die für die Verwendung in *In-vivo*-Assays vorgesehen sind. Die Verwendung der Filter mit dem geringstem Hintergrund kann helfen, eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten und Filtereffekte bereits durch die Auswahl des am besten geeigneten Filters auszuschließen.

Ein Hauptkritikpunkt an der Verwendung des PLN-Assays zur Untersuchung von Stäuben besteht darin, daß die Injektion in die Fußsohle nicht der natürlichen Route der Exposition entspricht. Die Arbeit von Dick *et al.* (2000) zeigt jedoch, daß die in der broncheo-alveolären Lavage und dem PLN-Assay beobachteten Effekte durchaus miteinander vergleichbar sind. Darüber hinaus vereint der PLN-Assay die Vorteile eines *In-vivo*-Assays, bei dem alle Zellen des Immunsystems vorhanden sind, mit der Möglichkeit, viele verschiedene Parameter in einem Experiment mit vergleichsweise geringem Aufwand zu untersuchen, während *in vitro* nur Aussagen über die Auswirkungen auf die verwendete Zellpopulation gemacht werden können. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß es sich hierbei um ein Modell mit einem frühen Endpunkt handelt, als Untersuchungsparameter dient die Expression von Zytokinen, und nicht die Ausbildung eines spezifischen Krankheitsbildes, wie zum Beispiel einer Entzündung oder einer Allergie. Dies macht auch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Stäuben in kurzer Zeit in diesem System möglich.

4.2.3 Verwendung des Modellstaubes SRM1648 zur Etablierung des PLN-Assays

Ein allgegenwärtiges Problem bei der Arbeit mit Umweltstäuben besteht in ihrer geringen Verfügbarkeit. Sogar Proben, die an derselben Stelle, aber zu unterschiedlichen Tageszeiten gesammelt werden, können sich bereits stark in ihren Eigenschaften unterscheiden. Dies ist verständlich, vergleicht man das Partikelauftreten zum Beispiel zur Hauptverkehrszeit mit dem in den Nachtstunden. Noch deutlicher fallen die Unterschiede zwischen Proben aus, die zu unterschiedlichen Jahreszeiten gesammelt werden. Zur Etablierung eines Modellsystems sind jedoch viele Wiederholungen mit leicht geänderten Parametern erforderlich, um sowohl die optimale Dosis, als auch den optimalen Zeitpunkt nach der Injektion für die Analyse der Zytokinproduktion zu ermitteln. Obwohl für die Untersuchung der Stäube im PLN-Assay nur sehr geringe Mengen im Vergleich mit anderen Systemen erforderlich sind, ist dennoch die Verfügbarkeit einer ausreichend großen Menge eines Staubes in gleichbleibender Beschaffenheit erforderlich. Daher wurde ein vergleichbarer Modellstaub mit ähnlichen Eigenschaften als Ersatz für gesammelte Stäube zur Etablierung des Systems gesucht. Die Wahl fiel auf SRM1648 der Firma NIST, einem in großen Mengen gesammelten, kommerziell erhältlichen Staub (St. Louis road dust). Dieser Staub wurde mit gleichen Mengen eines gesammelten PM₁₀, der freundlicherweise von F. Cassee (RIVM Bilthoven, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde, im PLN-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen.

4.2.4 SRM1648 und PM₁₀ induzieren vergleichbare Zytokinprofile

Das Ergebnis dieses Vergleiches zeigt, daß beide Stäube, PM₁₀ und SRM1648, vergleichbare Reaktionen im PLN-Assay auslösen (Abb. 27), beide zeigen ein vergleichbares Zytokinprofil, welches durch die Expression von IL-2, IFN- γ und TNF- α gekennzeichnet ist (Abb. 28). Unterschiede zeigen sich jedoch hinsichtlich der Kinetik der beobachteten Reaktion. Während sich mit SRM1648 das Maximum der Reaktion bereits nach drei Tagen einstellt, wird die maximale Zellzahl im PLN nach Applikation von PM₁₀ erst nach 7 Tagen erreicht (Abb. 27). Diese Beobachtung ist wichtig für den Vergleich verschiedener Stäube, denn das Ausbleiben einer Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt bedeutet nicht unbedingt, daß der untersuchte Staub keine Reaktion auslöst, möglicherweise ist nur der untersuchte Zeitpunkt falsch gewählt worden. Daher ist es immer erforderlich, die resultierende Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation zu untersuchen.

4.2.5 Adjuvanseffekt von PM bei der Induktion der Nickelallergie

In der Literatur existieren eindeutige Hinweise darauf, daß Stäube, wie zum Beispiel DEP (diesel exhaust particles) einen Adjuvanseffekt besitzen und sogar die Sensibilisierung naiver Individuen gegen Neoantigene über die Mukosa bewirken können (Diaz-Sanchez, 1999). Sogar CB-Partikel (carbon black particles) besitzen einen Adjuvanseffekt (van Zijverden, 2000). Unterstützt wird diese Beobachtung durch ein erhöhtes Vorkommen von Atemwegserkrankungen in Gebieten mit hoher Partikelbelastung, beispielsweise nahe Autobahnen (van Vliet, 1997). Eine japanische Studie zeigt, daß DEP an der Zunahme von Allergien gegen verbreitete Antigene beteiligt ist (Ishizaki, 1987). In der Maus wurde die Adjuvansfunktion von DEP bei der Sensibilisierung gegen OVA über verschiedene Routen, wie intraperitoneale Injektion (Muranaka, 1986), Inhalation (Takano, 1997), oder intranasale Instillation (Nilsen, 1997) nachgewiesen. Hinzu kommt, daß viele Stäube chemische Substanzen, darunter auch Metallionen wie Nickel, Eisen und Vanadium, auf ihrer Oberfläche tragen. Das bekannteste Beispiel ist ROFA (Lambert, 2000). Somit sind alle Bedingungen, die für die Sensibilisierung gegen Nickel benötigt werden, erfüllt. Die Stäube besitzen einen Adjuvanseffekt und tragen gleichzeitig Metallionen. Daher ist die Vermutung gerechtfertigt, daß die Stäube dazu in der Lage sind, als Adjuvans bei der Sensibilisierung gegen Nickel zu fungieren.

Für die Untersuchung dieser Frage wurden CB-Partikel (CBP) als Adjuvans zusammen mit Nickel injiziert (Abb. 29). Die Befunde zeigen, daß mit geringen Dosen CBP zusammen mit Ni²⁺ nur eine geringfügig erhöhte Ohrschwellung zu beobachten ist, die Unterschiede zu den Kontrollgruppen sind allerdings nicht signifikant. Wird jedoch eine sehr hohe Dosis CBP zusammen mit Ni²⁺ injiziert, kommt es zur Ausbildung einer deutlich erhöhten Ohrschwellung. Allerdings ist bei gleicher CBP-Dosis auch ohne Ni²⁺ bereits eine leicht erhöhte Ohrschwellung zu verzeichnen, die für eine starke systemische Stimulation allein aufgrund der durch die Injektion der Partikel bewirkten Entzündungsreaktion spricht. Die Anwesenheit von Ni²⁺ bei der Sensibilisierung bewirkt allerdings eine signifikante Zunahme der Ohrschwellung, was auf die Induktion der Hypersensibilisierung gegen Nickel hinweist.

Zusammenfassend kann die Aussage gemacht werden, daß Stäube, bzw. in diesem speziellen Fall CBP, tatsächlich die nötige Adjuvansfunktion für die Sensibilisierung von Mäusen gegen Nickel bereitstellen können, wenn auch eine sehr hohe Dosis dafür erforderlich ist.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der Nickeltoleranz an einem Mausmodell untersucht. In diesem Modell ist es möglich, in den Tieren durch die orale Applikation von Ni^{2+} im Trinkwasser Toleranz zu induzieren. Diese Toleranz kann durch den Transfer von Milzzellen auf naive Empfänger übertragen werden. Tolerante Mäuse oder Empfänger toleranter Zellen lassen sich nicht mehr gegen Nickel sensibilisieren. Laut Literatur erfolgt die Aktivierung der Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten der Eintrittsstelle des Allergens. Nach ihrer Aktivierung wandern sie in die Milz und sorgen dort für die infektiöse Verbreitung der Toleranz. Daher wurden Unterschiede in den Zytokinprofilen toleranter und naiver Tiere in diesen Organen vermutet. Die Induktion der Nickelallergie sollte von Th1-orientierten inflammatorischen Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$ und IL-2 begleitet werden, während bei Induktion der Toleranz Th2-gerichtete Zytokine wie IL-10 oder TGF- β erwartet werden. In der Tat zeigen Empfänger von naiven Zellen nach der Sensibilisierung eine Aufregulierung von $\text{IFN-}\gamma$ in den Lymphknoten, nicht jedoch die Empfänger toleranter Zellen. Völlig unerwartet stellt sich die Situation in der Milz dar, dort wird eine erhöhte Expression von $\text{IFN-}\gamma$ bei den Empfängern toleranter Zellen beobachtet. Keine Veränderung zeigte sich für IL-10. Offensichtlich ist $\text{IFN-}\gamma$ ein kritischer Parameter für die Entscheidung zwischen Toleranz und Sensibilisierung. Die hohe $\text{IFN-}\gamma$ -Expression impliziert eine mögliche Beteiligung des Trp-abbauenden EnzymsIDO und des Trp-Katabolismus an der Induktion der Nickeltoleranz. Der Umsatz von Trp inhibiert die Proliferation von T-Effektorzellen, während die Metabolite die selektive Apoptose von Th1-Zellen auslösen, was die Bildung von Th2- und Treg-Zellen begünstigt. Die Induktion von IDO konnte in DZ durch Behandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ gezeigt werden.

Die Induktion der Nickeltoleranz erfordert die Expression von FasL auf T-Zellen und von Fas auf B-Zellen, die T-Zellen lösen die Apoptose der B-Zellen aus. Ältere Daten der Arbeitsgruppe zeigen, daß auch NKT-Zellen, die die Zytokine IL-4 und IL-10, sowie FasL exprimieren müssen, an der Induktion der Nickeltoleranz beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, daß im speziellen die NKT-Zellen die Apoptose der B-Zellen induzieren. Der in dieser Arbeit etablierte Zell-freie Transfer der Toleranz mit apoptotischen Vesikeln separierter B-Zellen demonstriert, daß die Induktion der B-Zellapoptose nicht die einzige Funktion der NKT-Zellen ist, denn die Toleranz kann nicht auf NKT-Zell-defiziente Empfänger übertragen werden. Das beweist, daß NKT-Zellen weitere Funktionen innehaben, die an die Induktion der B-Zellapoptose anschließen. Denkbar wäre ein Beitrag der Zytokine zur Ausbildung einer spezifischen Mikroumgebung, die zur tolerogenen Antigenpräsentation durch die DZ führt, oder auch der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen NKT-Zellen und DZ über CD1d, der zur Stimulierung der NKT-Zellen dienen könnte. Auch könnten die NKT-Zellen die Apoptose weiterer Zellen induzieren. Durch den Transfer von "apoptotic bodies" besteht zum ersten Mal die Möglichkeit, gezielt die Funktion der NKT-Zellen zu untersuchen, da die Übertragung der Toleranz Zell-frei erfolgt und somit der Einfluß weiterer Zellen ausgeschlossen werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Analyse von Umweltstäuben im PLN-Assay etabliert, um eine Risikoabschätzung für beliebige Stäube *in vivo* vornehmen zu können. Dieser Assay vereint die Vorteile der *In vivo*-Applikation mit einem frühen Endpunkt, bei dem die Expression der Zytokine in den Lymphknoten nach Injektion von Staubsuspensionen analysiert wird. In diesem System wurden zunächst die Hintergrundreaktionen verschiedener Filtermaterialien miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß NZ-Filter eine starke PLN-Antwort auslösen und daher nicht zur Sammlung von Stäuben, die *in vivo* analysiert werden sollen, geeignet sind. Da ein beständiges Problem bei der Arbeit mit Stäuben in der limitierten Verfügbarkeit besteht, wurde ein kommerziell erhältlicher Staub als Modellstaub etabliert. Dieser Staub zeigte im PLN-Assay die Expression eines ähnlichen Th1-Zytokinprofils verglichen mit einem PM_{10} aus der Umwelt. Es ist bekannt, daß Stäube Adjuvanswirkung besitzen, außerdem tragen viele Stäube Metallionen, unter anderen auch Nickel, auf ihrer Oberfläche. Deshalb wurde im beschriebenen Mausmodell untersucht, ob Stäube als Adjuvans bei der Induktion der Nickelallergie wirken können. In der Tat konnte bei Verwendung einer hohen Dosis Partikel zusammen mit Ni^{2+} eine Sensibilisierung gegen Nickel beobachtet werden.

