

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung für Pneumologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Untersuchungen zu regulatorischen T-Zellen in der
Immunpathogenese der Sarkoidose**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

vorgelegt 2010
von René Schmiedlin
geboren in Emmendingen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. H.E. Blum
Erster Gutachter:	PD Dr. A. Prasse
Zweiter Gutachter:	PD Dr. R. Marks
Jahr der Promotion:	2011

Meinen Eltern

Meinen Brüdern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Sarkoidose	7
1.1.1	Ätiologie	7
1.1.2	Immunpathogenese der Sarkoidose	10
1.2	Regulatorische T-Zellen	13
1.2.1	Die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25)	13
1.2.2	Der Transkriptionsfaktor Foxp3	15
1.2.3	Suppressions-Mechanismen regulatorischer T-Zellen.....	17
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Geräte	21
3.1.2	Software	21
3.1.3	Verbrauchsmaterial	22
3.1.4	Chemikalien	22
3.1.5	Antikörper	23
3.1.6	Medien und Reagenzien	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Auswahl der Probanden	24
3.2.2	Bronchoalveoläre Lavage	25
3.2.3	Aufarbeitung der BAL	25
3.2.4	Entnahme von venösem Blut	26
3.2.5	Zellseparation aus venösem Blut	26
3.2.6	Zellfärbung	26
3.2.7	Zellfixierung	27
3.2.8	Zellfärbung für Durchflusszytometrie	27
3.2.9	Durchflusszytometrie	28
3.2.10	Auswertung der FACS-Messungen	30
3.2.11	Zellsortierung eines BAL-Zellgemisches	32
3.2.12	Anlegen von Kulturen zur Proliferationsmessung von BAL-Zellen	32

3.2.13	Proliferationsmessung mittels [³ H]-Thymidin.....	33
3.2.14	Coating von Kulturplatten mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper.....	33
3.2.15	MACS-Separation von regulatorischen T-Zellen	33
3.2.16	Labeln der CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen mit der CFSE-Methode.....	35
3.2.17	Anlegen von Kulturen zur Proliferationsmessung von Blut-Zellen.....	36
3.2.18	Messung der Kulturen mittels Durchflusszytometrie.....	36
3.2.19	ELISA zur Bestimmung von TNF- α.....	37
3.2.20	Auswertung der gemessenen Daten.....	38
4	Resultate	39
4.1	Übersicht über verschiedene Probandengruppen bei der BAL-Messung.....	39
4.2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der BAL	39
4.3	Cokultivierung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Lymphozyten und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten.....	42
4.4	Zirkulierende CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten.....	43
4.5	Cokultivierung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Lymphozyten und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten.....	45
4.6	Korrelation zwischen CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der BAL und zirkulierenden CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten.....	47
4.7	TNF-α in den Überständen von BAL-Flüssigkeit.....	47
4.8	Korrelation zwischen TNF-α und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der BAL....	48
4.9	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Lymphozyten.....	50
4.9.1	Verschiedene Protokolle	50
4.9.2	Übersicht über die verschiedenen Probandengruppen bei der BAL-Messung ...	50
4.9.3	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Lymphozyten in der BAL.....	52
4.10	Vergleich der CD25- und der Foxp3-Messungen im FACS	53
5	Diskussion	55
5.1	Mangel an Tregs bei chronisch aktiven Verläufen und Anstieg bei spontan regredienten Verläufen der Sarkoidose	55
5.2	Tregs proliferieren in der Lunge von Sarkoidosepatienten.....	58
5.3	Die spontane, pulmonale TNF-α Produktion korreliert invers mit der Anzahl an BAL-Tregs.....	61

5.4	Die immunregulatorische Kapazität der Tregs ist abhängig von mehreren Faktoren.....	66
5.5	Erweitertes Konzept zur Sarkoidose.....	68
5.5.1	Spontan regrediente Sarkoidose	68
5.5.2	Chronisch aktive Sarkoidose	69
5.6	Ausblick	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Literaturverzeichnis	75
8	Danksagung	90
9	Lebenslauf.....	90

1 Einleitung

1.1 Sarkoidose

Sir Arthur Conan Doyle, Erfinder von Sherlock Holmes, macht eine Hauterkrankung, die sich durch kuriose weißliche Flecken im Gesicht des Betroffenen äußert, zum Kern seiner Geschichte *The Adventures of the Blanned Soldier* [30]. Inspiriert zu dieser Erzählung wird der Schriftsteller und Arzt wahrscheinlich durch seinen Kollegen und Zeitgenossen Jonathan Hutchinson, ein Londoner Dermatologe. Hutchinson stellt 1877 in seinen *Illustrations of Clinical Surgery* eine Krankheit vor, die ähnliche Doyle's Hauterkrankung gruppierte, bilateral symmetrische Flecken hervorruft, die jedoch nicht ulzerieren oder Krusten bilden. Er beschreibt damit als erster die Sarkoidose, kann sie aber nicht als eigenständige Erkrankung einordnen und betitelt sie als „a case of livide papillary psoriasis“ [53].

Die Sarkoidose bleibt zunächst eine Domäne der Dermatologie. Caesar Boeck beschreibt in seinen Arbeiten als erster die Histologie der Granulome und stellt schon 1899 den Verdacht auf eine systemische Erkrankung. Es ist aber der schwedische Dermatologe Jörgen Schaumann, der 1914/15 mit Hilfe der neuen Röntgentechnik den Charakter der Sarkoidose als Systemerkrankung erkennt und die typischen Röntgenstadien der Lunge definiert [113]. Zur selben Zeit weisen der Dermatologe Kuznitsky und der Internist Bittdorf auf den möglichen Befall von Lunge, Milz und Niere neben Haut und Schleimhaut hin [68].

Heute gilt die Sarkoidose als eine Systemerkrankung, die durch nicht-verkäsende Epitheloidzell-haltige Granulome in den betroffenen Organen charakterisiert ist.

1.1.1 Ätiologie

Die Ursache dieser Krankheit ist über 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung immer noch ungeklärt. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die

Sarkoidose wahrscheinlich das Resultat eines Wechselspiels mehrerer Faktoren.

Eine in epidemiologischen Studien beschriebene familiäre Häufung sowie Unterschiede in der Inzidenz, der klinischen Präsentation und im Krankheitsverlauf der Sarkoidose bei verschiedenen ethnischen Gruppen geben Hinweise auf eine erbliche Prädisposition. Geschwister von Patienten haben ein fünffach erhöhtes Risiko eine Sarkoidose zu entwickeln [109]. Bestimmte Allele des humanen Leukozyten-Antigens (HLA) werden mit der Sarkoidose in Verbindung gebracht (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: HLAs und ihre Verknüpfung mit der Sarkoidose [13,17,54,57,107]

HLA Allel	Assoziation
B*8	Prädisposition
DQB1*0201	Schutz, gute Prognose, Löfgren Syndrom
DRB1*0301	Akuter Verlauf, gute Prognose, Löfgren Syndrom
DRB1*04	Schutz
DRB1*1101	Prädisposition bei Kaukasiern und Afro-Amerikanern
DRB3*0101	Prädisposition, Fortschreiten der Erkrankung bei Kaukasiern
DRB3*1501	Löfgren Syndrom

Zwei Genom-Scans mit Mikrosatelliten-Markern in Familien mit betroffenen Geschwistern zeigen, dass sich bei Afro-Amerikanern auf Chromosom 5 für Sarkoidose prädisponierende Gene befinden, bei deutschen Familien auf Chromosom 6 [55,115].

Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 wird das Gen für Butyrophilin-like 2 (BTNL2) entdeckt [135]. BTNL2 gilt als neues Mitglied der B7-Rezeptor-Familie. Es bindet jedoch nicht an die schon bekannten Rezeptoren der CD28 (cluster of differentiation 28)-Familie. Der Bindungspartner wird aber auf T- und B-Zellen vermutet [88]. BTNL2 gilt als Ko-Inhibitor bei der T-Zell-Aktivierung, denn lösliche BTNL2-Fc-Proteine hemmen die Proliferation und die Zytokin-Produktion von zuvor aktivierten T-Zellen [7]. Dies geschieht wahrscheinlich

über Interaktionen mit den NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-, NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)- und AP-1 (activator protein)-Signalwegen [88]. Bei Sarkoidosepatienten wird ein BTNL2-Protein exprimiert, dem die C-terminale Immunglobulin (Ig)C-Domäne sowie der Transmembrananteil fehlen. Verursacht wird dies durch ein SNP (single nucleotide polymorphism) (G→A Transition) im dazugehörigen Gen (rs2076530). Es entsteht eine alternative Splice Stelle in der messenger RNA (mRNA), was schließlich zu einem verkürzten Protein führt [135]. Dies kann nicht in die Zellmembran eingebaut werden. Folglich kann die T-Zell-Aktivierung weniger kontrolliert werden. Der ursächliche SNP wird assoziiert mit familiären und sporadischen Sarkoidosefällen bei Kaukasiern und in geringerem Ausmaß bei Afro-Amerikanern [108].

Trotz der beobachteten Verknüpfungen der Sarkoidose mit verschiedenen Genen und bestimmten Allelen wird von einem Auslöser aus der Umwelt ausgegangen. Weil bei der Sarkoidose mit der Lunge, den Augen und der Haut Organe befallen sind, die direkten Kontakt mit der äußeren Umwelt besitzen, wird der Fokus der Suche auf durch die Luft übertragene Antigene gesetzt. So stellen berufsbezogene Studien fest, dass Soldaten der U.S. Navy [45], Arbeiter in der Metallverarbeitung [67], Anbieter von Baustoffen [11] und Feuerwehrmänner [102] ein erhöhtes Risiko haben eine Sarkoidose zu entwickeln. Eine berufliche Exposition zu Insektiziden [87] und eine moderige Umgebung [67] mit einer potentiellen Exposition zu mikrobiellen Aerosolen werden ebenso als Risikofaktoren gedeutet.

Die Idee eines infektiösen Agens geht auf die Beobachtungen von Ansgar Kveim aus dem Jahr 1941 zurück. Von Sarkoidosepatienten gewonnenes Lymphknotengewebe führt bei anderen Patienten nach subkutaner Injektion mehrere Wochen später zur Bildung von Granulomen [69]. Diese sogenannte Kveim-Reaktion liefert einen Hinweis für die Existenz eines übertragbaren Agens. Die typische T Helfer 1 (T_H1)-Immunantwort (siehe unten) sowie das Vorliegen eines oligoklonalen Repertoires von T-Zell-Rezeptoren (TCR) in Lymphozyten [63] unterstützen die Hypothese einer Immunreaktion gegen ein persistierendes Antigen.

Mykobakterien werden von Beginn an als mögliche Verursacher gehandelt, weil sich die klinischen Befunde einer Infektion durch diese Erreger und die der Sarkoidose ähneln. Mithilfe der Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA und RNA von Mykobakterien in Sarkoidose-Gewebe nachgewiesen werden [35]. Die Serumproben von Sarkoidosepatienten enthalten oft Antikörper gegen Antigene von Mykobakterien, einschließlich dem rekombinanten *Mycobacterium tuberculosis* katG [121], dem *M. tuberculosis* Hitze-Schock Protein 70 [33] und dem *M. tuberculosis* Mycolyl-Transferase Antigen 85A [48]. Die DNA und RNA von Propionibakterien können ebenfalls immer wieder nachgewiesen werden [35].

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Entwicklung einer Sarkoidose wahrscheinlich das Endresultat einer Immunreaktion gegenüber verschiedenen ubiquitär vorkommenden Triggerfaktoren ist.

1.1.2 Immunpathogenese der Sarkoidose

Die vermutlich persistierenden und schwer abbaubaren Antigene werden von Makrophagen aufgenommen, prozessiert und Lymphozyten mittels MHC-II (Major Histocompatibility Complex) präsentiert. Über den TCR aktivierte $CD4^+$ T-Zellen sezernieren Interleukin-2 (IL-2) und produzieren gleichzeitig die

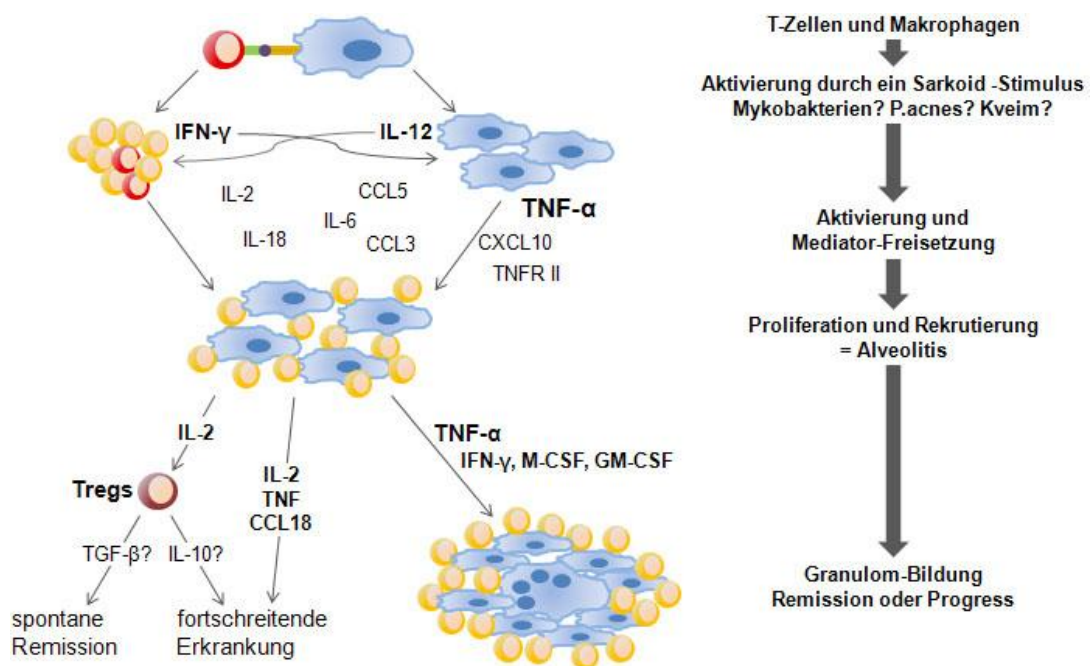


Abb. 1.1: Modell der Granulom-Bildung bei der Sarkoidose

α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25). Diese Untereinheit bildet mit den bereits in der Zellmembran vorhandenen β - und γ -Untereinheiten den hochaffinen IL-2-Rezeptor. Das sezernierte IL-2 bindet an diese eigenen Rezeptoren und signalisiert den T-Zellen zu proliferieren (autokrine Stimulation). Aktivierte Makrophagen sezernieren IL-12. Dies lenkt die proliferierenden T_H0 -Zellen in Richtung des Subtyps T_H1 . Diese T_H1 -Zellen selbst sezernieren IL-2, Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon- γ (IFN- γ). Das IFN- γ aktiviert die Makrophagen, reguliert deren Expression von MHCs hoch und erhöht die IL-12-Produktion, was seinerseits die Produktion von IFN- γ in T_H1 -Zellen stimuliert (positive Rückkopplung). IFN- γ inhibiert auch die Produktion von IL-4, wodurch die Differenzierung zu T_H2 -Zellen verhindert wird. Die Makrophagen setzen zusätzlich CXCL10 (CXC-Ligand 10, auch IP-10 für interferon-gamma-induced protein) und andere Chemokine frei, die weitere Entzündungszellen (Blutmonozyten, T-Zellen) rekrutieren. Die Folge dieser komplexen Serie von Lymphozyten-Makrophagen-Interaktionen mit Produktion einer Vielzahl von Zytokinen ist zunächst ein zelluläres Infiltrat in den Alveolen, bestehend vornehmlich aus T_H1 -Zellen. Diese Alveolitis wird als Vorstufe der Granulom-Bildung in der Lunge angesehen. Sie ist in 62% der Proben von offenen Lungenbiopsien zu beobachten [106]. In der Bronchoalveolären Lavage (BAL) zeigt sie sich anhand einer merklichen T_H1 -Zell-Lymphozytose [43]. Dies erklärt den hohen CD4/CD8-Quotienten in der BAL. Ausgehend von dieser Alveolitis entwickeln sich die typischen nicht-verkäsenden Granulome.

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) scheint dabei eine bedeutende Rolle zu spielen, denn er ist erforderlich für die Entwicklung und Integrität der Granulome. Er wird hauptsächlich von Alveolarmakrophagen (AM) sezerniert, besonders zu Beginn der Granulomentstehung [36]. Denn Sarkoidosepatienten, die histologisch durch Ansammlungen von AMs, die als Vorgänger der nicht-verkäsenden Granulome gelten, charakterisiert sind, zeigen die höchsten Werte an spontan freigesetztem TNF- α .

Da auch andere proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6) bei der Sarkoidose vermehrt produziert werden, spricht man von einem Zytokin-Ungleichgewicht bei dieser Erkrankung.

Unter dem Einfluss von TNF- α und GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factors) reifen die Makrophagen zunächst zu Epitheloidzellen heran, bis sie schließlich miteinander verschmelzen und so mehrkernige Riesenzellen entstehen. Die Anzahl und Größe dieser Riesenzellen variieren, manchmal fehlen sie auch völlig. Die Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen formen das Zentrum der Granulome. Dieses wird umgeben von einem Wall aus aktivierten T-Zellen und vereinzelt B-Zellen.

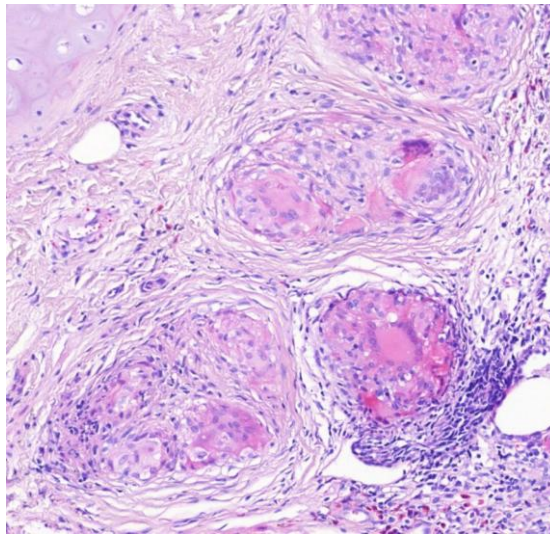


Abb. 1.2: nicht-verkäsende Granulome.

Die akute Verlaufsform der Sarkoidose macht sich durch hohes Fieber, Abgeschlagenheit, unproduktiven Husten und Dyspnoe bemerkbar. Das Löfgren-Syndrom stellt eine spezielle akute Verlaufsform der Sarkoidose dar und zeigt oft eine Trias aus (Sprunggelenks-)Arthritis, Erythema nodosum und bililärer Adenopathie. In 90 Prozent der Fälle kommt es bei der akuten Sarkoidose zu einer Spontanremission. Die Granulome können sich zurückbilden und hinterlassen nur eine zarte Narbenbildung. Es gibt Hinweise, dass TGF- β (transforming growth factor beta), ein antiinflammatorisches Zytokin, dabei eine entscheidende Rolle spielen könnte. Es ist gezeigt worden, dass kultivierte BAL-Zellen von Patienten mit einer Spontanremission mehr TGF- β freisetzen als Zellen von anderen Patientengruppen [159].

Patienten mit chronischer Sarkoidose zeigen weniger Zeichen einer systemischen Reaktion (z.B. hohes Fieber). Bei dieser Verlaufsform stehen

„lokale“ Symptome im Vordergrund, die sich auf den Befall eines bestimmten Organs zurückführen lassen. Ein Befall der Lunge präsentiert sich beispielsweise mit trockenem Husten, thorakalem Engegefühl und zum Teil ausgeprägter Belastungsdyspnoe. Es wird davon ausgegangen, dass bei der chronischen Sarkoidose kontinuierlich große Mengen an TNF- α freigesetzt wird. Dieser ständige proinflammatorische Stimulus führt zur Progression der Erkrankung. Die Granulome breiten sich immer weiter in dem jeweiligen Organ aus und zerstören so nach und nach deren Mikroarchitektur. Ist ein ausreichend großer Anteil des Organs betroffen, wird die Krankheit hier klinisch apparent.

Obwohl schon viele Mechanismen in der Entstehung der Sarkoidose aufgedeckt worden sind, gibt es trotzdem noch viele offene Fragen. Nach dem aktuellen Stand des Wissens über die Pathophysiologie dieser Erkrankung kann jedoch zusammenfassend gesagt werden: Die Sarkoidose gilt als das Ergebnis einer überschießenden Immunreaktion eines genetisch prädisponierten Individuums auf vermutlich mehrere ubiquitär vorkommende Antigene.

1.2 Regulatorische T-Zellen

1969 wird in einem Experiment normalen Mäusen zwischen dem zweiten und vierten Tag nach der Geburt der Thymus entfernt. Dieser Eingriff hat die Zerstörung der Ovarien und anderer Organe zur Folge [89]. Weitere Versuchsansätze mit Bestrahlung von adult thymektomierten Mäusen führen zu vergleichbaren Ergebnissen [95]. Interessanterweise verhindert das Einbringen CD4⁺ T-Zellen von normalen genetisch identischen Mäusen das Auftreten von solchen Autoimmunreaktionen in beiden Ansätzen [112]. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass im Thymus kontinuierlich Zellen heranreifen, die eine Immunreaktion gegen Selbst-Antigene verhindern.

1.2.1 Die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25)

Es folgen Experimente, um diese immunmodulatorischen T-Zellen von den anderen Immunzellen abzugrenzen. Es werden mehrere Oberflächenmoleküle (CD5 [110], CD45RC [100], CD45RB [84,101]) in Betracht gezogen, jedoch sind

diese zu unspezifisch. 1995 wird die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) als möglicher Kandidat identifiziert [111]. Es zeigt sich, dass der Transfer einer Zellsuspension, die von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gereinigt worden ist, in Mäusen ohne Thymus in einer Autoimmunkrankheit mündet. Wird dagegen eine kleine Zahl an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit übertragen, bleibt eine Autoimmunreaktion aus. Diese spezifische Population, die in der Folge regulatorische T-Zellen (Tregs) genannt wird, greift somit in die Erhaltung der natürlichen Selbsttoleranz und in die Kontrolle der Immunantwort gegen Selbst-Antigene ein.

Wie schon oben erwähnt exprimieren aktivierte Effektor T-Zellen (Teffs) auch CD25 auf ihrer Zelloberfläche, jedoch nicht in einem solchen Umfang wie die Tregs. Die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors ist damit kein reiner Marker für diese Zellen, aber essentiell für deren Entwicklung und Funktion.

So entwickeln Mäuse mit einem Mangel an IL-2 spontan schwere Autoimmunerkrankungen und zeigen eine Reduktion der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen trotz einer normalen Anzahl an T-Zellen und einem normalen CD4/CD8-Quotienten [114]. Die Neutralisierung von zirkulierendem IL-2 durch die Gabe von monoklonalen Anti-IL-2-Antikörpern hat eine Reduktion der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zur Folge mit den bekannten Auswirkungen [117]. Mäuse, die nur während der T-Zell-Entwicklung im Thymus vorübergehend die β -Untereinheit des IL-2-Rezeptors exprimieren, leiden nicht unter Autoimmunkrankheiten [77]. Diese und noch weitere Beobachtungen zeigen, dass IL-2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der regulatorischen T-Zellen spielt.