Referenzen

- Agostini C., Calabrese F., Rea F., Facco M., Tosoni A., Loy M., Binotto G., Valente M., Trentin L. und Semenzato G. (2001). CXCR3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am. J. Pathol.* 158:1703.
- Akbari O., DeKruyff R.H. und Umetsu D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2:725-731.
- Albert M.L. et al. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\upsilon\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359-1368.
- Albert M.L., Jegathesan M. und Darnell R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2:1010.
- Albert M.L., Sauter B. und Bhardwaj N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86.
- Alegre M.L., Frauwirth K.A. und Thompson C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 3:220.
- Alpan O., Rudomen G. und Matzinger P. (2001). The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J. Immunol.* 166:4843-4852.
- Anderson H.R., Limb E.S., Bland J.M., Ponce de Leon A., Strachan D.P. und Bower J.S. (1995). Health effects of an air pollution episode in London, December 1991. *Thorax* 50:1188-1193.
- Anderson J.K. (2001). Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death? *Bioessays* 23:640-646.
- Apostolou I., Takahama Y., Belmont C., Kawano T., Huerre M., Marchal G., Cui J., Taniguchi M., Nakauchi H., Fournie J.J. et al. (1999). Murine natural killer T (NKT) cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5141.
- Araki M., Kondo T., Gumperz J.E., Brenner M.B., Miyake S. und Yamamura T. (2003). Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* 15:279-288.
- Arend W.P. und Massoni R.J. (1986). Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 64:656-664.
- Artik S., von Vultée C., Gleichmann E., Schwarz T. und Griem P. (1999). Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of Nickel at higher oxidation states. *J. Immunol.* 163:1143.
- Artik S., Haarhuis K., Wu X., Begerow J. und Gleichmann E. (2001). Tolerance to nickel: oral administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. *J. Immunol.* 167:6794.
- Azzawi M. und Hasleton P. (1999). Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc. Res.* 43:850-859.
- Bailly S., Ferrua B., Fay M. und Gougerot-Pocidallo M.A. (1990). Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* 2:205-210.
- Bal W., Christodoulou J., Sadler P.J. und Tucker A. (1998). Multi-metal binding site of serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* 70:33.
- Banchereau J. et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau J. und Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- Banz A., Pontoux C. und Papiernik M. (2002). Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J. Immunol.* 169:750-757.
- Barclay A.N., Wright G.J., Brooke G. und Brown M.H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23:285.
- Basketter D.A., Briatico Vangosa G., Kaestner W., Lally C. und Bontinck W.J. (1993). Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis* 28:15.
- Basketter D., Dooms-Goossens A., Karlberg A.-T. und Lepoittevin J.-P. (1995). The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* 32:65.

- Baxter A.G., Kinder S.J., Hammond K.J.L., Scollay R. und Godfrey D.I. (1997). Association between $\alpha\beta$ TCR⁺CD4⁺CD8⁻ T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46:572-582.
- Beaudoin L., Laloux V., Novak J., Lucas B. und Lehuen A. (2002). NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17:725-736.
- Becker S., Soukup J.M., Gilmour M.I. und Devlin, R.B. (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: Effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141:637-648.
- Bedner E., Li X., Gorczyca W., Melamed M.R. und Darzynkiewicz Z. (1999). Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35:181-195.
- Behrendt H., Becker W.M., Fritzsche C., Sliwa-Tomczok W., Friedrichs K.H. und Ring J. (1997). Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:69-74.
- Bellone M., Iezzi G., Rovere P., Galati G., Ronchetti A., Protti M.P., Davoust J., Rugarli C. und Manfredi A.A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J. Immunol.* 159:5391.
- Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Miller J.F., Jones C., Lejon K., Fathman C.G., Mueller S.N., Shortman K., Carbone F.R. und Heath W.R. (2002). The CD8 α ⁺ dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* 196:1099.
- Bendelac A. (1995). Mouse NK1⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 7:367.
- Bendelac A., Lantz O., Qimby M., Yewdell J., Bennink J. und Brutkiewicz R. (1995). CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Science* 268:863.
- Bendelac A., Rivera M.N., Park S.H. und Roark J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:535.
- Bendelac A. et al. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 1:177-186.
- Bendelac A., Teyton L. und Savage P.B. (2002). Lipid presentation by CD1: the short and the long lipid story. *Nat. Immunol.* 3:421.
- Bilsborough J., George T.C., Noment A. und Viney J.L. (2003). Mucosal CD8 α ⁺ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108:481-492.
- Blankenstein T. und Schuler T. (2002). Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough? *Trends Immunol.* 23:171-173.
- Bömmel H., Li-Weber M., Serfling E. und Duschl A. (2000). The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:796-802.
- Bodaghi B., Goureau O., Zipeto D., Laurent L., Virelizier J.L. und Michelson S. (1999). Role of IFN- γ -induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J. Immunol.* 162:957.
- Bonifaz L. et al. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8(+) T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196:1627-1638.
- Booker J.K., Reap E.A. und Cohen P.L. (1998). Expression and function of Fas on cells damaged by gamma irradiation in B6 and B6/lpr mice. *J. Immunol.* 161:4536-4541.
- Bour H., Peyron E., Gaucherand M., et al. (1995). Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T-cells and class II-restricted CD4⁺ T-cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 25:3006-3010.
- Brawley J.V. und Concannon P. (1996). Modulation of promiscuous T cell receptor recognition by mutagenesis of CDR2 residues. *J. Exp. Med.* 183:1043.
- Bridoux F. et al. (1997). Transforming growth factor beta (TGF-beta)-dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4(+) T cell lines. *J. Exp. Med.* 185:1769-1775.
- Brigl M. und Brenner M.B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* 22:817.

- Brunner M.C., Chambers C.A., Chan F.K., Hanke J., Winoto A. und Allison J.P. (1999). CTLA-4 mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162:5813.
- Budinger L. und Hertl M. (2000). Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy* 55:108-115.
- Burdin N., Brossay L. und Kronenberg M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* 29:2014-2025.
- Burke F., Knowles R.G., East N. und Balkwill F.R. (1995). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumor activity of human interferon- γ in vivo. *Int. J. Cancer* 60:115-122.
- Cambi A. et al. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33:532-538.
- Cameron M.J. et al. (1997). IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J. Immunol.* 159:4686-4692.
- Campbell D.J., Kim C.H. und Butcher E.C. (2001). Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat. Immunol.* 2:876.
- Carlin J.M., Borden E.C. und Byrne G.I. (1989). Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J. Interferon Res.* 9:329-337
- Carlin J.M., Borden E.C., Sondel P.M. und Byrne G.I. (1987). Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J. Immunol.* 139:2414-2418.
- Carlin J.M., Borden E.C., Sondel P.M. und Byrne G.I. (1989). Interferon-induced Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* 45:29-34.
- Carter J.D., Ghio A.J., Samet J.M. und Devlin R.B. (1997). Cytokine production by human epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146:180-188.
- Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I. und Banchereau J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180: 1263.
- Cavani A., Mei D., Guerra E., Corinti S., Giani M., Pirotta L., Puddu P. und Girolomoni G. (1998). Patients with allergic contact-dermatitis to nickel and non-allergic individuals display different nickel-specific T cell responses: evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. *J. Invest. Dermatol.* 111:621-628.
- Cavani A., Albanesi C., Traidl C., Sebastiani S. und Girolomini G. (2001). Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol.* 22:118-120.
- Cederbom L., Bandeira A., Coutinho A. und Ivars F. (1998). Naturally activated CD4⁺ T cells as highly enriched for cytokine-producing cells. *Eur. J. Immunol.* 28:1934-1940.
- Cederbom L., Hall H. und Ivars F. (2000). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 30:1538.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. und Alber G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747-752.
- Chai J.G., Bartok I., Chandler P., Vendetti S., Antoniou A., Dyson J. und Lechler R. (1999). Anergic T cells act as suppressor cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 29:686-692.
- Chambers C.A. und Allison J.P. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 11:203.
- Chambers C.A., Kuhns M.S. und Allison J.P. (1999). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4⁺ T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8603.
- Chan A., Seguin R., Magnus T., Papadimitriou C., Tokya K.V., Antel J.P. und Gold R. (2003). Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43:231-242.
- Chang M.-K., Bergmark C., Laurila A., Hörkö S., Han K.-H., Friedman P., Dennis E.A. und Witztum J.L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidization-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6353.

- Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S. et al. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3:337-343.
- Chen H. und Paul W.E. (1997). Cultured CD4⁺ NK1.1⁺ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN- γ upon activation by anti-CD3 or CD1. *J. Immunol.* 159:2240.
- Chien Y. and Davis M.M. (1993). How $\alpha\beta$ T-cell receptors see peptide/MHC complexes. *Immunol. Today* 14:597.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M. und Green D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010-1014.
- Chothia C., Ross Boswell D. and Lesk A.M. (1988). The outline structure of the T-cell $\alpha\beta$ receptor. *EMBO J.* 7:3745.
- Christen U., Wolfe T., Mohrle U., Hughes A.C., Rodrigo E., Green E.A., Flavell R.A. und von Herrath M.G. (2001). A dual role for TNF- α in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J. Immunol.* 166:7023-7032.
- Christoskova S.G., Danova N., Georgieva M., Argirov O.K. und Mehandzhiev D. (1995). Investigations of a nickel oxide system for heterogenous oxidation of organic compounds. *Appl. Catalysis A: General* 128:219.
- Chu J.-L., Drappa J., Parnassa A. und Elkon K.B. (1993). The defect in *Fas* mRNA expression in MRL/*lpr* mice is associated with insertion of the retrotransposon. *ETN. J. Exp. Med.* 178:723-730.
- Clare-Salzler M.J., Brooks J., Chai A., Van Herle K. und Anderson C. (1992). Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic-cell transfer. *J. Clin. Invest.* 90:741-748.
- Clark D.A., Keil A., Chen Z., Markert U., Manuel J. und Gorczynski R.M. (2003). Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2). *Am. J. Reprod. Immunol.* 50:187.
- Cobbold S. und Waldmann H. (1998). Infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 10:518-524.
- Corinti S., Albanesi C., la Sala A., Pastore S. und Girolomoni G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* 166:4312.
- Costa D.L. und Dreher K.L. (1997). Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and comprised animal models. *Environ. Health Perspec.* 105 Suppl. 5:1053-1060.
- Crowe N.Y., Smyth M.J. und Godfrey D.I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* 196:119-127.
- Crowe N.Y. et al. (2003). Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J. Immunol.* 171:4020-4027.
- Cua D.J. (1999). Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 189:1005-1010.
- D'Andrea A. et al. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178:1041-1048.
- Daniels A.U., Barnes F.H., Charlebois S.J. und Smith R.A. (2000). Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res.* 49:469-478.
- Davis M.M. and Bjorkman P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395.
- De Smedt T., Butz E., Smith J., Maldonado-Lopez R., Pajak B., Moser M. und Maliszewski C. (2001). CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells undergo phenotypic and functional maturation *in vitro* and *in vivo*. *J. Leukocyte Biol.* 69:951.
- Devalia J.L., Rusznak C., Wang J., Khair O.A., Abdelaziz M.M., Calderon M.A und Davies R.J. (1996). *Toxicol. Lett.* 86:169-176.
- Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., Munz C. und Bhardwaj N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T-cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:233-238.
- Diaz-Sanchez D., Tsien A., Fleming J. und Saxon A. (1997a). Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human *in vivo* nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper 2-type pattern. *J. Immunol.* 158:2406-2413.