Doch scheint IL-2 auch bedeutend für das Überleben der Tregs zu sein. Denn die Anzahl der Tregs in der Peripherie ist in IL-2- und IL-2R-defizienten Mäusen stark reduziert. Zusätzlich lässt sich anhand von Genexpressionsanalysen zeigen, dass Signale über den IL-2-Rezeptor für die Erhaltung der Expression von Regulatorgenen des Zellwachstums und –stoffwechsels benötigt werden [37].

Dementsprechend zeigt sich in *in vitro*-Systemen, dass regulatorische T-Zellen nur proliferieren, wenn ihnen in Kultur neben einem Antigen-Stimulus über den TCR hohe Dosen an IL-2 präsentiert werden. Ansonsten vermehren sie sich

nicht [37]. Dieses IL-2 können die Tregs jedoch nicht selbst produzieren [122], sondern sie beziehen es von den aktivierten Teffs [130], die sie supprimieren sollen. Die regulatorischen T-Zellen scheinen folglich in Konkurrenz mit den aktivierten T-Zellen um das IL-2 zu treten und ihnen den wichtigen Wachstumsfaktor zu entziehen [27]. Dies wäre ein möglicher Suppressionsmechanismus.

1.2.2 Der Transkriptionsfaktor Foxp3

Wie schon erwähnt wird CD25 nicht nur von regulatorischen T-Zellen, sondern auch auf aktivierten Effektor T-Zellen exprimiert. So ist die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors kein wirklich spezifischer Marker für Tregs.

2001 wird die Mutation eines Gens auf dem X-Chromosom entdeckt, die bei Scurfy-(sf)-Mäusen zu einer vermehrten Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen, zur Infiltration dieser Zellen in mehrere Organe und Erhöhung zahlreicher Zytokine führt [18]. Das Protein, welches von diesem Gen codiert wird, stellt sich als neues Mitglied einer großen Familie von Transkriptionsfaktoren heraus, die eine winged helix-forkhead DNA-Bindungsdomäne (forkhead box (Fox)) gemeinsam haben und wird Foxp3 genannt. Mutationen in dem humanen Foxp3-Gen haben eine ähnliche Erkrankung beim Menschen zur Folge. Sie wird mit IPEX abgekürzt und bedeutet Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-verknüpftes Syndrom [141]. Dieses Syndrom zeigt Ähnlichkeiten mit Erkrankungen, die in Mäusen durch das Entfernen von Tregs entstehen (siehe oben). 2003 deuten dann auch mehrere Beobachtungen daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen spielt.

So kann Foxp3-mRNA ausschließlich in $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nachgewiesen werden [52]. Nach retroviraler Transduktion von Foxp3 in naive T-Zellen entwickeln diese Phänotyp und Funktion vergleichbar mit regulatorischen T-Zellen [38]. Bei Experimenten mit Knochenmark-Chimären mit einer Mischung aus Knochenmarkzellen von Wildtyp- und von Foxp3-defizienten Mäusen kann gezeigt werden, dass aus Foxp3-defizienten Knochenmarkzellen keine $CD4^+CD25^+$ T-Zellen hervorgehen, während bei Foxp3-intakten

Knochenmarkszellen diese Zellpopulation zu finden ist und eine Erkrankung verhindert [38].

Es stellt sich jedoch noch die Frage, wie Foxp3 seine Funktionen bewerkstelligt, welche molekularen Mechanismen diesem Transkriptionsfaktor genau zugrunde liegen.

Anhand von Analysen verschiedener Mutationen des Foxp3-Gens von Patienten mit IPEX können den verschiedenen Domänen im Protein Aufgaben zugeordnet werden (siehe Abb. 1.3).

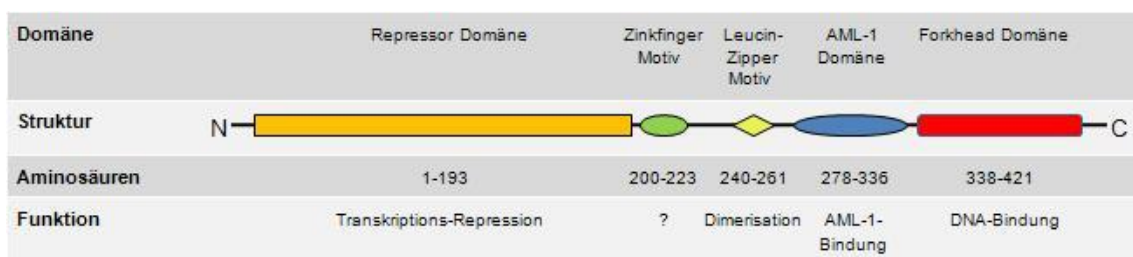


Abb. 1.3: Die funktionellen Domänen des Foxp3-Proteins (Erläuterungen siehe Text)

Aufgrund von Mutationen in der Forkhead Domäne verliert das Foxp3 seine Fähigkeit an der DNA zu binden [74]. Mutationen im Leucin-Zipper Motiv beeinträchtigen die Homo- und Heterodimerisation von Foxp3 [22]. Im Zinkfinger Motiv sind bis jetzt noch keine Mutationen beobachtet worden. Die Funktion dieses Abschnitts des Proteins ist deshalb noch unbekannt.

Mit der am Amino-Terminus gelegenen Domäne scheint Foxp3 mit anderen Transkriptionsfaktoren Komplexe zu bilden und dadurch das Ablesen mehrerer Gene zu beeinflussen. Zum Beispiel kann Foxp3 NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) binden [147]. NFAT ist ein Transkriptionsfaktor und formt normalerweise Komplexe mit AP-1 (activator protein 1). Das entstehende NFAT:AP-1 DNA-Element reguliert für die T-Zell-Aktivierung wichtige Gene, unter anderem bindet es an der ARRE2 (antigen receptor response element 2)-Stelle im IL-2-Promotor. Foxp3 konkurriert nun mit AP-1 um die Komplexbildung mit NFAT und die Bindestelle am IL-2-Promotor und verhindert somit die Produktion von IL-2. Eine rein kompetitive Besetzung der DNA-Bindestelle scheint jedoch nicht auszureichen, denn beim Fehlen der N-terminalen Region verliert das Foxp3-Molekül seine Funktion. Wahrscheinlich rekrutiert dieser

Abschnitt noch weitere Co-Repressoren und/oder Co-Aktivatoren entweder unabhängig oder durch eine gesonderte Interaktion mit NFAT.

Mit dem Proteinabschnitt zwischen dem Leucin-Zipper Motiv und der Forkhead Domäne bindet Foxp3 AML1 (acute myeloid leukaemia 1) [94]. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Genexpression von IL-2 und IFN- γ in CD4⁺-T-Zellen durch Bindung an die jeweiligen Promotoren. Die Interaktion dieser beiden Moleküle verhindert für sich allein genommen ebenfalls die Produktion von IL-2.

Foxp3 agiert aber nicht nur über die Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren, sondern aktiviert oder unterdrückt die Gene auch direkt. So kann Foxp3 an die Promotoren der Gene für IL-2, CD25, CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4), GITR (glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein) [23] und CD127 (α -Untereinheit des IL-7-Rezeptors) [72] binden, das Chromatin umorganisieren und dadurch die Transkription der Gene induzieren oder im Fall von CD127 verhindern.

Foxp3 selbst wird nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors exprimiert [79]. Das Signal wird wahrscheinlich über den Ca²⁺-Calcineurin-Signalweg weitergeleitet, denn die Foxp3-Expression in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wird durch Cyclosporin A inhibiert. Über Calcineurin wird NFAT mobilisiert, welches zusammen mit AP-1 an speziellen Stellen im Foxp3-Promotor binden kann und so die Transkription antreibt. Chromatin-Remodeling scheint ein zusätzlicher Mechanismus zu sein, der den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu dem Foxp3-Promotor reguliert.

Das entstandene Foxp3 führt schließlich zur Ausprägung von für die Suppression notwendigen Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen.

1.2.3Suppressions-Mechanismen regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen verlassen sich nicht auf einen einzigen Suppressions-Mechanismus, sondern haben vielmehr ein ganzes Arsenal an regulatorischen Mechanismen zur Verfügung. Diese können in vier Hauptmodi unterteilt werden: inhibitorische Zytokine, Zytolyse, Unterbrechung des Metabolismus der Zielzelle, Modulation der Funktion von APCs (siehe auch Abb. 1.4):

Es ist beschrieben worden, dass Tregs Teffs via direkten Zellkontakt über membrangebundenes TGF- β inhibieren können (1) [86]. Membran gebundenes TGF- β kann aber auch in Teffs zu Anergie führen und bringt sie dazu IL-10 und TGF- β zu sezernieren (sogenannte „bystander suppression“) (2) [8,62]. Inwiefern antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β , IL-35), die direkt von Tregs sezerniert werden, eine Rolle spielen, wird noch diskutiert (3) [137]. Tregs sind fähig Teffs und Antigen-präsentierende Zellen durch direkten Zellkontakt mittels Granzym A (GZ-A) bei Menschen und mittels Granzym B (GZ-B) bei Mäusen in die Apoptose zu treiben (4) [44]. Durch die beiden

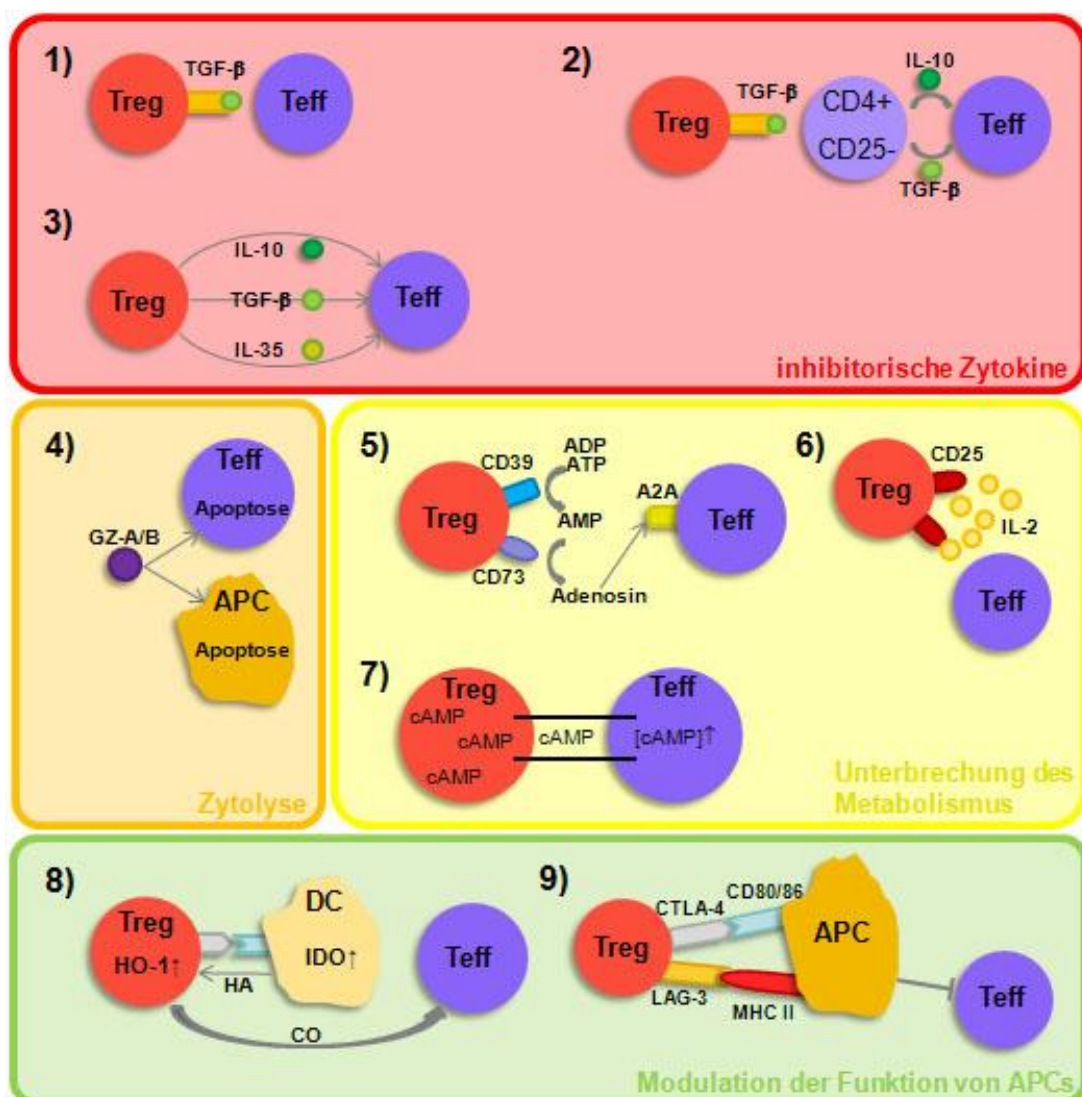


Abb. 1.4: mögliche Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen

Oberflächenmoleküle CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) und CD73 (Ecto-5'-Nukleotidase), wird extrazelluläres Adenosintriphosphat