- Diaz-Sanchez D., Penichet Garcia M., Wang M., Jyrala M. und Saxon A. (1999). Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:1183-1188.
- Dick C.A.J., Stone V., Brown D.M., Watt M., Cherrie J.W., Howarth S., Seaton A. und Donaldson K. (2000). Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment* 34:2587-2592.
- Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T. und Schuler G. (2001). *Ex vivo* isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193:1303-1310.
- Dockery D.W., Pope A.C.D., Xu X., Spengler J.D., Ware J.H., Fay M.E., Ferris B.G. Jr. und Speizer F.E. (1993). An association between air pollution and mortality in six cities. *N. Engl. J. Med.* 329:1753-1759.
- D'Orazio T.J., Mayhew E. und Niederkorn J. (2001). Ocular immune privilege promoted by the presentation of peptide on tolerogenic B cells in the spleen. II. Evidence for presentation by Qa-1. *J. Immunol.* 166:26.
- Dreher K.L., Jaskot R.H., Lehmann J.R., Richards J.H., McGee J.K., Ghio A.J. und Costa, D.L. (1997). Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health* 50:285-305.
- Driscoll K.E., Carter J.M., Hassenbein D.G. und Howard B. (1997b). Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ. Health Perspect.* 105(Suppl. 5):1159-1164.
- Duchmann R., Neurath M.F. und Meyer zum Buschenfelde K.H. (1997). Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res. Immunol.* 148:589-594.
- Duchmann R., Schmitt E., Knolle P., Meyer zum Buschenfelde K.H. und Neurath M. (1996). Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* 26:934-938.
- Dufour J.H., Dziejman M., Liu M.T., Leung J.H., Lane T.E. und Luster A.D. (2002). IFN- γ inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol.* 168:3195.
- Dye J.A., Adler K.B., Richards J.H. und Dreher K.L. (1999). Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am J. Physiol.* 277:L498-L510.
- Eagar T.N., Turley D.M., Padilla J., Karandikar N.J., Tan L., Bluestone J.A. und Miller S.D. (2004). CTLA-4 regulates expansion and differentiation of Th1 cells following induction of peripheral T cell tolerance. *J. Immunol.* 172:7442-7450.
- Eberl G., Lees R., Smiley S.T., Taniguchi M., Grusby M.J., und MacDonald H.R. (1999). Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol.* 162:6410.
- Elewaut D., Shaikh R.B., Hammond K.J., De Winter H., Leishman A.J., Sidobre S., Turovskaya O., Prigozy T.I., Ma L., Banks T.A. et al. (2003). NIK-dependent RelB activation defines a unique signaling pathway for the development of V α 14i NKT cells. *J. Exp. Med.* 197:1623.
- Engering A. et al. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168:2118-2126.
- Fadok V.A. und Henson P.M. (1998). Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr. Biol.* 8:693-674.
- Fadok V.A., Warner M.L., Bratton D.L. und Henson P.M. (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J. Immunol.* 161:6250-6257.
- Fahy O., Hamad H., Sénéchal S., Pestel J., Tonnel A.B., Wallaert B. und Tsicopoulos A. (2000). Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: Involvement of the map kinase pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 23:247-254.
- Falcone M. und Sarvetnick N. (1999). Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 11:670-676.
- Fallarino F., Asselin-Paturel C., Vacca C., Bianchi R., Gizzi S., Fioretti M.C., Trinchieri G., Grohmann U. und Puccetti P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* 173:3748-3754.
- Fallarino F., Fields P.E. und Gajewski T.F. (1998). B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med.* 188:205-210.

- Fallarino F., Grohmann U., Hwang K.W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Alegre M.L. und Puccetti P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:1206-1212.
- Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9:1069-1077.
- Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2003). T cell apoptosis by kynurenines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527:183-190.
- Fallarino F., Vacca C., Orabona C., Belladonna M.L., Bianchi R., Marshall B., Kerskin D.B., Mellor A.L., Fioretti M.C., Grohmann U. und Pucetti P. (2002). Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 α^+ dendritic cells. *Int. Immunol.* 14:65-68.
- Fan H., Longacre A., Meng F., Patel V., Hsiao K., Koh J.S. und Levine J.S. (2004). Cytokine dysregulation induced by apoptotic cells is a shared characteristic of macrophages from nonobese diabetic and systemic lupus erythematosus-prone mice. *J. Immunol.* 172:4834-4843.
- Faulkner L., Buchan G. und Baird M. (2000). Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* 99:523-531.
- Faunce D.E., Sonoda K.H. und Stein-Streilein J. (2001). MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J. Immunol.* 166:313-321.
- Faunce D.E. und Stein-Streilein J. (2002). NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8 $^+$ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J. Immunol.* 169:31-38.
- Faunce D.E., Terajewicz A. und Stein-Streilein J. (2004). Cutting edge: *in vitro*-generated tolerogenic APC induce CD8 $^+$ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 172:1991-1995.
- Fecteau S. et al. (2001). CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nature Immunol.* 2:58-63.
- Ferguson T.A., Herndon J., Elzey B., Griffith T.S., Schoenberger S. und Green D.R. (2002). Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8 $^+$ T cells produce active immune unresponsiveness. *J. Immunol.* 168:5589.
- Fields B.A., Malchiodi E.L., Li H., Ysem X., Stauffacher C.V., Schlievert P.M., Karjalainen K. und Mariuzza R.A. (1996). Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with superantigen. *Nature* 384:188.
- Fillatreau S., Sweeney C.H., McGeachy M.J., Gray D. und Anderton S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunol.* 3:944-950.
- Finger E.B. und Bluestone J.A. (2002). When ligand becomes receptor – tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat. Immunol.* 3:1056.
- Finkelstein J.N., Johnston C., Barrett T. und Oberdörster G. (1997). Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression. *Environ. Health Perspect.* 105(Suppl. 5):1179-1182.
- Fischer K. et al. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:10685-10690.
- Forster R., Mattis A.E., Kremmer E., Wolf E., Brem G. und Lipp M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87:1037.
- Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf. E. und Lipp M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23.
- Frampton M.W., Ghio A.J., Samet J.M., Carson J.L., Carter J.D. und Devlin R.B. (1999). Effects of aqueous extracts from the Utah Valley on human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277:L960-L967.
- Frasca L. et al. (1997). Anergic T cells effect linked suppression. *Eur. J. Immunol.* 27:3191-3197.
- Frasca L., Scottà C., Lombardi G. und Piccolella E. (2002). Human anergic CD4 $^+$ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival. *J. Immunol.* 168:1060-1068.
- Fraser J.D., Irving B.A., Grabtree G.R und Weiss A. (1991). Regulation of Interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251: 313-316.

- Fridman J.S. und Lowe S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040.
- Frucht D.M. et al. (2001). IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22:556-560.
- Fujigaki S., Saito K., Sekikawa K., Tone S., Takikawa O., Fujii H., Wada H., Noma A. und Seishima M. (2001). Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 31:2313-2318.
- Fujimaki H., Nohara O., Ichinose T., Watanabe N. und Saito S. (1994). IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology* 92:261-268.
- Fujimaki H., Saneyoshi K., Shiraishi F., Imai T. und Endo T. (1997). Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology* 116:227-233.
- Fukasawa M., Adachi H., Hirota K., Tsujimoto M., Arai H. und Inoue K. (1996). SRB1, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 222:246.
- Galluci S. und Matzinger P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13:114-119.
- Gamerding K., Moulon C., Karp D.R., Van Bergen J., Koning F., Wild D., Pflugfelder U. und Weltzien H.U. (2003). A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J. Exp. Med.* 197:1345.
- Garboczi D.N., Ghosh P., Utz U., Fan Q.R., Biddison W.E. und Wiley D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134.
- Garcia K.C., Degano M., Pease L.R., Huang M., Peterson P.A., Teyton L. und Wilson I.A. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279:1166.
- Garcia K.C., Degano M., Stanfield R.L., Brunmark A., Jackson M.R., Peterson P.A., Teyton L. und Wilson I.A. (1996). An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274:209.
- Gausling R., Trollmo C. und Hafler D.A. (2001). Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4⁺CD8⁻V α 24J α Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 98:11-17.
- Gavin M.A. et al. (2002). Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 3:33-41.
- Geijtenbeek T.B. et al. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 197:7-17.
- Gilliet M. und Liu Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:695-704.
- Girolomoni G., Sebastiani S., Albanesi C. und Cavani A. (2001). T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 13:733.
- Glennon J.D. und Sarkar B. (1982). The non-specificity of dog serum albumin and the N-terminal model peptide glycylglycyl-L-tyrosine N-methylamide for nickel is due to a lack of histidine in the third position. *Biochem. J.* 203:25.
- Glimcher L.H., McKean D.J., Choi E. und Seidman J.G. (1985). Complex regulation of class II gene expression: analysis with class II mutant cell lines. *J. Immunol.* 135:3542-3550.
- Godfrey D.I. und Kronenberg M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 114:1379-1388.
- Gombert J.M., Herbelin A., Tancredebohin E., Dy M., Carnaud C. und Bach J.F. (1996). Early quantitative and functional deficiency of NK1⁺-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 26:2989-2998.
- Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruna-Romero O., Nakayama T., Taniguchi M., Bendelac A., Van Kaer L., Koezuka Y. und Tsuji M. (2000). α -Galactosylceramide-activated V α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8461.
- Gorczynski R.M., Chen Z., Yu K. und Hu J. (2001). CD200 immunoadhesin suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Immunol.* 101:328.
- Gorczynski R.M., Hadidi S., Yu G. und Clark D.A. (2002). The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48:18.

- Grabbe S. und Schwarz T. (1998). Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19:37.
- Grant R.S., Naif H., Thuruthyl S.J., Nasr N., Littlejohn T., Takikawa O. und Kapoor V. (2000). Induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *J. Virol.* 74:4110.
- Granum B., Gaarder P.I., Groeng E.C., Leikvold R.B., Namork E. und Lovik M. (2001a). Fine particles of widely different composition have an adjuvant effect on the production of allergen-specific antibodies. *Toxicol. Lett.* 118:171-181.
- Granum B., Gaarder P.I. und Lovik M. (2001b). IgE adjuvant effect caused by particles – immediate and delayed effects. *Toxicology* 156:149-159.
- Green E.A. und Flavell R.A. (2000). The temporal importance of TNF- α expression in the development of diabetes. *Immunity* 12:459-469.
- Greenwald R.J., Boussiotis V.A., Lorschach B., Abbas A.K. und Sharpe A.H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14:145.
- Griem P., Panthel K., Kalbacher H. und Gleichmann E. (1996). Alteration of a model antigen by Au(III) leads to T-cell sensitization to cryptic peptides. *Eur. J. Immunol.* 26:279-287.
- Griem P., Vonvultee C., Panthel K., Best S.L., Sadler P.J. und Shaw C.F. (1998). T-cell-cross-reactivity to heavy-metals – identical cryptic peptides may be presented from protein exposed to different metals. *Eur. J. Immunol.* 28:1941-1947.
- Griem P., Wulferink M., Sachs B., González J. und Gleichmann E. (1998). Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol. Today* 19:133.
- Grohmann U. et al. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- κ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 9:315-323.
- Grohmann U., Bianchi R., Belladonna M.L., Silla S., Fallarino F., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2000). IFN- γ inhibits presentation of a tumor/self peptide by CD8 α^+ dendritic cells via potentiation of the CD8 α^+ subset. *J. Immunol.* 165:1357-1363.
- Grohmann U., Bianchi R., Orabona C., Fallarino F., Vacca C., Micheletti A., Fioretti M.C. und Pucetti P. (2003). Functional plasticity of dendritic cell subsets as mediated by CD40 versus B7 activation. *J. Immunol.* 171:2581.
- Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R., Belladonna M.L., Vacca C., Orabona C., Uyttenhove C., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2001). IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 α^+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.* 167:708-714.
- Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R., Orabona C., Vacca C., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2003). A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 198(1):153-160.
- Grohmann U., Fallarino F. und Puccetti P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24:242-248.
- Grohmann U.F., Fallarino F., Silla S., Bianchi R., Belladonna M.L., Vacca C., Micheletti A., Fioretti M.C. und Pucetti P. (2001). CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J. Immunol.* 166:277.
- Grohmann U., Orabona C., Fallarino F., Vacca C., Calcinaro F., Falorni A., Candeloro P., Belladonna M.L., Bianchi R., Fioretti M.C. und Puccetti P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3:1097.
- Groux H. et al. (1997). A CD4 $^+$ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Groux H. und Powrie F. (1999). Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol. Today* 20:442-445.
- Grubor-Bauk B., Simmons A., Mayrhofer, G. und Speck P.G. (2003). Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V α 14-J α 281 TCR. *J. Immunol.* 170:1430-1434.
- Gumperz J.E., Roy C., Makowska A., Lum D., Sugita M., Podrebarac T., Koezuka Y., Porcelli S.A., Cardell S., Brenner M.B. und Behar S.M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12:211-221.

- Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T. und Brenner M.B. (2002). Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195:625-636.
- Hameg A., Gouarin C., Gombert J.M., Hong S., van Kaer L., Bach J.F. und Herbelin A. (1999). IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1⁺ and NK1.1⁻ MHC class I-like/CD1-dependent CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 162:7067-7074.
- Hammond K.J.L. und Kronenberg M. (2003). Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.* 15:683-689.
- Hammond K.J., Pelikan S.B., Crowe N.Y., Randle-Barrett E., Nakayama T., Taniguchi M., Smyth M.J., van Diel I.R., Scollay R., Baxter A.G. und Godfrey D.I. (1999). NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* 29:3768.
- Hammond K.J.L., Poulton L.D., Palmisano L.J., Silveira P.A., Godfrey D.J. und Baxter A.G. (1998). α/β -T cell receptor (TCR)⁺CD4⁺CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 187:1047-1056.
- Han H.S. et al. (1996). A new type of CD4⁺ suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet-transplanted NOD mice. *J. Autoimmun.* 9:331-339.
- Hanahan D. (1998). Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:656-662.
- Hancock W.W., Lu B., Gao W., Csizmadia V., Faia K., King J.A., Smiley S.T., Ling M., Gerard N.P. und Gerard C. (2000). Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.* 192:1515.
- Hansen D.S., Siomos M.A., Buckingham L., Scalzo A.A. und Schofield L. (2003). Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 18:391-402.
- Hara Y., Caspi R.R., Wiggert B., Dorf M. und Streilein J.W. (1992). Analysis of an in vitro-generated signal that induces systemic immune deviation similar to that elicited by antigen injected into the anterior chamber of the eye. *J. Immunol.* 149:1531.
- Harada M. et al. (2004). Down-regulation of invariant V α 14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int. Immunol.* 16:241-247.
- Hartwig A. (2001). Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3:625.
- Hawiger D. et al. (2001). Dendritic cells induce peripheral T-cell unresponsiveness under steady-state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194:769-779.
- Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H., van Kaer L., Saiki I. und Okamura K. (2001). Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J. Immunol.* 166:6012-6018.
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A. et al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T. et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
- Hemmi H., Yoshino M., Yamazaki H. et al. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol.* 13:695-704.
- Heo Y., Saxon A. und Hankinson O. (2001). Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology* 159:143-158.
- Herbelin A. et al. (1998). Mature mainstream TCR alpha beta⁺CD4⁺ thymocytes expressing L-selectin mediate 'active tolerance' in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* 161:2620-2628.
- Heyes M.P., Saito K., Lackner A., Wiley C.A., Achim C.L. und Markey S.P. (1998). Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J.* 12:881-896.
- Higuchi M., Zeng D., Shizuru J., Gworek J., Dejbakhsh-Jones S., Taniguchi M. und Strober S. (2002). Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion. *J. Immunol.* 169: 5564-5570.
- Hill L.L., Shreedhar V.K., Kripke M.L. und Owen-Schaub L.B. (1999). A critical role for Fas Ligand in the active suppression of systemic immune responses by Ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 189:1285-1293.

- Hoek R.M., Ruuls S.R., Murphy C.A., Wright G.J., Goddard R., Zurawski S.M., Blom B., Homola M.E., Streit W.J., Brown M.H. et al. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768.
- Hong S., Wilson M.T., Serizawa I., Wu L., Singh N., Naidenko O.V., Miura T., Haba T., Scherer D.C., Wei J., Kronenberg M., Koezuka Y. and Van Kaer L. (2001). The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. med.* 7:1052-1056.
- Hostynek J.J., Dreher F., Pelosi A., Anigbogu A. und Maibach H.I. (2001). Human stratum corneum penetration by nickel: in vivo study of depth distribution after occlusive application of the metal as powder. *Acta. Derm. Venerol. Suppl.* (Stockh.) 212:5.
- Hsieh C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., Wolf S.F., O'Garra A. and Murphy K.M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547.
- Huang F.P., Platt N., Wykes M. et al. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191:435-444.
- Hucke C., MacKenzie C.R., Adjogble K.D.Z., Takikawa O. und Daubener W. (2004). Nitric oxide-mediated regulation of interferon- γ -induced bacteriosis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 72:2723-2730.
- Husemann J., Loike J.D., Anankov R., Febbraio M. und Silverstein S.C. (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40:195-205.
- Hwu P., Du M.X., Lapointe R., Do M., Taylor M.W. und Young H.A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 164:3596-3599.
- Ihara T., Yamamoto T., Sugamata M., Okumura H. und Ueno Y. (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic bodies. *Virchows Arch.* 433:443-447.
- Illes Z., Kondo T., Newcombe J., Oka N., Tabira T. und Yakamura T. (2000). Differential expression of NK T cell V α 24-J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* 164:4375-4381.
- Imrich A., Ning Y.Y. und Kobzik L. (2000). Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167:140-150.
- Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S. und Steinman R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.
- Inaba K. et al. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* 191:927-936.
- Inaba K., Turley S., Yamaide F., Iyoda T., Mahnke K., Inaba M., Pack M., Subklewe M., Sauter B. und Sheff D. (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 188:2163-2173.
- Ishigami M., Nishimura H., Naiki Y., Yoshioka K., Kawano T., Tanaka Y., Taniguchi M., Kakumu S. und Yoshikai Y. (1999). The roles of intrahepatic V α 14⁺ NK1.1⁺ T cells for liver injury induced by *Salmonella* infection in mice. *Hepatology* 29:1799.
- Ishii N., Moriguchi N., Nakajima H., Tanaka S. und Amemiya F. (1993). Nickel sulfate-specific suppressor T cells induced by nickel sulfate in drinking water. *J. Dermatol. Sci.* 6:159.
- Ishizaki T., Koizumi K., Ikemori R., Ishiyama Y. und Kushibiki E. (1987). Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann. Allergy* 58:265-270.
- Isler P., de Rochemonteix B.G., Songeon F., Boehringer N. und Nicod L.P. (1999). Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:270-278.
- Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu I., Shimizu J., Otsuka F. und Sakaguchi S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162:5317-5326.
- Iwasaki A. und Kelsall B.L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 190:229-239.

- Jacob C.O., Aisu S., Michie S.A., McDevitt H.O. und Acha-Orbea H. (1990). Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF- α and interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:968.
- Jahng A.W., Maricic I., Pedersen B., Burdin N., Naidenko O., Kronenberg M., Koezuka Y. und Kumar V. (2001). Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 194:1789-1799.
- Jenkins M.K. und Schwartz R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302-319.
- Jiang H. und Chess L. (2000). The specific regulation of immune responses by CD8⁺ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu. Rev. Immunol.* 18:185.
- Johnston B. und Butcher E.C. (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin. Immunol.* 14:83.
- Johnston B., Kim C.H., Soler D., Emoto M. und Butcher E.C. (2003). Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR $\alpha\beta$ NKT cell subsets. *J. Immunol.* 171:2960-2969.
- Jordan M.S. et al. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2:301-306.
- Jorgensen J.L., Esser U., Fazekas de St. Groth B., Reay P.A. and Davis M.M. (1992). Mapping T cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355:224.
- Kagan V.E., Gleiss B., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Elenstrom-Magnusson C., Liu S.X., Serinkan F.B., Arroyo A., Chandra J., Orrenius S., et al. (2002). A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 169:487-499.
- Kakimi K., Guidotti L.G., Koezuka Y. und Chisari F.V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Exp. Med.* 192:921.
- Kalergis A.M und Ravetch J.V. (2002). Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc γ receptors on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:1653-1659.
- Kalinski P., Hilkens C.M., Snijders A., Snijdewint F.G. und Kapsenberg M.L. (1997). IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159:28-35.
- Kalinski P., Hilkens C.M., Wierenga E.A. und Kapsenberg M.L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20:561.
- Kaneko Y., Harada M., Kawano T., Yamashita M., Shibata Y., Geijyo F., Nakayama T. und Taniguchi M. (2000). Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191:105-114.
- Kanitakis J., Ramirez-Bosca A., Reano A., Viac J., Roche P. und Thivolet J. (1988). Filaggrin expression in normal and pathological skin: a marker of keratinocyte differentiation. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 412:375.
- Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash D.E. und Christianson D.W. (1996). Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 383:554.
- Kapsenberg M.L., Res P., Bos J.D., Schootemijer A., Teunissen M.B.M und Schooten W.V. (1987). Nickel-specific T lymphocyte clones derived from allergic nickel-contact dermatitis lesions in man. Heterogeneity based on requirement of dendritic antigen-presenting cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 17:861-865.
- Karandikar N.J., Vanderlugt C.L., Walunsa T.L., Miller S.D. und Bluestone J.A. (1996). CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 184:783-788.
- Kataoka T., Takaku K., Magae J., Shinohara N., Takayama H., Kondo S. und Nagai K. (1994). Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 153:3938-3947.
- Kataoka T., Yamada A., Bando M., Homma T., Mizoue K. und Nagai K. (2000). Fd-891, a structural analogue of concanamycin A that does not affect vacuolar acidification or perforin activity, yet potently prevents cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity through the blockage of conjugate formation. *Immunology* 100:170-177.