(ATP) letztendlich zu Adenosin umgewandelt, welches an den Adenosin-Rezeptor A2A bindet und so aktivierte T-Zellen supprimiert (5) [28]. Auch sind Tregs durch ihren hohen Besatz mit CD25 auf ihrer Oberfläche dazu imstande den Teff IL-2 zu entziehen (6) [27]. Tregs können auch über gap junctions zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in Teffs schleusen, was zur Hemmung führt (7) [16]. Die Interaktion zwischen Tregs und Dendritischen Zellen (DCs) induziert wahrscheinlich das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in den DCs, was im Gegenzug die Häm Oxygenase-1-(HO-1)-Aktivität in den Tregs via HA (3-hydroxyanthranilic acid) erhöht. Das Produkt der HO-1, Kohlenmonoxid (CO), hemmt die Proliferation von T-Zellen (8) [140]. Letztlich sind regulatorische T-Zellen in der Lage die Funktionen von APCs via Interaktion von CTLA-4 und LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) auf der Oberfläche von Tregs und deren Bindungspartner CD80/86 und MHC II auf den APCs zu verändern (9) [120,128,137].

Abschließend kann gesagt werden, dass eine spezifische Population aus T-Zellen, die durch die Expression von CD25 und Foxp3 sowie weiteren Oberflächenmolekülen charakterisiert ist, durch wahrscheinlich viele verschiedene Mechanismen Immunzellen in ihrer Aktivität hemmen kann und so zur Erhaltung der Selbsttoleranz und zur Begrenzung von Immunreaktionen beiträgt.

2 Zielsetzung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gilt die Sarkoidose als das Ergebnis einer überschießenden T_H1-Immunreaktion eines genetisch prädisponierten Individuums auf ubiquitär vorkommende, eigentlich nicht krankmachende Antigene. Das Immunsystem der Sarkoidose-Patienten reagiert gegenüber Antigenen, die von einem gesunden Immunsystem toleriert werden.

Regulatorische T-Zellen sind essentiell für die Tolerierung von Selbstantigenen und die Begrenzung von Immunreaktionen. Betrachtet man nochmals die Pathophysiologie der Sarkoidose auf dem Hintergrund dieses Wissens, ergibt sich die Frage, welche Rolle diese immunmodulatorischen Zellen in der Entstehung dieser Erkrankung spielen.

Von Miyara *et al.* [83] wird beschrieben, dass die Zahl an regulatorischen T-Zellen aus der Bronchoalveolären Lavage (BAL) und aus dem Blutkreislauf bei Patienten mit einer aktiven Sarkoidose erhöht ist. Wie die Zahl der regulatorischen T-Zellen bei einem chronisch aktiven Verlauf der Sarkoidose ist, ist in diesem Artikel nicht behandelt worden.

Deshalb ist es das Ziel dieser Dissertation die Zahl der regulatorischen T-Zellen aus der BAL und dem Blut bei den verschiedenen Verlaufsformen dieser Erkrankung und bei Normalpersonen zu bestimmen und zu vergleichen.

TNF- α spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Integrität der Granulome und damit in der Krankheitsentstehung. Somit kann man dieses Zytokin als einen der Gegenspieler der regulatorischen T-Zellen ansehen. Deshalb soll im Rahmen dieser Dissertation zusätzlich TNF- α aus den Überständen der BAL bestimmt werden, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen diesen beiden Akteuren zu finden.

Anhand der Ergebnisse erhoffe ich mir ein weiterführendes Verständnis der Pathophysiologie der Sarkoidose.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D LaminAir HB2448, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D
Pipetten	Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer	VortexMixer, neoLab, Heidelberg, D Whirli Mixer, Laboratory FSA Supplies, Loughbrough, UK
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D Centrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D Labofuge 400R, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D
Mikroskop	Axiolab A, Carl Zeiss Microscopy, Jena, D
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
MoFlo High Speed Sorter	Dako, Glostrup, DK
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
VarioMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
μQuant™ Microplate Spektralphotometer	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D

3.1.2 Software

FlowJo 8.5.3	Tree Star, Ashland, OR, USA
Statview 5.0.1™	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

MikroWin Version 4 Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	Brand, Wertheim/Mainz, D
Reagenzröhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NY, USA
	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim/Main, D
FACS-Röhrchen (0,6 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
FACS Flow TM	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACS Rinse TM	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACS Clean TM	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
MACS® Separation Columns LD	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Costar® 48 Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

3.1.4 Chemikalien

Fetal Calf Serum (FCS) Stammlösung	PAA, Laboratories, Pasching, A
Lymphozyten Separationsmedium	PAA, Laboratories, Pasching, A
Türk-Lösung	Merk, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt, D
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	GIBCO®, Paisley, UK
Saponin	Fluka, Buchs, CH
Streptomycin	GIBCO®, Paisley, UK
Penicillin	GIBCO®, Paisley, UK
L-Glutamin	GIBCO®, Paisley, UK
RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institut Medium 1640)	GIBCO®, Paisley, UK

3.1.5 Antikörper

FACS:

IgG2a Control (FITC)	ImmunoTools, Friesoythe, D
Anti-human CD4 (RPE-Cy5) (Klon: MT310)	Dako, Glostrup, DK
Anti-human CD25 (FITC) (Klon: M-A251)	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-human IL-7 R α /CD127 (PE) (Klon: hIL-7R-M21)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-human Foxp3 (PE) (Klon: PCH 101)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-human Foxp3 Staining Set (PE) (Klon: PCH 101)	eBioscience, San Diego, CA, USA

MACS:

CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
--	---

Coating:

Anti-human CD3 (Klon: HIT3a)	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-human CD28 (Klon: CD28.2)	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA

ELISA:

Human TNF- α /TNFSF1A Duoset	Minneapolis, MN, USA
-------------------------------------	----------------------

3.1.6 Medien und Reagenzien

FACS-Puffer:	1% FCS	45 ml DPBS
		5 ml FCS Stammlösung
	Saponin	49,5 ml 1% FCS
		0,5 ml Saponin
MACS-Puffer:	500 ml DPBS	
	25 ml BSA (10%)	
	2 ml EDTA (0,5M)	

ELISA-Waschpuffer	100 ml 10x DPBS 0,5 ml Tween 20 900 ml demineralisiertes H ₂ O pH 7,2 - 7,4
ELISA-Blockpuffer	DPBS 1 % Bovine Serum Albumin (BSA) 0,05 % NaN ₃
ELISA-Substratpuffer	3,15 g Zitronensäure-Monohydrat 500 ml Aqua bidest.
ELISA-TMB-Lösung	480 mg Tetramethyl Benzidine (TMB) 10 ml Aceton 90 ml Ethanol 200 µl H ₂ O ₂
Kulturmedium:	RPMI 1640 Medium 10 % FCS 100 U/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Probanden

Bei den Patienten ist die Diagnose Sarkoidose nach den Richtlinien der American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) gestellt worden. Bei Patienten mit einem spontan regredienten Verlauf hat sich die Sarkoidose nach einer akuten Erkrankungsphase mit starken körperlichen Symptomen ohne Therapie selbständig zurückgebildet und keinerlei Einschränkungen der Organfunktionen hinterlassen. Eine Vielzahl der akut verlaufenden Sarkoidosen hat sich klinisch als Löfgren-Syndrom präsentiert. Patienten mit chronisch aktiver Sarkoidose haben aufgrund anhaltender Symptome und einer Verschlechterung der Lungenfunktion eine Behandlung mit Kortison benötigt. Bei Patienten mit nicht aktiver Sarkoidose hat es keiner

immunsuppressiven Behandlung bedurft. Der Verlauf der Erkrankung bei den Patienten ist über den Zeitraum eines Jahres verfolgt worden.

Das Blut ist den Patienten bei Kontrolluntersuchungen in der Pneumologischen Ambulanz der medizinischen Universitätsklinik Freiburg nach deren Einwilligung abgenommen worden. Die Bronchoskopie und die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) sind im Rahmen der Routinediagnostik in der Pneumologischen Abteilung der medizinischen Universitätsklinik Freiburg durchgeführt worden.

Die Kontrollpersonen haben sich weitestgehend aus Mitarbeitern der Pneumologischen Abteilung der medizinischen Universitätsklinik Freiburg und aus einzelnen Freiwilligen von Extern rekrutiert. Ihnen ist nach deren Einwilligung Blut entnommen worden. Die Bronchoskopie und die BAL ist nach Aufklärung und Einwilligung durchgeführt worden. Die Teilnehmer sind mit einem Geldbetrag entlohnt worden.

3.2.2 Bronchoalveoläre Lavage

Nach Prämedikation mit Midazolam und Codein und der Applikation eines Lokalanästhetikums im Bereich der oberen Atemwege (Novesin-Spray®) werden 300 ml einer angewärmten Kochsalzlösung in Aliquots von 20 ml in den Mittellappen der rechten Lunge instilliert und umgehend aspiriert. Die hierbei gewonnene Flüssigkeit wird sofort auf Eis gelagert und der weiteren Aufarbeitung zugeführt.

3.2.3 Aufarbeitung der BAL

Zur Entfernung von Schleimbestandteilen und groben Verunreinigungen erfolgt zunächst die Filtration der BAL-Flüssigkeit durch eine sterile Kompresse. Die Flüssigkeit wird in 50 ml Röhrchen aufgefangen und anschließend bei 500g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das verbliebene Zellsediment in 40 ml Waschpuffer (DPBS mit 1% FCS) resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift und nach Abnehmen des Überstandes werden die gereinigten Zellen in DPBS aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.4 Entnahme von venösem Blut

Den Probanden werden zwei 9 ml EDTA-Röhrchen aus der Vena mediana cubiti entnommen und sofort weiterverarbeitet.

3.2.5 Zellseparation aus venösem Blut

Das venöse Blut wird in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit DPBS auf 30 ml aufgefüllt. Um aus dem Blut mononukleäre Zellen (mononuclear cells, MNCs) zu separieren, wird das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation angewendet. Dazu wird in einem weiteren Röhrchen 20 ml Lymphozyten Separationsmedium

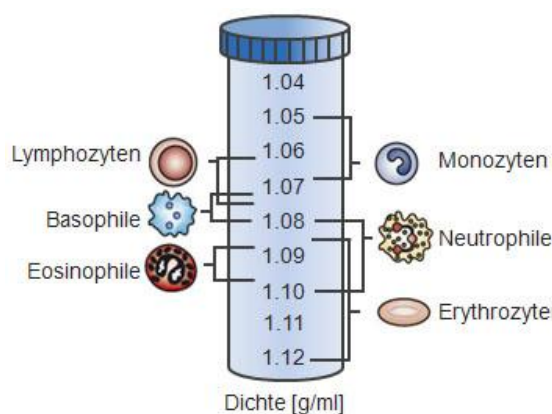


Abb. 3.1: Dichtegradientenzentrifugation,
Dichte der verschiedenen Blutzellen

mit einer Dichte von 1,077 g/ml vorgelegt und das verdünnte Vollblut vorsichtig darüber geschichtet. Erythrozyten und Granulozyten passieren aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes den Gradienten und sedimentieren auf den Boden des Röhrchens. Lymphozyten und Monozyten hingegen sammeln

sich aufgrund ihres spezifischen Gewichtes $<1,077$ g/ml an der Interphase zwischen Plasma und Separationsmedium an. Mit Hilfe einer Pipette können die Zellen sorgfältig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt werden. Daran schließt sich ein Waschschrift mit DPBS an. Der Überstand wird anschließend verworfen. In dem Zellpellet finden sich trotz der Dichtegradientenzentrifugation noch einige Erythrozyten. Deshalb wird den Zellen zunächst 10 ml 0,2%ige NaCl-Lösung, dann 10 ml 1,6%ige NaCl-Lösung beigelegt. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Die verbliebenen Zellen werden in 10 ml DPBS resuspendiert.