- Kawakami K., Kinjo Y., Uezu K., Yara S., Miyagi K., Koguchi Y., Nakayama T., Taniguchi M. und Saito A. (2001). Monocyte chemoattractant protei-1-dependent increase of V α 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J. Immunol.* 167:6525-6532.
- Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H. und Taniguchi M. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
- Kerosuo H., Kullaa A., Kerosuo E., Kanerva L. und Hensten Pettersen. (1996). Nickel allergy in adolescents in relation to orthodontic treatment and piercing of ears. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 109:148.
- Khanna A., Morelli A.E., Zhong C., Takayama T., Lu L. und Thomson A.W. (2000). Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 164:1346-1354.
- Khattari R., Cox T., Yasayko S.A. und Ramsdell F. (2003). An essential role for scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nature Immunol.* 4:337-342-
- Kim C.H., Johnston B. und Butcher E.C. (2002). Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24⁺V β 11⁺ NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100:11-16.
- Kim C.H., Rott L.S., Clark-Lewis I., Campbell D.J., Wu L. und Butcher E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5⁺ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 193: 1373.
- Kimber I. und Dearman R.J. (2002). Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* 46:1.
- King C. et al. (1998). TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 8:601-613.
- King C. et al. (2001). Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8⁺ T-cell responses. *Nature Med.* 7:206-214.
- Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R. und Wood K.J. (2002). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.* 18:1080-1086.
- Kitamura H. et al. (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand α -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* 189:1121-1128.
- Knox R.B., Suphioglu C., Taylor P., Desai R., Watson H.C., Peng J.L. und Bursill, L.A. (1997). Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin. Exp. Allergy* 27:246-251.
- Kobayashi E., Motoki K., Uchida T., Fukushima H. und Koezuka Y. (1995). KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* 7:529-534.
- Koch F., Stanzl U., Jennewein P., Janke K., Heufler C., Kampgen E., Romani N. und Schuler G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184:741-746.
- Koh J.S., Wang Z. und Levine J.S. (2000). Cytokine dysregulation induced by apoptotic cells is a shared characteristic of murine lupus. *J. Immunol.* 165:4190.
- Kojo S., Adachi Y., Keino H., Taniguchi M. und Sumida T. (2001). Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18⁺, BV11⁺ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44:1127-1138.
- Kopp F. und Gleichmann E. (2004). Comparison of cytokine expression in the site of antigen presentation during the induction phase of nickel tolerance and allergy. *Immunobiology* 209:456.
- Kozlowski H., Bal W., Dyba M. und Kowalik-Jankowska T. (1999). Specific structure-stability relations in metallopeptides. *Coord. Chem. Rev.* 184:319.
- Kramer A., Schuster A., Reineke U., Malin R., Volkmer-Engert R., Landgraf C. und Schneider-Mergener J. (1994). Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tools for the identification of peptides that bind with predefined specificity. *Methods Enzymol.* 6:388.
- Kronenberg M. und Gapin L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:557.

- Kronin V., Vremec D., Winkel K., Classon B.J., Miller R.G., Mak T.W., Shortman K. und Suss G. (1997). Are CD8⁺ dendritic cells (DC) veto cells? The role of CD8 on DC in DC development and in the regulation of CD4 and CD8 T cell responses. *Int. Immunol.* 9:1061.
- Kronin V., Wu L., Gong S., Nussenzweig M.C. und Shrotman K. (2000). DEC-205 as a marker of dendritic cells with regulatory effects on CD8 T cell responses. *Int. Immunol.* 12:731.
- Kubicka-Muranyi M., Griem P., Lübben B., Rottmann N., Lührmann R. und Gleichmann E. (1995). Mercuric-chloride-induced autoimmunity in mice involves up-regulated presentation by spleen cells of altered and unaltered nucleolar self antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:1-10.
- Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B. et al. (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109:131-140.
- Kuniyasu Y., Takahashi T., Itoh M., Shimizu J., Toda G. und Sakaguchi S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25⁺CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 12: 1145-1155.
- Kurup V.P., Seymour B.W.P., Choi H. und Coffman R.L. (1994). Particulate *Aspergillus fumigatus* antigens elicit a T_{H2} response in BALB/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:1013-1020.
- Laloux V., Beaudoin L., Jeske D., Carnaud C. und Lehuen A. (2001). NK T cell-induced protection against diabetes in V α 14-J α 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J.Immunol.* 166:3749-3756.
- Lambert A.L., Dong W., Winsett D.W., Selgrade M.K. und Gilmour M.I. (1999). Residual oil fly ash exposure enhances allergic sensitization to house dust mite. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158:269-277.
- Lambert A.L., Dong W., Selgrade M.K. und Gilmour M.I. (2000). Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165:84-93.
- Laplante A.F., Germain L., Auger F.A. und Moulin V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J.* 15:2377.
- Lee G.K., Park H.J., Macleod M., Chandler P., Munn D.H. und Mellor A.L. (2002). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107:1.
- Lee M.G., Borkowski T.A. und Udey M.C. (1993). Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 101:883-886.
- Lee P.T., Benlagha K., Teyton L. und Bendelac A. (2002). Distinct functional lineages of human V alpha-24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 195:637-641.
- Legge K.L. et al. (2002). On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 196:217-227.
- Lehmann J., Huehn J., de la Rosa M., Maszyzna F., Kretschmer U., Krenn V., Brunner M., Scheffold A. und Hamann A. (2002). Expression of the integrin $\alpha_E\beta_7$ identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 99:13031-13036.
- Lehuen A., Lantz O., Beaudoin L., Laloux V., Carnaud C., Bendelac A., Bach J.F. und Monteiro R.C. (1998). Overexpression of natural killer T cells protects V α 14-J α 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J. Exp. Med.* 188:1831-1839.
- Lin H. et al. (1998). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J. Exp. Med.* 188:199-204.
- Lindsten T., June C.H., Ledbetter J.A., Stella G. und Thompson C.B. (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T-cell activation pathway. *Science* 244:339-342.
- Link H. und Xiao B.G. (2001). Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol. Rev.* 184:117-128.
- Liu M.T., Chen B.P., Oertel P., Buchmeier M.J., Armstrong D., Hamilton T.A. und Lane T.E. (2000). The T cell chemoattractant IFN- γ -inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J.Immunol.* 165:2327.
- Liu K., Iyoda T., Saternus M., Kimura Y., Inaba K. und Steinman R.M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J.Exp. Med.* 196:1091.

- Liu Y.J., Kanzler H., Soumelis V. und Gilliet M. (2001). Dendritic-cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunol.* 2:585-589.
- Loh J. und Fraser J. (2003). Metal-derivatized major histocompatibility complex: zeroing in on contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 197:549.
- Lovik M., Hogseth A.K., Gaarder P.I., Hagemann R. und Eide, I. (1997). Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology* 121:165-178.
- Lu L., Vollmer J., Moulon C., Weltzien H.U., Marrack P. und Kappler J. (2003). Components of the ligand for a Ni²⁺ reactive human T cell clone. *J. Exp. Med.* 197:567.
- Lutz M.B. und Schuler G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445-449.
- Macatonia S.E., Hosken N.A., Litton M., Vieira P., Hsieh C.S., Culpepper J.A., Wyszocka M., Trinchieri G., Murphy K.M. and O'Garra A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 154:5071- 5079.
- MacKenzie C.R., Gonzalez R.G., Kniep E., Roch S. und Daubener W. (1999). Cytokine mediated regulation of interferon- γ -induced IDO activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467:533-539.
- Mahnke K., Knop J. und Enk A.H. (2003). Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. *Trends Immunol.* 24:646-651.
- Mahnke K., Qian Y., Knop J. und Enk A.H. (2003). Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101:4862-4869.
- Mandervelt C., Clottens F.L., Demedts M und Nemery B. (1997). Assessment of the sensitization potential of five metal salts in the murine local lymph node assay. *Toxicology* 120:65.
- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G. and Romagnani S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177:1199.
- Mariani S.M., Matiba B., Armandola E.A. und Krammer P.H. (1994). The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 24:3119-3123.
- Marley R., Patel R.P., Orie N., Ceaser E., Darley-Usmar V. und Moore K. (2001). Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radical Biol. Med.* 31:688.
- Martin S., Lappin M.B., Kohler J. et al. (2000). Peptide immunization indicates that CD8⁺ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 115:260-266.
- Mason D. und Powrie F. (1998). Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 10:649-655.
- Mathis D., Vence L. und Benoist C. (2001). β -cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798.
- Matic M. und Simon S.R. (1991). Tumor necrosis factor release from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: lipopolysaccharide tolerance in vitro. *Cytokine* 3:576-583.
- Matsuda J.L., Gapin L., Baron J.L., Sidobre S., Stetson D.B., Mohrs M., Locksley R.M. und Kronenberg M. (2003). Mouse V α 14i NKT cells are resistant to cytokine polarization *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8395-8400.
- Matsuki N., Stanic A.K., Embers M.E., van Kaer L., Morel L. und Joyce S. (2003). Genetic dissection of V α 14J α 18 natural T cell number and function in autoimmune prone mice. *J. Immunol.* 170: 5429-5437.
- Matsuzaki G., Li X.Y., Kadana T., Song F., Hiromatsu K., Yoshida H. und Nomoto K. (1995). Early appearance of T cell receptor $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺CD8⁺ T cells with a skewed variable region repertoire after infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* 25:1985.
- Matzinger P. (1994). Tolerance, danger and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
- McGuirk P., McCann C. und Mills K.H. (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 195:221-231.

- McHugh R.S. et al. (2002). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-145.
- Medzhitov R. und Janeway C.A. Jr. (2002). Decoding the pattern of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. und Janeway C.A. Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Melian A., Beckman E.M., Porcelli S.A. und Brenner M.B. (1996). Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8:82-88.
- Mellor A.L. et al. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol.* 171:1652-1655.
- Mellor A.L., Chandler P., Baban B., Hansen A.M., Marshall B., Pihkala J., Waldmann H., Cobbold S., Adams E. und Munn D.H. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. Immunol.* 16(10):1391-1401
- Mellor A.L., Keskin D.B., Johnson T., Chandler P. und Munn D.H. (2002). Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J. Immunol.* 168:3771.
- Mellor A.L. und Munn D.H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol. Today* 20:469-473.
- Mellor A.L. und Munn D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4(10):762-774.
- Mellor A.L., Sivakumar J., Chandler P., Smith K., Molina H., Mao D. und Munn D.H. (2001). Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nature Immunol.* 2:64-68.
- Mempel M., Ronet C., Suarez F., Gilleron M., Puzo G., van Kaer L., Lehuen A., Kourilsky P. und Gachelin G. (2002). Natural killer T cells restricted by the monomorphic MHC class Ib CD1d1 molecules behave like inflammatory cells. *J. Immunol.* 168:365.
- Menges M., Rossner S., Voigtlander C. et al. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor-necrosis factor- α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195:15-21.
- Mieza M.A., Itoh T., Cui J.Q., Makino Y., Kawano T., Tsuchida K., Koike T., Shirai T., Yagita H., Matsuzawa A. et al. (1996). Selective reduction of V α 14⁺ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.* 156:4035-4040.
- Miki T., Sun H., Lee Y., Tandin A., Kovscek A.M., Subbotin V., Fung J.J. und Valdivia L.A. (2001). Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant. Proc.* 33:129.
- Min W.P., Zhou D., Ichim T.E., Strejan G.H., Xia X., Yang J., Huang X., Garcia B., White D., Dutartre P., Jevnikar A.M. und Zhong R. (2003). Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J. Immunol.* 170:1304-1312.
- Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D. und Kaveri S.V. (2004). Cutting edge: Human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 172:4676-4680.
- Miyamoto K., Miyake S. und Yamamura T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413: 531- 534.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B. und Reed J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9:1799-1805.
- Möller H. (1984). Attempts to induce contact allergy to nickel in the mouse. *Contact Dermatitis* 10:65.
- Modigliani Y. et al. (1996). Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.* 26:1807-1815.
- Mohanakrishnan P., Chignell C.F. und Cox R.H. (1985). Chloride ion nuclear magnetic resonance spectroscopy probe studies of copper and nickel binding to serum albumins. *J. Pharm. Sci.* 74:61.