3.2.6 Zellfärbung

Die Gesamtzahl der isolierten Zellen errechnet man aus der durch die Zellfärbung bestimmten Zelldichte. Dazu werden 10 μ l Zellsuspension mit 90 μ l Türkscher Lösung vermischt. Anschließend wird die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer im Lichtmikroskop bestimmt, wobei vier Großquadranten mit je

0,01 µl Volumen ausgezählt werden. Die durchschnittliche Zahl der Zellen je Großquadrant mit 10^5 multipliziert ergibt die Zahl der Zellen in einem Milliliter.

3.2.7 Zellfixierung

Um eine spätere Zellfärbung mit Saponin für die Durchflusszytometrie möglich zu machen, müssen die isolierten Zellen fixiert werden.

Die Zellen werden mit 200 µl 4%igem Paraformaldehyd versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es schließen sich zwei Waschschrte mit DPBS an. Die fixierten Zellen werden schließlich in 200 µl DPBS aufgenommen und für die folgenden Messungen im Kühlschrank (4°C) bereitgestellt.

3.2.8 Zellfärbung für Durchflusszytometrie

Von den fixierten BAL-Zellen und den fixierten MNCs aus dem Blut werden jeweils drei Ansätze angefertigt. Bei dem ersten Ansatz werden die Oberflächenmoleküle CD4 (Corezeptor des T-Zell-Rezeptors), CD25 (α-Kette des IL-2-Rezeptors) und CD127 (α-Kette des IL7-Rezeptors) mit Antikörpern, die mit Fluorochrome (siehe Tabelle 3.1) markiert sind, angefärbt. Bei dem zweiten Ansatz werden das CD4-Molekül und das intrazellulär gelegene Foxp3 (Transkriptionsfaktor) markiert. Bei dem dritten Ansatz wird der Zellsuspension neben CD4- auch IgG-Antikörper hinzugefügt, um unspezifische Bindungen, die falsch positive Ergebnisse liefern, zu detektieren (Isotypenkontrolle). Bei der Auswertung der Proben wird die Isotypenkontrolle quasi als Leerwert abgezogen.

Für jeden Ansatz werden jeweils eine Million fixierte Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die fixierten Zellen werden in 1%iger FCS-Lösung resuspendiert und bei 2000g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Dem ersten Ansatz wird 0,5 µl Stammlösung Anti-human-CD4, 1 µl Stammlösung Anti-human-CD25 und 0,5 µl Stammlösung Anti-human-CD127 hinzugefügt. Die Zellen inkubieren im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 min. Es schließen sich zwei Waschschrte mit 1%iger FCS-Lösung an. Die Zellen werden dann in 200 µl 1%iger FCS-Lösung aufgenommen.

Dem zweiten Ansatz wird im ersten Färbungsschritt 0,5 µl Stammlösung Anti-human-CD4 beigemischt. Nach 20 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die Probe zunächst mit 1%iger FCS-Lösung, dann mit Saponin-Lösung gewaschen. Anschließend wird der Zellsuspension verschiedene Mengen Stammlösung Anti-human-Foxp3 (1µl, 1,5µl, 3µl) zugegeben. Nach erneuter Inkubation und zwei Waschschritten mit Saponin-Lösung können die Zellen ebenfalls in 200 µl 1%iger FCS-Lösung aufgenommen werden.

Bei einem dritten Protokoll für diesen Ansatz werden 5 Millionen unfixierte Zellen 10 µl Stammlösung Anti-human-Foxp3 zugegeben. Die Waschschrritte erfolgen mit einer im Set mitgelieferten Fixations-/Permeabilisationslösung.

Beim dritten Ansatz wird den Zellen 0,5 µl Stammlösung Anti-human-CD4 und 0,5 µl IgG-Antikörper-Stammlösung beigefügt. Nach 20 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit 1%iger FCS-Lösung kann die Messung mit dem FACS erfolgen.

3.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine zellbiologische Methode, welche die Identifizierung und das Sortieren von Zellen aufgrund ihrer Größe, Struktur und

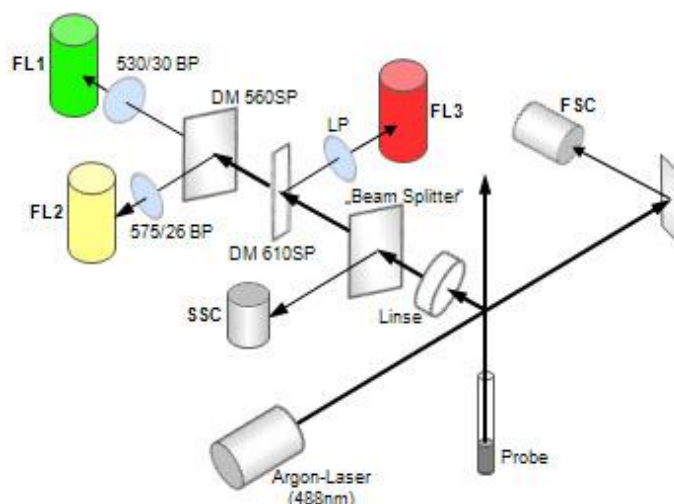


Abb. 3.2: Aufbau des optischen Systems eines Durchflusszytometers mit Detektion von 5 Parametern: FSC, SSC, FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (RPE-Cy5).
FSC = Forward Scatter; SSC = Side Scatter;
DM = Dichroic Mirror; SP = Short Pass Filter;
LP = Long Pass Filter; BP = Band Pass Filter.

spezifischer extra- und intrazellulärer Moleküle ermöglicht. Die Apparatur besteht aus drei Teilen, der optischen Einheit (Laser), dem Flüssigkeitssystem (Trägersystem) und der Signalverarbeitung.

Das Gemisch von Zellen wird in eine Quarzküvette eingesaugt. So entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl, in dem die einzelnen Zellen

perlschnurartig angeordnet sind (sog. hydrodynamische Fokussierung). Alle Zellen passieren einen senkrecht gerichteten Laserstrahl (Argonlaser, Wellenlänge von 488 nm).

Das Laserlicht wird an den Zellen in verschiedene Richtungen gestreut. Vom Streulicht erfasst der Durchflusszytometer sowohl das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC, 2°-15° vom Laserstrahl) als auch das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC, 90° vom Laserstrahl). Dabei ist FSC ein Maß für die Größe der Zelle, während SSC Informationen über die innere Struktur und Granularität der Zelle liefert.

Der Gebrauch von spezifischen mit Fluorochrome markierten Antikörpern erlaubt es zudem die Expression von bestimmten Molekülen auf und in der Zelle nachzuweisen.

Fluorochrome sind Farbstoffe, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Die eingestrahlte Lichtenergie hebt dabei Elektronen aus der Hülle in ein höheres Energieniveau. Durch das Zurückfallen in niedrigere Energieniveaus werden Photonen freigesetzt, was zur Lichtemission führt. Das emittierte Licht hat weniger Energie und deshalb eine längere Wellenlänge als das absorbierte Licht. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Übersicht über verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Funktionsweise	Em _{max} (nm)
Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)	Kopplung an monoklonale Antikörper	519
Phycoerythrin (PE)	Kopplung an monoklonale Antikörper	578
Cychrome (PE-Cy5)	Kopplung an monoklonale Antikörper	666
Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE)	Anfärben des Cytosols lebender Zellen durch Bindung an Proteine	517

Das Fluoreszenzlicht wird mit einer Linse gesammelt, die in einem Winkel von 90° zur Richtung des Laserstrahls steht. Geeignete dichroische reflektierende

Filter teilen das gesammelte Licht in verschiedene Wellenlängenbereiche und lenken es zu Detektoren, die spezifisch sind für das zu messende Fluorochrom. Photomultiplier Detektoren (PMT) konvertieren das Licht zu elektronischen Signalen, deren Intensität proportional zur Intensität des Lichts ist.

Die meisten Fluorochrome strahlen jedoch nicht streng eine Farbe aus, sondern ein ganzes Spektrum. So wird das Fluoreszenzlicht eines Farbstoffs nicht nur an dem dafür vorgesehenen Detektor wahrgenommen, sondern verursacht auch in den anderen Detektoren einen (wenn auch schwächeren) Impuls. Dies beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse, da man so bei Mehrfarbanalysen nicht mehr weiß, welcher Farbstoff das Signal des Detektors verursacht hat.

In der vorliegenden Arbeit betrifft dies besonders das Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) und das Phycoerythrin (PE), dessen Emissionsspektren sich überlappen. Deshalb erfolgt während der Messung elektronisch eine Kompensation.

Die grafische Darstellung der Zellen auf dem Computer erfolgt als Punkte in einem Koordinatensystem. Dies bezeichnet man als „Punktediagramm“ (Dot Plot). In einem Streulicht-Dot-Plot werden die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) dargestellt. Die Zellen können anhand ihrer Koordinaten einer Population zugeordnet, eingegrenzt und separat auf ihre Fluoreszenzmarker hin untersucht werden.

3.2.10 Auswertung der FACS-Messungen

Die Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie erfolgt mit dem Analyse-Programm FlowJo der Firma Tree Star.