- Monn C. und Becker S. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155:245-252.
- Morelli A.E. et al. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101:611-620.
- Mommaas A.M., Mulder A.A., Out C.J. et al. (1995). Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. *Eur. J. Immunol.* 25:520-525.
- Morita T., Saito K., Takemura M., Maekawa N., Fujigaki S., Fujii H., Wada H., Takeuchi S., Noma A. und Seishima M. (2001). 3-Hydroxyanthranilic acid, an tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cells stimulated by interferon-gamma. *Ann. Clin. Biochem.* 38: 242-251.
- Moser B. und Loetscher P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2:123.
- Moser M. und Murphy K.M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 1:199.
- Moulon C., Choleva Y., Thierse H-J., Wild D. und Weltzien H.U. (2003). T cell receptor transfection shows non-HLA-restricted recognition of nickel by CD8⁺ human T cells to be mediated by $\alpha\beta$ T cell receptors. *J. Invest. Dermatol.* 121:496-501.
- Moulon C., Vollmer J. und Weltzien H.U. (1995). Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur. J. Immunol.* 25:3308.
- Moulon C., Wild D., Dormoy A. und Weltzien H.U. (1998). MHC-dependent and MHC-independent activation of human nickel-specific CD8⁺ cytotoxic T-cells from allergic donors. *J. Invest. Dermatol.* 111: 360-366.
- Müller G., Saloga J., Germann T., Schuler G., Knop J. und Enk A.H. (1995). IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity *in vivo*. *J. Immunol.* 155:4661.
- Mueller R. et al. (1996). Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 184:1093-1099.
- Munn D.H. et al. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 114:280-290.
- Munn D.H. und Mellor A.L. (2003). Macrophages and the regulation of self-reactive T cells. *Curr. Pharm. Des.* 9:257-264.
- Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A. und Mellor A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189:1363-1372.
- Munn D.H., Sharma M.D., Lee J.R., Jhaver K.G., Johnson T.S., Keskin D.B., Marshall B., Chandler P., Antonia S.J., Burgess R. et al. (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297:1867.
- Munn D.H., Sharma M.D. und Mellor A.L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 4100-4110.
- Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C. und Mellor A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193.
- Muranaka M., Suzuki S., Koizumi K., Takafuji S., Miyamoto T., Ikemori R. und Tokiwa H. (1986). Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J. Allergy Clin. Invest.* 77:616-623.
- Musso T., Gusella G.L., Brooks A., Longo D.L. und Varesio L. (1994). Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 83:1408-1411.
- Naiki Y., Nishimura H., Kawano T., Tanaka Y., Itohara S., Taniguchi M. und Yoshikai Y. (1999). Regulatory role of peritoneal NK1.1⁺ $\alpha\beta$ T cells in IL-12 production during *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 163:2057.
- Nakamura T. et al. (2003). CD4(+) NKT cells, but not conventional CD4(+) T cells, are required to generate efferent CD8(+) T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171:1266-1271.
- Nakano K. und Vousden K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* 7:683-694.
- Nakano H., Yanagita M. und Gunn M.D. (2001). CD11c⁺B220⁺Gr-1⁺ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194:1171.

- Nasorri F., Sebastiani S., Mariani V., De Pita O., Puddu P., Girolomoni G. und Cavani A. (2002). Activation of nickel-specific CD4⁺ T lymphocytes in the absence of professional antigen-presenting cells. *J. Invest. Dermatol.* 118:172-179.
- Nathan C. und Muller A.W. (2001). Putting the brakes on innate immunity: a regulatory role for CD200? *Nat. Immunol.* 2:17.
- Naumov, Y.N., Bahjat K.S., Gausling R., Abraham R., Exley M.A., Koezuka Y., Balk S.B., Strominger J.L., Clare-Salzer M. und Wilson S.B. (2001). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13838-13843.
- Nestle F.O., Speidel H. und Speidel M.O. (2002). Metallurgy: high nickel release from 1- and 2-euro coins. *Nature* 419:132.
- Nilsen, A., Hagemann R. und Eide I. (1997). The adjuvant activity of diesel exhaust particles and carbon black on systemic IgE production to ovalbumin in mice after intranasal instillation. *Toxicology* 124:225-232.
- Ning Y.Y., Imrich A., Goldsmith C.A., Qin G. und Kobzik L. (2000). Alveolar macrophage cytokine production in response to air particles *in vitro*: Role of endotoxin. *J. Toxicol. Environ. Health A* 59:165-180.
- Noble A., Zhao Z.S. und Cantor H. (1998). Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J. Immunol.* 160:566.
- Nowak M. (2005) Dissertation: Zur Rolle der Apoptose in der Induktion der Immuntoleranz: Beispiel Nickel. vorgelegt 03/2005 zur Begutachtung durch die Prüfungskommission der Mat.-Nat.-Fakultät der HHU-Düsseldorf.
- Oberörster G., Ferin J., Gelein R., Soderholm S.C. und Finkelstein J. (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 97:193-199.
- O'Garra A., Vieira P.L., Vieira P. und Goldfeld A.E. (2004). IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest.* 114:1372-1378.
- O'Hara R.M. Jr, Henderson S.L. und Nagelin A. (1996). Prevention of a T_H1 disease by a T_H1 cytokine: IL-12 and diabetes in NOD mice. *Ann. NY Acad. Sci.* 795:241-249.
- Ohashi K., Burkart V., Flohe S. und Kolb H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* 164:558-561.
- Oishi Y., Sumida T., Sakamoto A., Kita Y., Kurasawa K., Nawata Y., Takabayashi K., Takahashi H., Yoshida S., Taniguchi M et al. (2001). Selective reduction and recovery of invariant V α 24J α Q T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 28:275-283.
- Oller A.R., Costa M. und Oberdörster G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143:152.
- Olsen Saraiva Câmara N., Seville F. und Lechler R.I. (2003). Human CD4⁺CD25⁺ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8⁺ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 33:3473-3483.
- Oosterwegel M.A., Greenwald R.J., Mandelbrot D.A., Lorschach R.B. und Sharpe A.H. (1999). CTLA-4 and T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 11:294-300.
- Ormstad H. (2000). Suspended particulate matter in indoor air: Adjuvants and allergen carriers. *Toxicology* 152:53-68.
- Ormstad H., Gaarder P.I. und Johansen B.V. (1997). Quantification and characterisation of suspended particulate matter in indoor air. *Sci. Tot. Environ.* 193:185-196.
- Ortaldo J.R., Bere E.W., Hodge D. und Young H.A. (2001). Activating Ly-49 NK receptors: Central role in cytokine and chemokine production. *J. Immunol.* 166:4994.
- Pal E., Tabira T., Kawano K., Taniguchi M., Miyake S. und Yamamura T. (2001). Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NK T cells. *J. Immunol.* 166:662-668.
- Parthasarathy S., Fong L.G., Otero D. und Steinberg D. (1990). Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by acetyl-LDL-receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:537-540.
- Parekh V.V. et al. (2003). B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF- β 1. *J. Immunol.* 170:5897-5911.

- Perez V.L. et al. (1997). Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6:411-417.
- Peters T. (1996). *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic, San Diego.
- Peters A., Wichman H.E., Tuch T., Heinrich J., und Heyder J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1376-1383.
- Petrie H.T., Livak F., Burtrum D. und Mazel S. (1995). T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue and T cell production. *J. Exp. Med.* 182:121.
- Pettit L.D., Gregor J.E. und Kozlowski H. (1991). Complex formation between metal ions and peptides. In *Perspectives on Bioinorganic chemistry*, Vol. 1. JAI Press Ltd, Stamford, CT p.1.
- Piccirillo C.A. et al. (1998). TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 161:3950-3956.
- Pied S., Roland J., Louise A., Voegtle D., Soulard V., Mazier D. und Cazenave P.A. (2000). Liver CD4⁺CD8⁻NK1.1⁺ TCR $\alpha\beta$ intermediate cells increase during malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J. Immunol.* 164:1436.
- Poltorak A., He X., Smirnova I. et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Porcelli S.A. und Modlin R. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17:297.
- Porcelli S.A., Morita C.T. und Modlin R.L. (1996). T-cell recognition of non-peptide antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 8:510.
- Potolicchio I., Festucci A., Hausler P. und Sorrentino R. (1999). HLA-DP molecules bind cobalt: a possible explanation for the genetic association with hard metal disease. *Eur. J. Immunol.* 29:2140-2147.
- Poulton L.D., Smyth M.J., Hawke C.G., Silvera P., Shepherd D., Naidenko O.V., Godfrey D.I. und Baxter A.G. (2001). Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int. Immunol.* 13:887-896.
- Powrie F. et al. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi}CD4⁺ T cells. *Immunity* 1:553-562.
- Powrie F. et al. (1996). A critical role for transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 183:2669-2674.
- Pulendran B., Palucka K. und Banchereau J. (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293:253-256.
- Quay J.L., Reed W., Samet J. und Devlin R.B. (1998). Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via K κ B activation. *Am. J. Respir. Cells Mol. Biol.* 19:98-106.
- Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G. et al. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189:615-625.
- Rabilloud T., Asselineau D. und Darmon M. (1988). Presence of serum albumin in normal human epidermis: possible implications for the nutrition and physiology of stratified epithelia: presence of albumin in epidermis. *Mol. Biol. Rep.* 13:213.
- Rapoport M.J. et al. (1993). Interleukin 4 reverses T cell unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 178:87-99.
- Ren Y., Silverstein R.L., Allen J. und Savill J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 181:1857-1862.
- Reif K., Ekland E.H., Ohl L., Nakano H., Lipp M., Forster R. und Cyster J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416:94.
- Ria F. et al. (1998). Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28:2003-2016.
- Ridge J.P., Di Rosa F. und Matzinger P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.

- Riemann H., Schwarz A., Grabbe S., Aragane Y., Luger T.A., Wysocka M., Kubin M., Trinchieri G. und Schwarz T. (1996). Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J. Immunol.* 156:1799.
- Rissoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N. et al. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic-cell differentiation. *Science* 283:1183-1186.
- Rocha B. und von Boehmer H. (1991). Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251:1225-1228.
- Roelofs-Haarhuis, K., Wu X. und Gleichmann E. (2004). Oral tolerance to nickel requires CD4⁺ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *J. Immunol.* 173:1043-1050.
- Roelofs-Haarhuis K., Wu X., Nowak M., Fang M., Artik S. und Gleichmann E. (2003). Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* 171:2863.
- Rogers K.A. et al. (2002). Type 1 and Type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:1-7.
- Romagnoli P., Labhardt A.M. und Sinigaglia F. (1991). Selective interaction of Ni with a MHC-bound peptide. *EMBO J.* 10:1303-1306.
- Roncarolo M.G., Levings M.K. und Traversari C. (2001). Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:F5-9.
- Rosenblum M.D., Olasz E., Woodliff J.E., Johnson B.D., Konkol M.C., Gerber K.A., Orentas R.J., Sandford G. und Truitt R.L. (2003). CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* 103:2691.
- Rozen S. und Skaletzky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana press, Totowa, NJ 365-386.
- Rustemeyer T., van Hoogstraten I., von Blomberg B.M. und Scheper R. (2001). Mechanisms in allergic contact dermatitis. In *Textbook of Contact Dermatitis*. Rycroft R.J.G, Menne T., Frosch P.J. und Lepoittevin J.-P., eds. Springer, Berlin, S. 15.
- Rutault K., Alderman C., Chain B.M. und Katz D.R. (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26:232.
- Sadler P.J., Tucker A. und Viles J.H. (1994). Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins: comparison with Co²⁺, Cd²⁺, and Al³⁺. *Eur. J. Immunol.* 220:193.
- Saito K., Lackner A., Markey S.F. und Heyes M.P. (1991). Cerebral cortex and lung indoleamine 2,3-dioxygenase activity is increased in type-D retrovirus infected macaques. *Brain Res.* 540:353-356.
- Sakaguchi S. und Sakaguchi N. (1994). In *Autoimmunity: Physiology and Disease* (Coutinho A. und Kazatchkine M., eds), S.203-227, Wiley-Liss.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., und Toda M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2R α chains (CD25). *J. Immunol.* 155:1151-1164.
- Sakurai K., Zou J.P., Tschetter J.R., Ward J.M. und Shearer G.M. (2002). Effects of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 129:186.
- Salomon B. und Bluestone J.A. (2001). Complexities of CD28/B7:CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19:225-252.
- Salvaggio J.E. (1994). Inhaled particles and respiratory disease. *J. Allergy Clin.Immunol.* 94:304-309.
- Samet J.M., Stonehuerner J., Reed W., Devlin R.B., Dailey D.A., Kennedy T.P., Bromber P.A. und Ghio A.J. (1997). Disruption of tyrosine phosphate homeostasis in bronchial epithelial cells exposed to oil fly ash. *Am. J. Physiol.* 272:L426-L432.
- Sanchez-Fueyo A., Weber M., Domenig C., Strom T.S. und Zheng X.X. (2002). Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J. Immunol.* 68:2274-2281.
- Saoudi A. et al. (1996). The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into pre-diabetic recipients. *J. Exp. Med.* 184:2393-2398.
- Sauter B. et al. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191:423-434.