In einem ersten Schritt wird in dem Streulicht-Dot-Plot die Zellpopulation, die man weiter analysieren will, ausgewählt. Dies nennt man Gaten („Schleusen“). Dabei werden die Zellen von Interesse eingekreist und als Region definiert. In dem folgenden Fluoreszenz-Dot-Plot werden nur die Zellen dieser definierten Region angezeigt (siehe Abb. 3.3, 1). Die gatedeten Lymphozyten werden in einem Fluoreszenz-Dot-Plot CD127-PE/CD25-FITC zur Darstellung gebracht. CD127, die α -Untereinheit des IL7-Rezeptors, ist ein Marker für über den TCR aktivierte CD4⁺ T-Zellen. Diese regulieren die Expression des CD25-Moleküls

auf ihrer Oberfläche hoch. Damit diese Zellen nicht in das Ergebnis als regulatorische T-Zellen mit eingehen, werden diese $CD127^+CD25^+$ T-Zellen ausgespart. Im folgenden Dot-Plot werden somit nur die $CD4^+CD25^+CD127^-$ T-Zellen dargestellt (siehe Abb. 3.3, 2). Dadurch wird der Anteil der regulatorischen T-Zellen an den Lymphozyten theoretisch überschätzt, jedoch

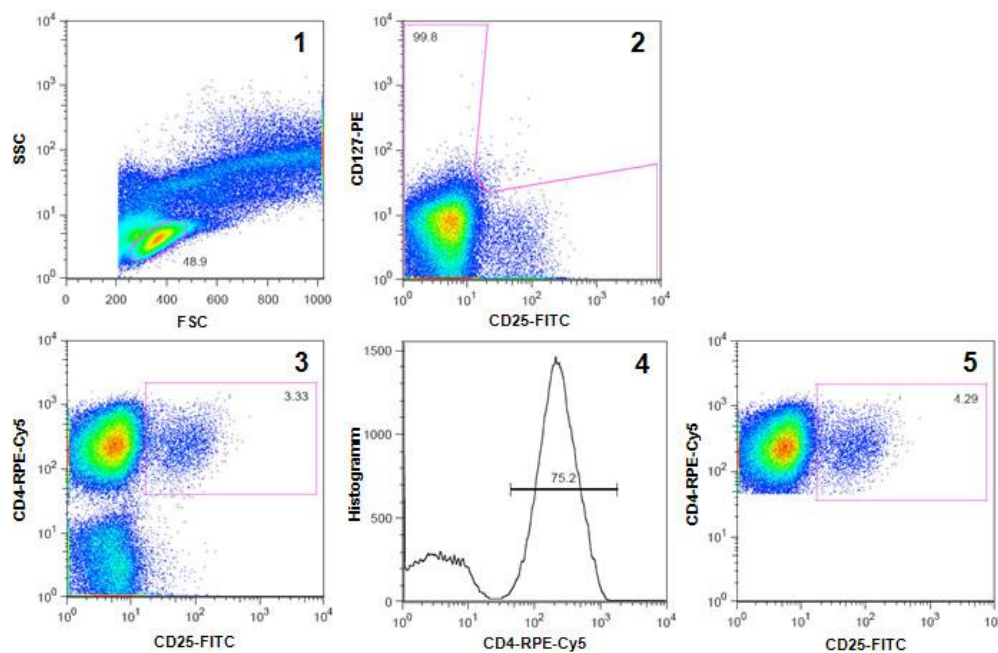


Abb. 3.3: Auswertung der FACS-Messungen (Erläuterungen siehe Text)

ist die Zahl der gemessenen aktivierten $CD4^+$ T-Zellen so gering, dass sie zu vernachlässigen sind.

In dem darauffolgenden Fluoreszenz-Dot-Plot $CD4\text{-RPE-Cy5}/CD25\text{-FITC}$ können die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (regulatorische T-Zellen) quantifiziert und der Prozentsatz dieser Zellen an den Lymphozyten bestimmt werden (siehe Abb. 3.3, 3).

Im nächsten Schritt werden die $CD4^+$ T-Zellen unter den Lymphozyten gated. Dazu werden die Lymphozyten in einem Histogramm nach CD4 aufgetragen. Die $CD4^+$ T-Zellen können so abgegrenzt werden (siehe Abb. 3.3, 4).

In einem Fluoreszenz-Dot-Plot $CD4\text{-RPE-Cy5}/CD25\text{-FITC}$ kann dann der Prozentsatz der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen an den $CD4^+$ T-Zellen bestimmt werden (siehe Abb. 3.3, 5).

3.2.11 Zellsortierung eines BAL-Zellgemisches

Mittels MoFlo High Speed Sorter können bestimmte zuvor mit Fluorochrome markierte Zellen aus einem Gemisch von BAL-Zellen sortiert werden.

Bei den BAL-Zellen werden die CD4- und CD25-Moleküle mit Anti-human-CD4- und Anti-human-CD25-Antikörpern markiert (siehe Kapitel 3.2.8). Bei der anschließenden Sortierung wird das Zellgemisch wie bei einem FACS-Gerät eingesaugt und perlschnurartig an dem Argonlaser vorbeigeleitet. Durch die Detektoren werden die Fluoreszenzen erfasst und auf dem Computer in einem Fluoreszenz-Dot-Plot dargestellt. Diejenigen Zellpopulationen, die angereichert werden sollen, werden auf dem Bildschirm markiert. Da in der Düse periodische Druckschwankungen auf den Flüssigkeitsstrahl ausgeübt werden, reißt dieser nach der flusszytometrischen Messung ab und es kommt zur Tröpfchenbildung. Der Flüssigkeitsstrahl wird durch die Sortierelektronik im Augenblick des Abreißens positiv oder negativ aufgeladen, falls die Zelle im gerade abreißenden Tröpfchen nach rechts bzw. nach links sortiert werden soll. Die elektrische Ladung bleibt auf dem Tröpfchen, wenn es vom Flüssigkeitsstrahl abgerissen ist. Im folgenden elektrischen Feld werden die geladenen Tröpfchen, die die gewünschten Zellen enthalten, nach rechts bzw. links entsprechend ihrer Ladung elektrostatisch abgelenkt und werden getrennt aufgefangen. Eine anschließende Reanalyse dient der Erfassung der Reinheit der sortierten Zellen.

3.2.12 Anlegen von Kulturen zur Proliferationsmessung von BAL-Zellen

Die zuvor aus der BAL sortierten Zellen werden zusammen mit allopathen MNCs nach dem Schema in Tabelle 3.2 kokultiviert. Die MNCs dienen in diesem Kulturansatz als TCR-Stimulus und somit als Proliferationsreiz für die $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. Die Zellen sind zuvor bestrahlt worden, damit sie selbst nicht mehr proliferieren können.

Tabelle 3.2: Überblick über die Zellkulturen zur Proliferationsmessung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der BAL

Zeile	allogene MNCs	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen
1	50 000	20 000	-
2	50 000	20 000	-
3	50 000	20 000	20 000
4	50 000	20 000	10 000
5	50 000	20 000	4 000
6	50 000	20 000	2 000

Die Kulturen werden für sieben Tage im Inkubator bei 37°C bebrütet.

3.2.13 Proliferationsmessung mittels [³H]-Thymidin

Nach siebentägiger Inkubation werden die Zellen vom oben genannten Kulturansatz mit [³H]-Thymidin ($1,85 \times 10^4$ Bq/Kultur) versetzt und für 18 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden die Platten eingefroren und zur weiteren Verarbeitung gebündelt aufgetaut. Danach wird die Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen mit einem Betaplate-Zähler gemessen. Dabei wird die radioaktive Zerfallszahl pro Kulturschale und pro Minute gemessen.

3.2.14 Coating von Kulturplatten mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper

In eine 48 Well Zellkulturplatte werden pro Well 200 µl einer Lösung aus Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper mit DPBS gegeben. Die Konzentration beider Antikörper in der Lösung beträgt 2,5 µg/ml. Die Zellkulturplatte wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Überstände werden abgeklopft und die Wells zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden sofort die Proben aufgetragen.

3.2.15 MACS-Separation von regulatorischen T-Zellen

Magnetic Cell Separation dient der Sortierung von Zellgemischen beziehungsweise der Abtrennung von bestimmten Zellen aus einem Gemisch anhand von bestimmten Oberflächenstrukturen der Zellen.

Die Zellen werden mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Dabei handelt es sich um etwa 50 nm große Magnetpartikel, an die Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper erkennen spezifische Strukturen auf der Oberfläche von Zellen und sorgen damit für die Bindung der MicroBeads an die gewünschte Zellpopulation. Beim Durchfluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die mit den MicroBeads markierten Zellen zurückgehalten. Nach Entfernen des Magnetfeldes können die markierten Zellen gewonnen werden.

Magnetische Markierung von CD4⁺ Zellen

Die MNCs werden aus venösem Blut nach dem oben aufgeführten Verfahren isoliert. Die gewonnenen Zellen werden bis zu einer Zellzahl von 10^7 in 90 µl MACS-Puffer aufgenommen. Liegt die Anzahl der Zellen höher, müssen die Volumina entsprechend angepasst werden, z.B. muss bei 2×10^7 Zellen das doppelte Volumen an MACS-Puffer verwendet werden. Der Zellsuspension werden 10 µl Biotin-Antibody Cocktail beigemengt. Der Ansatz wird 10 min bei 4-8°C inkubiert. Anschließend gibt man 20 µl Anti-Biotin MicroBeads hinzu und inkubiert für 15 min bei 4-8°C. Die Zellen werden nach Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden bis zu einer Zellzahl von 10^8 in 500 µl resuspendiert.

Magnetische Separation: Entfernen von CD4⁺-Zellen

Die LD-Säule wird mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wird auf die Säule gegeben. Es wird mit 3 x 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Die unmarkierten Zellen (Negativ-Fraktion, hier die CD4⁺ T-Zellen) werden in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die CD4⁺ T-Zellen werden anschließend gezählt.

Magnetische Markierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Die CD4⁺ T-Zellen werden in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. 10 µl CD25-MicroBeads werden hinzugefügt. Die Zellen werden 15 min bei 4-8°C inkubiert. Anschließend wird der Zellsuspension 1-2 ml MACS-Puffer zugegeben. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Magnetische Separation: positive Selektion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen.

Nachdem die LS-Säule mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült worden ist, gibt man die Zellsuspension auf die Säule. Die Säule wird mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült. Die $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Negativ-Fraktion) werden gesammelt. Anschließend wird die Säule aus der Aufhängung entfernt. Es werden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (Positiv-Fraktion) werden mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gespült. Bei beiden Fraktionen wird die Zellzahl bestimmt.

3.2.16 Labeln der $CD4^+CD25^-$ Zellen mit der CFSE-Methode

Mit der Carboxyfluoreszein-Succinimidylester-Methode kann die Proliferation von humanen Lymphozyten in vitro verfolgt werden.

Initial kann der Carboxyfluoreszein-Succinimidylester aufgrund seiner zwei Acetat-Gruppen nicht fluoreszieren. Jedoch ist er dank dieser Nebengruppen gut zellmembrangängig und kann somit in die Zelle diffundieren. In der Zelle werden die beiden Acetat-Gruppen rasch durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, wodurch der CFSE stark fluoresziert, jedoch nicht mehr die Zelle verlassen kann. Die Succinimidyl-Gruppe reagiert bei neutralem pH mit Aminogruppen und bildet hochstabile kovalente Bindungen aus. Ein Teil der entstehenden Carboxyfluoreszein-Konjugate verlässt die Zelle oder wird abgebaut. Der andere Teil ist hoch stabil und verbleibt in der Zelle. Diese fluoreszierenden Konjugate werden unter den Tochterzellen aufgeteilt, wodurch das Signal pro Zellteilung halbiert wird (siehe Abb. 3.4).

Die anhand der MACS-Separation gewonnenen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen werden zuvor in 1 ml DPBS resuspendiert. 2 μ l CFSE werden der Zellsuspension direkt zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird 5 ml 10%ige FCS-Lösung beigefügt. Nach Zentrifugation werden die Zellen zweimal in Kulturmedium mit Humanserum gewaschen.

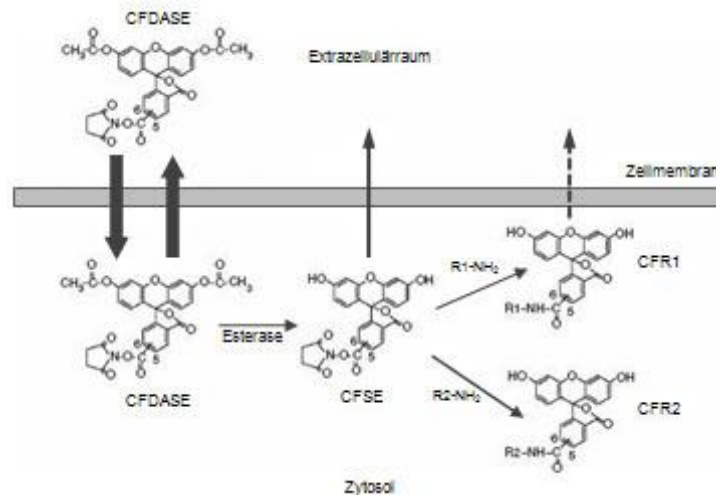


Abb. 3.4: Schematische Übersicht über die molekularen Events während des Labels mit CFDASE

3.2.17 Anlegen von Kulturen zur Proliferationsmessung von Blut-Zellen

Es werden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mit regulatorischen T-Zellen kokultiviert. Eine Übersicht der angelegten Kulturen zeigt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Zellkulturen zur Proliferationsmessung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus dem Blut

Zeile	gecoatet/ ungecoatet	$CD4^+CD25^-$ T-Zellen (gelabelt)	$CD4^+CD25^+$ T-Zellen
1	ungecoatet	500 000	-
3	gecoatet	500 000	-
4	gecoatet	500 000	500 000
5	gecoatet	500 000	250 000
6	gecoatet	500 000	100 000
7	gecoatet	500 000	50 000

Die Kulturen werden für vier Tage im Inkubator bei 37°C bebrütet.

3.2.18 Messung der Kulturen mittels Durchflusszytometrie

Nachdem die Zellen aus der Zellkulturplatte geerntet worden sind, wird das Zellgemisch direkt mit dem Durchflusszytometer gemessen. Die regulatorischen T-Zellen haben einen gewissen Autofluoreszenz-Level. Daher erscheint diese

Zellpopulation im Fluoreszenz-Dot-Plot links der mit CFSE gelabelten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (siehe Abb. 4.6).

3.2.19 ELISA zur Bestimmung von TNF- α

Die Konzentration von TNF- α aus den Überständen der BAL-Flüssigkeit wird anhand eines sogenannten Sandwich-ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Bei diesem Verfahren wird das TNF- α zwischen zwei substanzspezifischen Antikörpern, die sich gegen verschiedene Epitope dieses Zytokins richten, gebunden. Der erste Antikörper ist an eine feste Phase gebunden. Der zweite Antikörper wird durch ein Enzym markiert, welches eine Farbreaktion katalysiert. Anhand einer Standardkurve lässt sich die Konzentration des TNF- α photometrisch bestimmen.

Die ELISA-Platte wird mit 100 μ l pro Well des jeweiligen Capture-Antikörpers in DPBS inkubiert. Nach Ablauf von 12 h wird die Platte auf Zellulosepapier ausgeklopft. In jedes Well der Platte wird 200 μ l Waschpuffer pipettiert. Anschließend wird die Platte erneut ausgeklopft. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Nach diesem ersten Waschschrift werden 200 μ l Block-Puffer in jedes Well gegeben, um unspezifische Bindevorgänge zu vermeiden. Nach 1 h Inkubation folgt ein erneuter Waschschrift. Als nächstes werden die Proben und die Standards auf die Platte aufgetragen, nachdem sie zuvor mit dem passenden Verdünnungspuffer (Herstellerangabe) verdünnt worden sind. Nach 2 h Inkubationszeit erfolgt der nächste Waschschrift. Es werden im Anschluss 100 μ l des biotinylierten Zweitantikörpers in jedes Well pipettiert, worauf sich eine zweistündige Inkubationszeit anschließt. Nach einem erneuten Waschschrift wird die Platte mit 100 μ l Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat pro Well versetzt. Das Streptavidin vermittelt über das Biotin die Bindung zwischen dem biotinylierten Zweitantikörper und der Meerrettichperoxidase. Der Ansatz wird für 20 min im Dunkeln inkubiert. Es schließt sich der letzte Waschschrift an. Als nächstes wird in jedes Well 100 μ l TMB-Substratlösung (10 ml Substratpuffer mit 0,5 ml TMB-Lösung) gegeben. Nach 20 min Inkubation im Dunkeln wird die Farbreaktion mit Hilfe von 50 μ l 4N Schwefelsäure pro Well abgestoppt. Es erfolgt die sofortige Messung im ELISA-

Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Anhand der mitgelieferten Software des ELISA-Readers wird der ELISA ausgewertet.

3.2.20 Auswertung der gemessenen Daten

Die Patienten werden anhand ihres Krankheitsverlaufs (chronisch aktiv, nicht aktiv, spontan regredient) einer Gruppe zugeteilt. Die Normalpersonen werden in einer eigenen Gruppe zusammengefasst.

Mittels Statview 5.0.1 TM werden die Mittelwerte der Messwerte in den einzelnen Gruppen bestimmt. Der anschließend durchgeführte Fisher's PLSD Test vergleicht die jeweiligen Gruppen untereinander, um festzustellen, welche Gruppen sich zum Beispiel in der Anzahl der gemessenen regulatorischen T-Zellen signifikant voneinander unterscheiden. Signifikant ist der Unterschied zwischen zwei Gruppen, wenn der p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit genannt) kleiner 0,05 ist, hochsignifikant, falls der p-Wert kleiner 0,001 ist.

Mittels der Rangkorrelation nach Spearman kann die Richtung und Stärke einer Beziehung zwischen zwei Variablen getestet werden. Mit anderen Worten ist dies ein Hilfsmittel, um zu zeigen, ob im Rahmen dieser Arbeit zum Beispiel die Anzahl einer bestimmten Zellart einen Effekt auf die Menge einer anderen Zellart hat. Ist das Ergebnis des Testes null, so besteht keine Beziehung zwischen den beiden Zellpopulationen. Im anderen Fall kann von einer Beziehung ausgegangen werden.

4 Resultate

4.1 Übersicht über verschiedene Probandengruppen bei der BAL-Messung

Tabelle 4.1 liefert eine Übersicht über die gemessenen Personengruppen bei der BAL-Messung. Es wird die Anzahl der Probanden, das Durchschnittsalter, die Geschlechtsverteilung, die Zellzahlen in der BAL sowie die Lungenfunktion in der jeweiligen Gruppe aufgeführt.

4.2 CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten in der BAL

Bei den Normalpersonen ist der Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen an den gesamten Lymphozyten 3,9% (Standardabweichung SD $\pm$ 1,7%), bei den Sarkoidose-Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf 2,2% (SD $\pm$ 0,8%). Der Unterschied ist hier signifikant ($p=0,0184$). Chronisch Erkrankte haben demnach weniger regulatorische T-Zellen in der BAL als Gesunde. Bei Patienten, deren Erkrankung zur Zeit der Messung nicht aktiv gewesen ist, sind 3,3% (SD $\pm$ 1,8%) der Lymphozyten regulatorische T-Zellen. Das scheint mehr als bei chronisch aktiven Verläufen und weniger als bei Normalpersonen zu sein. Der Unterschied ist hier aber nicht signifikant ($p=0,0885$ und $p=0,3799$). Patienten, bei denen die Sarkoidose spontan ausgeheilt ist, haben im Mittel einen Prozentsatz von 4,7% (SD $\pm$ 1,9%) von regulatorischen T-Zellen an Lymphozyten. Das sind signifikant mehr Tregs als bei nicht aktiven Verläufen ($p=0,0438$) und hochsignifikant mehr als bei chronisch aktiven Verläufen ($p=0,0007$) (siehe Abb. 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht über die verschiedenen Probandengruppen bei der BAL; FVC = forcierte Vitalkapazität, TLC = totale Lungenkapazität, CO Diff = CO-Diffusionskoeffizient, FEV1 = 1-Sekundenkapazität

	Normalpersonen		Sarkoidose		
	(n=9)	gesamt (n=35)	chronisch aktiv (n=12)	nicht aktiv (n=13)	spontan regredient (n=10)
Alter	29,0 ± 8,7	48,4 ± 11,6	49,9 ± 9,3	50,8 ± 14,4	42,2 ± 7,4
Geschlecht w/m	3/6	17/18	5/7	7/6	5/5
BAL Zellzahl/100ml	5,7 ± 2,3	14,0 ± 13,7	16,2 ± 12,6	13,1 ± 18,1	12,4 ± 7,9
Alveolarmakrophagen [%]	83,6 ± 11,8	55,0 ± 23,4	38,8 ± 18,4	65,8 ± 19,4	60,6 ± 24,3
Lymphozyten [%]	15,0 ± 11,1	40,6 ± 22,2	52,3 ± 20,8	32,1 ± 18,9	37,7 ± 23,6
Neutrophile Granulozyten [%]	1,3 ± 1,0	3,0 ± 7,3	6,9 ± 11,8	1,2 ± 0,9	0,7 ± 0,5
Eosinophile Granulozyten [%]	0,2 ± 0,4	0,9 ± 1,0	1,4 ± 1,4	0,8 ± 0,6	0,4 ± 0,7
CD4/CD8	3,6 ± 3,7	5,1 ± 3,4	6,0 ± 3,6	5,6 ± 4,0	3,6 ± 1,9
FVC [%]	Keine Daten	87,0 ± 18,0	76,3 ± 17,8	88,0 ± 15,6	98,8 ± 14,6
TLC [%]	Keine Daten	85,2 ± 13,1	77,2 ± 11,6	87,4 ± 11,9	92,3 ± 11,8
CO Diff [%]	Keine Daten	100,5 ± 21,9	95,5 ± 31,5	102,5 ± 11,8	104,2 ± 18,3
FEV1 [%]	Keine Daten	76,8 ± 17,7	66,7 ± 17,1	74,9 ± 15,1	91,3 ± 11,9

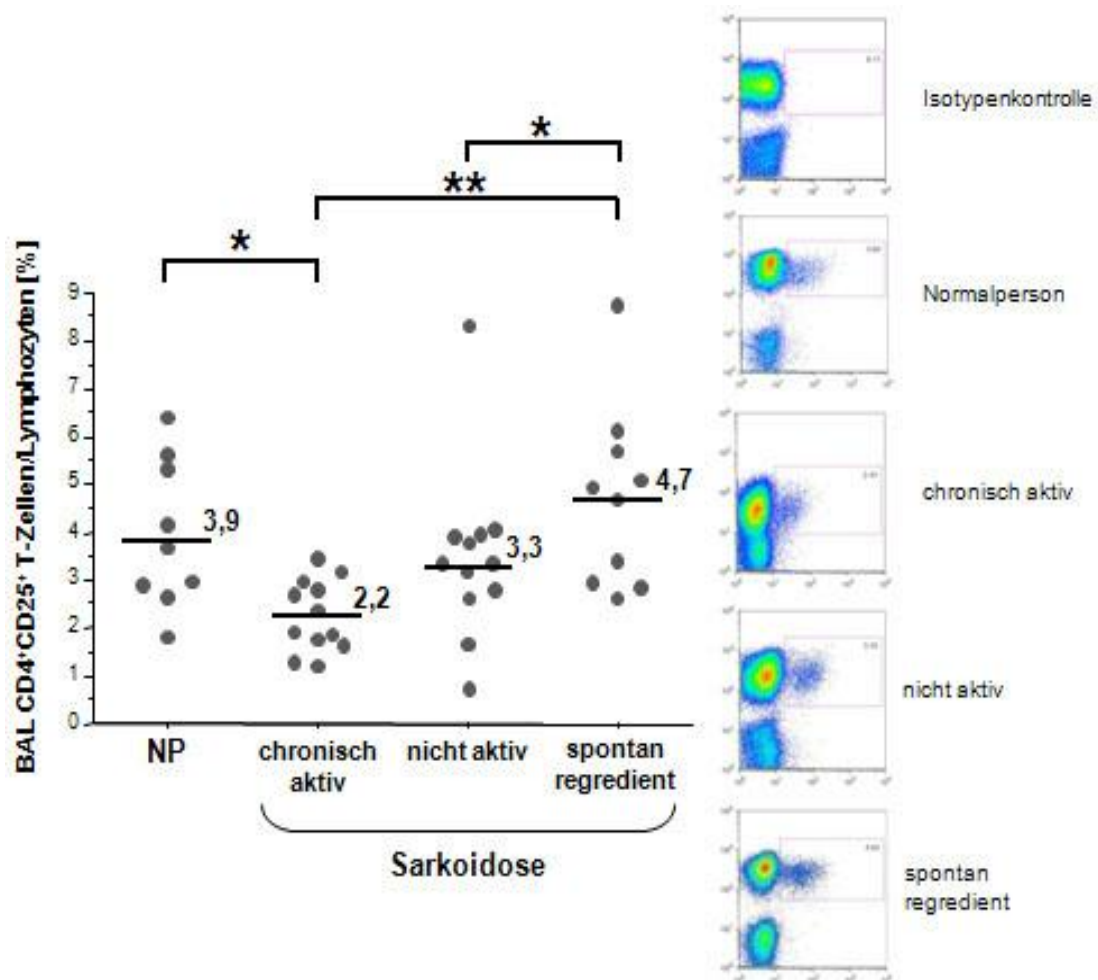


Abb. 4.1: Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen an Lymphozyten in der BAL;
NP = Normalpersonen, * = signifikant ($p < 0,05$), ** = hochsignifikant ($p < 0,001$)

Betrachtet man den Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen kommt man auf dieselben Ergebnisse, wobei sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Verläufen noch deutlicher herauskristallisieren. So sind in der BAL von Normalpersonen hochsignifikant mehr regulatorische T-Zellen als in der von chronisch Kranken ($p < 0,0001$), nämlich 7,7% (SD $\pm$ 2,3%) im Vergleich zu 3,3% (SD $\pm$ 0,7%). Bei Patienten mit zur Zeit der Messung nicht aktiver Erkrankung sind 6,0% (SD $\pm$ 2,6%) der CD4⁺ T-Zellen regulatorische T-Zellen. Das sind signifikant mehr Zellen als bei der chronisch aktiven Verlaufsform ($p = 0,0029$). Bei Patienten mit einer spontanen Remission der Sarkoidose können 7,9% (SD $\pm$ 2,5%) der CD4⁺ T-Zellen als regulatorische T-Zellen identifiziert werden. Es gibt somit keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Tregs im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($p = 0,8184$). Bei Patienten mit einer spontanen Remission lassen sich jedoch signifikant mehr

Tregs messen als bei Erkrankten mit gerade nicht aktiver Sarkoidose ($p=0,0427$) und hochsignifikant mehr als Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf ($p<0,0001$) (siehe Abb. 4.2).