- Savill J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br. Med. Bull.* 53:491-504.
- Savill J. und Fadok V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784.
- Sax J.K., Fei P., Murphy M.E., Bernhard E., Korsmeyer S.J. und El-Deiry W. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* 4:842-849.
- Schmieg J., Yang G., Franck R.W. und Tsujii M. (2003). Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J. Exp. Med.* 198:1631-1641.
- Schreurs M.W.J., Eggert A.A.O., de Boer A.J., Figdor C.G. und Adema G.J. (1999). Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2835-2841.
- Schubert H., Berova N., Czernielewsky A., Hegyi E., Jirasek L., Kohanka V., Korossi S., Michailov P., Nebenfuhrer L. und Prater E. (1987). Epidemiology of nickel allergy. *Contact dermatitis* 16:122.
- Schwartz J. (1991). Particulate air pollution and daily mortality: a synthesis. *Public Health Rev.* 19:39-60.
- Schwartz J. und Neas L.M. (2000). Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in school-children. *Epidemiology* 11:6-10.
- Schwartz J., Norris G., Larson T., Sheppard L., Claiborne C. und Koenig J. (1999). Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. *Environ. Health Perspec.* 107:339-342.
- Schwarz A., Beissert S., Grosse-Heitmeyer K., Gunzer M., Bluestone J.A., Grabbe S. und Schwarz T. (2000). Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-induced tolerance. *J. Immunol.* 165:1824.
- Schwarz A., Grabbe S., Grosse-Heitmeyer K., Roters B., Riemann H., Luger T.A., Trinchieri G. und Schwarz T. (1998). Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-Ligand system. *J. Immunol.* 160:4262-4270.
- Schwarz A., Maeda A., Wild M.K., Kernebeck K., Gross N., Aragane Y., Beissert S., Vestweber D. und Schwarz T. (2004). Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 172:1036-1043.
- Seaton A., MacNee W., Donaldson K. und Godden D. (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345:176-178.
- Seddon B. et al. (1996). CD4⁺CD8⁻ thymocytes that express L-selectin protect rats from diabetes upon adoptive transfer. *Eur. J. Immunol.* 26:2702-2708.
- Seddon B. und Mason D. (1999). Regulatory T-cells in the control of autoimmunity: the essential role of TGF- β and IL-4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4⁺CD45RC⁻ cells and CD4⁺CD8⁻ thymocytes. *J. Exp. Med.* 189:279-288.
- Seddon B. und Mason D. (2000). The third function of the thymus. *Immunol. Today* 21:95-99.
- Seder R.A. et al. (1998). Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4⁺ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol.* 160:5719-5728.
- Sedlik C. et al. (2003). A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 170:846-852.
- Serreze D.V. und Leiter E.H. (1988). Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice: potential relation to cytokine deficiencies. *J. Immunol.* 140:3801.
- Sharif, S., Arreaza G.A., Zucker P., Mi Q.S., Sondhi J., Naidenko O.V., Kronenberg M., Koezuka Y., Delovitch T.L., Gombert J.M., Leite-de-Moraes M., Gourain C., Shu R., Hameg A., Nakayama T., Taniguchi M., Lepault F., Lehuen A., Bach J.F. und Herbelin A. (2001). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat. Med.* 7:1057-1062.
- Sharif S., Arreaza G.A., Zucker P., Mi Q.S. und Delovitch T.L. (2002). Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J. Mol. Med.* 80:290-300.
- Shevach E.M. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449.
- Shi F.D., Flodstrom M., Balasa B., Kim S.H., van Gunst K., Strominger J.L., Wilson S.B. und Sarvetnick N. (2001). Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6777-6782.

- Shi F., Ljunggren H.-G. und Sarvetnick N. (2001). Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends Immunol.* 22:97-101.
- Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y. und Sakaguchi S. (2002). Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3(2):135-142.
- Shimizu T., Nomiyama S., Hirata F. und Hayaishi O. (1978). Indoleamine 2,3,-dioxygenase: purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 253:4700-4706.
- Shinomiya M., Fazle Akbar S.M., Shinomiya H. und Onji M. (1999). Transfer of dendritic cells (DC) ex vivo stimulated with interferon-gamma (IFN- γ) down-modulates autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin. Exp. Immunol.* 117:38-43.
- Shortman K. und Heath W.R. (2001). Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol.* 2:988-989.
- Shortman K. und Liu Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151.
- Shreedhar V. et al. (1999). Dendritic cells require T cells for functional maturation *in vivo*. *Immunity* 11:625-636.
- Shull M.M. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Sim B.-C., Lo D. und Gascoigne N.R.J. (1998). Preferential expression of TCR V α regions in CD4/CD8 subsets: class discrimination or co-receptor recognition. *Immunol. Today* 6:276.
- Singh N., Hong S., Scherer D.C., Serizawa I., Burdin N., Kronenberg M., Koezuka Y. und van Kaer L. (1999). Cutting Edge: activation of NK T cells by CD1d and α -galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J. Immunol.* 163:2373-2377.
- Singh N., Wilson M.T., Hong S., Olivares-Villagomez D., Du C., Stanic A.K., Joyce S., Siriam S., Koezuka Y. und van Kaer L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 194:1801-1811.
- Sinigaglia F.D., Scheidegger D., Garotta G., Scheper R., Pletscher M. und Lanzavecchia A. (1985). Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J. Immunol.* 135:3929-3932.
- Sinigaglia F. (1994). The molecular basis of metal recognition by T cells. *J. Invest. Dermatol.* 102:398.
- Sivakumar V., Hammond K.J., Howells N., Pfeffer K. und Weih F. (2003). Differential requirement for Rel/nuclear factor κ B family members in natural killer T cell development. *J. Exp. Med.* 197:1613.
- Skelsey M.E. und Niederkorn J.Y. (2003). CD25⁺, interleukin-10-producing CD4⁺ T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology* 110:18-29.
- Smith-Sivertsen T., Tchachtchine V. und Lund E. (2002). Environmental nickel protection: Does it protect against nickel allergy? *J. Am. Acad. Dermatol.* 46:460-462.
- Smyth M.J., Crowe N.Y., Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H. und Godfrey D.I. (2002). NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr. Opin. Immunol.* 14:165-171.
- Sobel D.O., Han J., Williams J., Yoon J.W., Jun H.S. und Ahvazi B. (2002). Gamma interferon paradoxically inhibits the development of diabetes in the (NOD) mouse. *J. Autoimmun.* 19:129-137.
- Sonoda K.H., Exley M., Snapper S., Balk S.P. und Stein-Streilein J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.* 190:1215-1226
- Sonoda K.H., Faunce D.E., Taniguchi M., Exley M., Balk S. und Stein-Streilein J. (2001). NK T-cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.* 166:42-50.
- Sonoda K.H. und Stein-Streilein J. (2002). CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. J. Immunol.* 32:848-857.
- Soukup J.M., Ghio A.J. und Becker S. (2000). Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function *in vivo* and *in vitro*. *Inhalation Toxicology* 12:401-414.

- Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R und Loscalzo J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7674.
- Stanic A.K., Bezbradica J.S., Park J.-J., Matsuki N., Mora A.L., Van Kaer L., Boothby M.R. und Joyce S. (2004). NF- κ B controls cell fate specification, survival and molecular differentiation of immunoregulatory natural T lymphocytes. *J. Immunol.* 172:2265.
- Stein J.V., Rot A., Luo Y., Narasimhaswamy M., Nakano H., Gunn M.D., Matsuzawa A., Quackenbush E.J., Dorf M.E. und Von Adrian U.H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J. Exp. Med.* 191:61.
- Steinbrink K., Jonuleit H, Muller G., Schuler G., Knop J. und Enk A.H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634-1642.
- Steinbrink K., Wolf M., Jonuleit H., Knop J. und Enk A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159:4772.
- Steinman R.M. und Nussenzweig M.C. (2002). Inaugural article. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T-cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:351-358.
- Steinman R.M., Turley, S., Mellman I. und Inaba K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191:411-416.
- Stein-Streilein J. und Streilein J.W. (2002). Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int. Rev. Immunol.* 21:123.
- Stolzinger A. und Grune T. (2004). Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J.* 18:743-745.
- Stolzinger A., Wengner A. und Grune T. (2002). Degradation of oxidized extracellular proteins by microglia. *Arch. Biochem. Biophys.* 15:878-881.
- Stone T.W. und Darlington L.G. (2002). Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nature Rev. Drug Discov.* 1:609-620.
- Streilein J.W. (1999). Regional immunity and ocular immune privilege. *Chem. Immunol.* 73:11-38.
- Süss G. und Shortman K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1789-1796.
- Suri-Payer E., Amar A.Z., Thornton A.M. und Shevach E. (1998). CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160:1212-1218.
- Suzuki T. et al. (2003). Comparison of the sequences of Turbo and Sulculus indoleamine dioxygenase-like myoglobin genes. *Gene* 308:89-94.
- Taams L.S., van Rensen A.J., Poelen M.C., van Els C.A., Besseling A.C., Wagenaar J.P., van Eden W. und Wauben M.H. (1998). Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *Eur. J. Immunol.* 28:2902-2912.
- Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Shimizu J. und Sakaguchi S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969-1980.
- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W. und Sakaguchi S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303-309.
- Takano H., Yoshikawa T., Ichinose T., Miyabara Y., Imaoka K. und Sagai M. (1997). Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:36-42.
- Takeda K. und Dennert G. (1993). The development of autoimmunity in C57BL/6lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type-1 positive cells; evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J. Exp. Med.* 177:155-164.

- Takeuchi M., Alard P. and Streilein J.W. (1998). TGF- β promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 160:1589.
- Takikawa O., Yoshida R., Kido R. und Hayaishi O. (1986). Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 261:3648-3653.
- Tang Q., Boden E.K., Henriksen K.J., Bour-Jordan H., Bi M. und Bluestone J.A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34:2996-3005.
- Taylor M.W. und Feng G. (1991). Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5:2516-2522.
- Terabe M, Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H., Watson C., Donaldson D.D., Carbone D.P., Paul W.E. und Berzofsky J.A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* 1:515-520.
- Terada N., Maesako K., Hamano N., Houki G., Konno A., Ikeda T. und Sai M. (1997). Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114:167-174.
- Terness P., Bauer T.M., Rose L., Dufter C., Watzlik A., Simon H. und Opelz G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196:447.
- Terpstra V., Kondratenko N. und Steinberg D. (1997). Macrophages lacking scavenger receptor A show a decrease in binding and uptake of acetylated low-density lipoprotein and of apoptotic thymocytes, but not of oxidatively damaged red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8127.
- Thierse H-J., Moulon C., Allespach Y., Zimmermann B., Doetze A., Kuppig S., Wild D., Herberg F. und Weltzien H.U. (2004). Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation. *J. Immunol.* 172:1926-1934.
- Thomas S.M., Garrity L.F., Brandt C.R., Schobert C.S., Feng G.S., Taylor M.W., Carlin J.M. und Byrne G.I. (1993). IFN- γ -mediated antimicrobial response: indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia spp.* or *Toxoplasma* growth. *J. Immunol.* 150:5529-5534.
- Thomas S.R., Salahifar H., Mashima R., Hunt N.H., Richardson D.R. und Stocker R. (2001). Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN- γ -activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J. Immunol.* 166:6332.
- Thompson C.B. und Allison J.P. (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445-450.
- Thornton A.M. und Shevach E.M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* (1998). 188:287-296.
- Thorstenson K.M. und Khoruts A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4 T cells *in vivo* after the induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.* 167:188-195.
- Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A. und Sharpe A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
- Traidl C., Sebastiani S., Albanesi C., Merk H.F., Puddu P., Girolomoni G. und Cavani A. (2000). Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets against keratinocytes. *J. Immunol.* 165:3058.
- Trinchieri G. (1994). Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008.
- Trombetta E.S. et al. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299:1400-1403.
- Tsien A., Diaz-Sanchez D., Ma J. und Saxon A. (1997). The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142:256-263.
- Urban B.C. et al. (2001). A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8750-8755.

- van den Elsen P.J. ed. (1995). *The Human T-cell Receptor Repertoire and Transplantation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Van der Vliet H.J., Nishi N., Koezuka Y., Peyrat M.A., von Blomberg B.M., van den Eertwegh A.J., Pinedo H.M., Giaccone G. und Scheper R.J. (1999). Effects of α -galactosylceramide (KRN7000), interleukin-12 and interleukin-7 on phenotype and cytokine profile of human $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T cells. *Immunology* 98:557-563.
- Van der Vliet H.J., von Blomberg B.M., Nishi N., Reijm M., Voskuyl A.E., van Bodegraven AA., Polman C.H., Rustemeyer T., Lips P., van den Eertwegh A.J. et al. (2001). Circulating $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin. Immunol.* 100:144-148.
- Van Hoogstraten I.M., Andersen K.E., von Blomberg B.M., Boden D., Bruynzeel D.P., Burrows D., Camarasa J.G., Dooms Goossens A., Kraal G., Lahti A. et al. (1991). Reduced frequency of nickel-allergy upon oral nickel contact at an early age. *Clin. Exp. Immunol.* 85:441.
- Van Hoogstraten I.M., Boos C., Boden D., von Blomberg M.E., Scheper R.J und Kraal G. (1993). Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J. Invest. Dermatol.* 101:26.
- van Vliet P., Knape M., Hartog J.d., Janssen N., Harssema H. und Brunekreef B. (1997). Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways. *Environ. Res.* 74:122-132.
- van Zijverden M. und Granum B. (2000). Adjuvant activity of particulate air pollutants in different mouse models. *Toxicology* 152:69-77.
- van Zijverden M., van der Pijl A., Bol M., van Pinxteren F.A, de Haar C., Penninks A.H., van Loveren H. und Pieters R. (2000). Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168:131-139.
- Varadhachary A., Perdow S., Hu C., Ramanarayanan M. und Salgame P. (1997). Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5778-5783.
- Varga J., Yufit T., Hitraya E. und Brown R.R. (1996). Control of extracellular matrix degradation by interferon- γ . The tryptophan connection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398:143-148.
- Vasu C., Prabhakar B.S. und Holtermann M.J. (2004). Targeted CTLA-4 engagement induces $CD4^+CD25^+$ CTLA-4high T regulatory cells with target (allo)antigen specificity. *J. Immunol.* 173(4):2866-2876.
- Vendetti S., Chai J.G., Dyson J., Simpson E., Lombardi G. und Lechler R. (2000). Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 165:1175-1181.
- Vicari A.P., Herbelin A., Leite-de-Moraes M.C., Von Freeden-Jeffry U., Murray R. und Zlotnik A. (1996). $NK1.1^+$ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int. Immunol.* 8:1759-1766.
- Vincent M.S. et al. (2002). CD1-dependent dendritic-cell instruction. *Nature Immunol.* 3:1163-1168.
- Vincent M.S., Gumperz J.E. und Brenner M.B. (2003). Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat. Immunol.* 4:517-523.
- Vollmer J., Fritz M., Dormoy A., Weltzien H.U. und Moulon C. (1997). Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity. *Eur. J. Immunol.* 27:1865.
- Vollmer J., Weltzien H.U., Gamerding K., Lang S., Choleva Y. und Moulon C. (2000). Antigen contacts by Ni-reactive TCR: typical $\alpha\beta$ chain cooperation versus α chain-dominated specificity. *Int. Immunol.* 12:1723-1731.
- Vollmer J., Weltzien H.U. und Moulon C. (1999). TCR reactivity in human nickel allergy indicates contacts with complementarity-determining region 3 but excludes superantigen-like recognition. *J. Immunol.* 163:2723-2731.
- von Bubnoff D., Matz H., Frahnert C., Rau M.L., Hanau D., de la Salle H. und Bieber T. (2002). Fc ϵ RI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* 169:1810.
- Vreeburg K.J., De Groot K., Van Hoogstraten I.M., von Blomberg B.M. und Scheper R.J. (1991). Successful induction of nickel allergic contact dermatitis to mercury and chromium in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 96:179.
- Wakkach A. et al. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18:605-617.

- Waldmann H. und Cobbold S. (1998). How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu. Rev. Immunol.* 16:619-644.
- Waldmann H. und Cobbold S. (2001). Regulating the immune response to transplants. A role for CD4⁺ regulatory T cells? *Immunity* 14:399-406.
- Warnock R.A., Campbell J.J., Dorf M.E., Matsuzawa A., McEvoy L.M. und Butcher E.C. (2000). The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J. Exp. Med.* 191:77.
- Watanabe T., Yoshida M., Shirai Y., Yamori M., Yagita H., Itoh T., Chiba T., Kita T. und Wakatsuki Y. (2002). Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.* 168:2188-2199.
- Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H. und Mak T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 270:985-988.
- Weiner H.L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today* 18:335-343.
- Weltzien H.U., Moulon C., Martin S., Padovan E., Hartmann U. und Kohler J. (1996). T cell immune responses to haptens: structural models for allergic and autoimmune responses. *Toxicology* 107:141.
- Werfel T., Hentschel M., Renz H. und Kapp A. (1997). Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:384-386.
- Werner E.R., Bitterlich G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Szabo G., Dietrich M.P. und Wachter H. (1987). Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon- γ . *Life Sci.* 41:273-280.
- White A., Ding X., vanderSpek J.C., Murphy J.R. und Ringe D. (1998). Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394:502-506.
- Wiegand U.K., Corbach S., Prescott A.R., Savill J. und Spruce B.A. (2001). The trigger to cell death determines the efficiency with which dying cells are cleared by neighbors. *Cell Death Differ.* 8:734-746.
- Wilson M.T. et al. (2003). The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor downregulation and expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10913-10918.
- Wilson S.B. und Byrne M.C. (2001). Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T-cell subset. *Curr. Opin. Immunol.* 13:555-561.
- Wilson S.B. und Delovitch T.L. (2003). Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat. Rev.* 3:211-222.
- Wilson S.B., Kent S.C., Patton K.T., Orban T., Jackson R.A., Exley M., Porcelli S., Schatz D.A., Atkinson M.A., Balk S.P. et al. (1998). Extreme Th1 bias of invariant V α 24-J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391:177-181.
- Witting A., Muller P., Herrmann A., Kettenmann H. und Nolte C. (2000). Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages *in vitro*: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J. Neurochem.* 75:1060-1070.
- Wright G.J., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M.J., Bigler M., Song Y., Jenmalm M., Gorman D., McClanahan T., et al. (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J. Immunol.* 171:3034.
- Wright G.J., Puklavec M.J., Willis A.C., Hoek R.M., Sedgwick J.D., Brown M.H. und Barclay A.N. (2000). Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* 13:233.
- Wu D.Y., Segal N.H., Sidobre S. Kronenberg M. und Chapman P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 198:173.
- Yang J.Q. et al. (2003). Repeated alpha-galactosylceramide administration results in expansion of NK T cells and alleviates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice *J. Immunol.* 171:4439-4446.
- Yang Y.F., Tomura M., Ono S., Hamaoka T. und Fujiwara H. (2000). Requirement for IFN-gamma in IL-12 production induced by collaboration between v(alpha)14(+) NKT cells and antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 12:1669-1675.

- Yasumi T., Katamura K., Yoshioka T., Meguro T., Nishikomori R., Heike T., Inobe M., Kon S., Uede T. und Nakahata T. (2004) Differential requirement for the CD40-CD154 costimulatory pathway during Th cell priming by CD8 α^+ and CD8 α^- murine dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 172: 4826-4833.
- Yoshimoto T. und Paul W.E. (1994). CD4^{POS}, NK1.1^{POS} T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* 179:1285.
- Yu W.G., Yamamoto N., Takenaka H., Mu J., Tai X.G., Zou J.P., Ogawa M., Tsutsui T., Wijesuriya R., Yoshida R., Herrmann S., Fujiwara H. und Hamaoka T. (1996). Molecular mechanism underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int. Immunol.* 8:855-865.
- Yuan W., Collado-Hidalgo A., Yufit T., Taylor M. und Varga J. (1998). Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor- β : selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J. Cell Physiol.* 177:174-186.
- Yusuf I. und Fruman D.A. (2003). Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol.* 24:380-386.
- Zeng Z., Castano A.R., Segelke B.W., Stura E.A., Peterson P.A. und Wilson I.A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277:339-345.
- Zhang X., Brunner T., Carter L., Dutton R.W., Rogers P., Bradley L., Sato T., Reed J.C., Green D. und Swain S.L. (1997). Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 185:1837-1849.
- Zhang Y. und Wilcox D.E. (2002). Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7:327.
- Zhang Y., Akilesh S. und Wilcox D.E. (2000). Isothermal titration calorimetry measurements of Ni(II) and Cu(II) binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and bovine serum albumin: a critical evaluation. *Inorg. Chem.* 39:3057.
- Zhou Y., Hu X., Ouyang D., Huang J. und Wang Y. (1994). The novel behaviour of interactions between Ni²⁺ ion and human or bovine serum albumin. *Biochem J.* 304:23.
- Zhou D., Mattner J., Cantu III C., Schrantz N., Yin N., Gao Y., Sagiv Y., Hudspeth K., Wu Y.P., Yamashita T., Teneberg S., Wang D., Proia R.L., Lavery S.B., Savage P.B., Teyton L. und Bendelac A. (2004). Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786.
- Zollner T.M., Neubert C., Wettstein A., Boehnke W.-H., Manfras W.-H., Böhm B.O. und Sterry W. (1998). The T-cell receptor V β repertoire of nickel-specific T cells. *Arch. Dermatol. Res.* 290:397.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ernst Gleichmann, der es mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bedanke mich für sein Interesse an dieser Dissertation und für die vielen Anregungen, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität zu übernehmen.

Mein Dankeschön gilt den Kollegen in unserer Arbeitsgruppe und allen übrigen Mitarbeitern des IUF, die bei Fragen oder Problemen stets gerne zur Mithilfe bereit waren. Dabei möchte ich besonders Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Esser und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für die Möglichkeit zur ausgiebigen Nutzung ihres Labors danken.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Rebecca Widmer und PD Dr. Tilman Grune für die tatkräftige Mithilfe bei der Präparation apoptotischer Vesikel.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich meiner ehemaligen Kollegin und guten Freundin Dr. Laura Layland für ihre Unterstützung und Mithilfe bei so vielen meiner Experimente, auch wenn es mal länger gedauert hat, und die vielen Diskussionen, die mich oft auf die entscheidende Idee gebracht haben: We were a great team, and you have become a true friend! Thank you so much!

Vor allem aber möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern für all die vielen Jahre des Verständnisses und der Unterstützung auch in so manch schwerer Stunde bedanken. Ohne eure Fürsorge und Liebe, aber auch eure finanzielle Unterstützung, wäre es mir nie möglich gewesen, diese Dissertation anzufertigen. Ich danke euch für eure Toleranz und Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, daß ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, daß vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Frank Kopp

Düsseldorf, März 2005