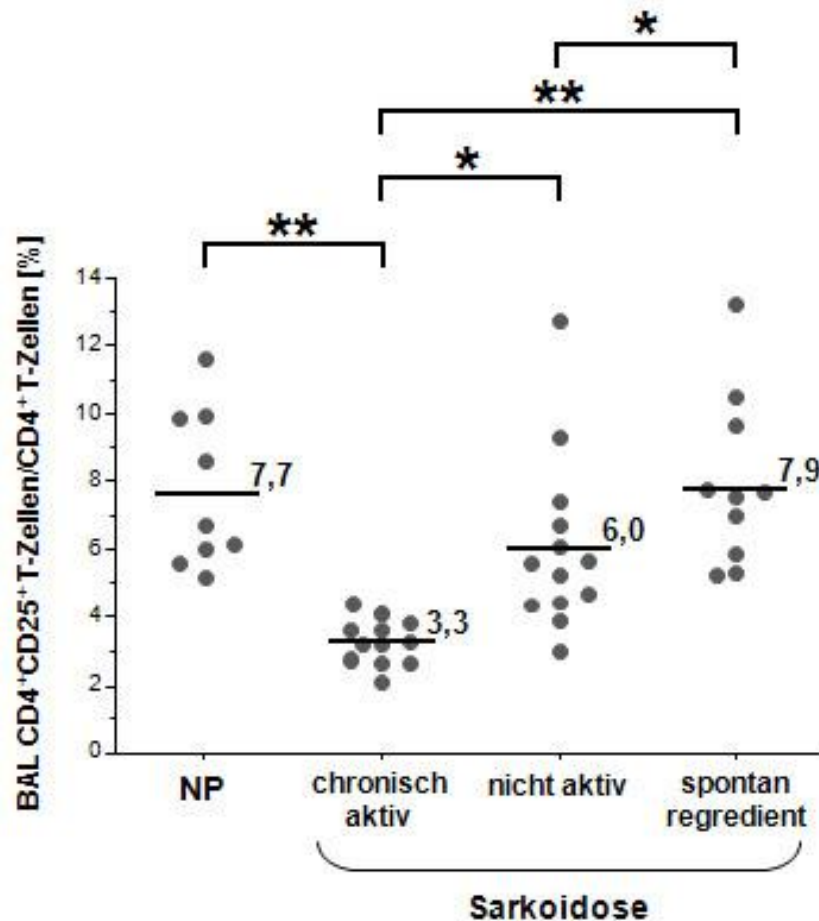


Abb. 4.2: Prozentsatz der $CD4+CD25+$ T-Zellen an $CD4+$ T-Zellen in der BAL; NP = Normalpersonen, * = signifikant ($p<0,05$), ** = hochsignifikant ($p<0,001$)

4.3 Cokultivierung von $CD4+CD25^-$ T-Lymphozyten und $CD4+CD25+$ T-Lymphozyten

Zur Bestätigung, dass die gemessenen Zellen aus der BAL die gewünschten regulatorischen T-Zellen sind, sind die wie in Kapitel 3.2.12 beschriebenen Kulturen angelegt worden.

Werden $CD4+CD25^-$ T-Lymphozyten nur mit allogenen, bestrahlten MNCs cokultiviert, werden im Mittel 35000 counts per minute (cpm) gezählt. Mit $CD4+CD25+$ T-Lymphozyten in der Kultur werden nur noch 11000 cpm registriert. Somit zeigt sich eine signifikante Abnahme der $[^3H]$ -Thymidin-

Inkorporation, sobald der Kultur $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten hinzugefügt werden (siehe Abb. 4.3). Damit wird eindeutig gezeigt, dass $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten die Proliferation von Effektor T-Zellen unterdrücken und diese BAL-Zellen wirklich regulatorische T-Zellen sind. Werden $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten alleine kultiviert, werden nur 5000 cpm gezählt. Diese Zellen zeigen keine oder nur eine geringe Proliferation.

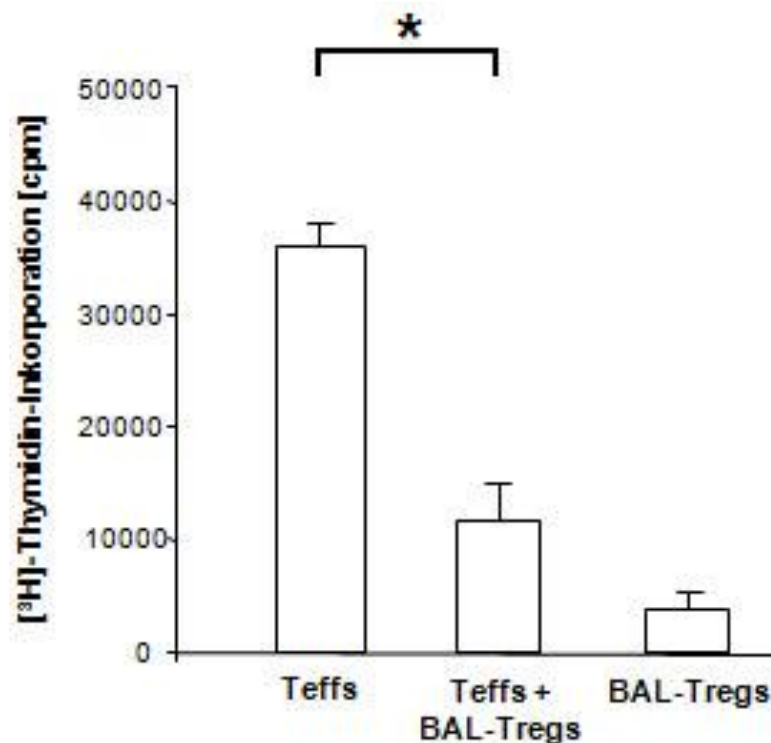


Abb. 4.3: Ergebnis der Proliferationsmessung mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation; Teff = $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, BAL-Treg = $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, * = signifikant ($p < 0,05$), ** = hochsignifikant ($p < 0,001$)

4.4 Zirkulierende $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten

Der Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen an den gesamten Lymphozyten im Blut beträgt bei Normalpersonen 0,5% (SD $\pm$ 0,3%), bei Sarkoidose-Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf 0,3% (SD $\pm$ 0,2%). Bei Erkrankten, bei denen die Sarkoidose zur Zeit der Messung nicht aktiv gewesen ist, sind 0,7% (SD $\pm$ 0,4%) der Lymphozyten $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten. Zwischen diesen Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der regulatorischen T-Zellen. Bei Patienten mit einer spontanen Remission der Sarkoidose liegt der Prozentsatz regulatorischer T-Zellen an

Lymphozyten im Blut bei 1,1% (SD $\pm$ 1,0%). Dies sind signifikant mehr Zellen als bei Normalpersonen ($p=0,0435$) und bei Patienten mit einer chronisch aktiven Erkrankung ($p=0,0472$) (siehe Abb. 4.4).

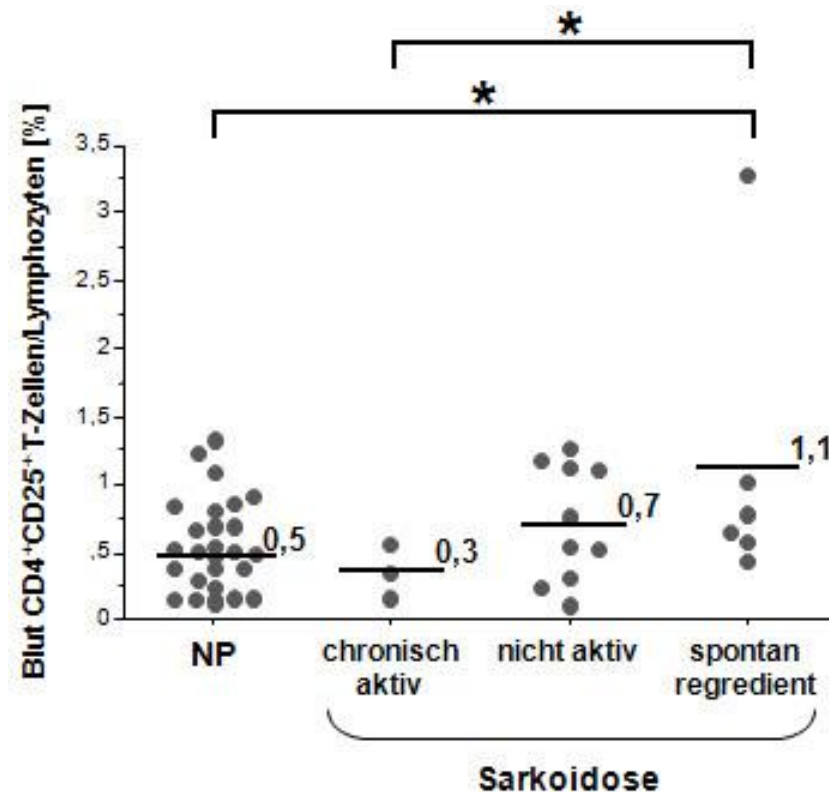


Abb. 4.4: Prozentsatz der CD4+CD25+ T-Zellen an Lymphozyten im Blut; NP = Normalpersonen, * = signifikant ($p<0,05$), ** = hochsignifikant ($p<0,001$)

Bei Normalpersonen sind 1,6% (SD $\pm$ 0,8%) der CD4⁺ T-Zellen auch CD25⁺, bei Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf sind dies 2,0% (SD $\pm$ 0,9%). Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,0046$). Bei Patienten mit einem aktuell nicht aktiven Verlauf sind 2,9% (SD $\pm$ 1,6%) der CD4⁺ T-Zellen regulatorische T-Zellen. Diese Patienten haben somit signifikant mehr Tregs im Blut als Patienten mit chronisch aktivem Verlauf ($p=0,0181$). Prozentual am meisten regulatorische T-Zellen besitzen mit 3,6% (SD $\pm$ 3,3%) die Patienten mit einer spontan regredienten Verlaufsform der Sarkoidose. Dies sind signifikant mehr Zellen als bei chronisch aktiven Sarkoidosen ($p=0,0052$) (siehe Abb. 4.5).

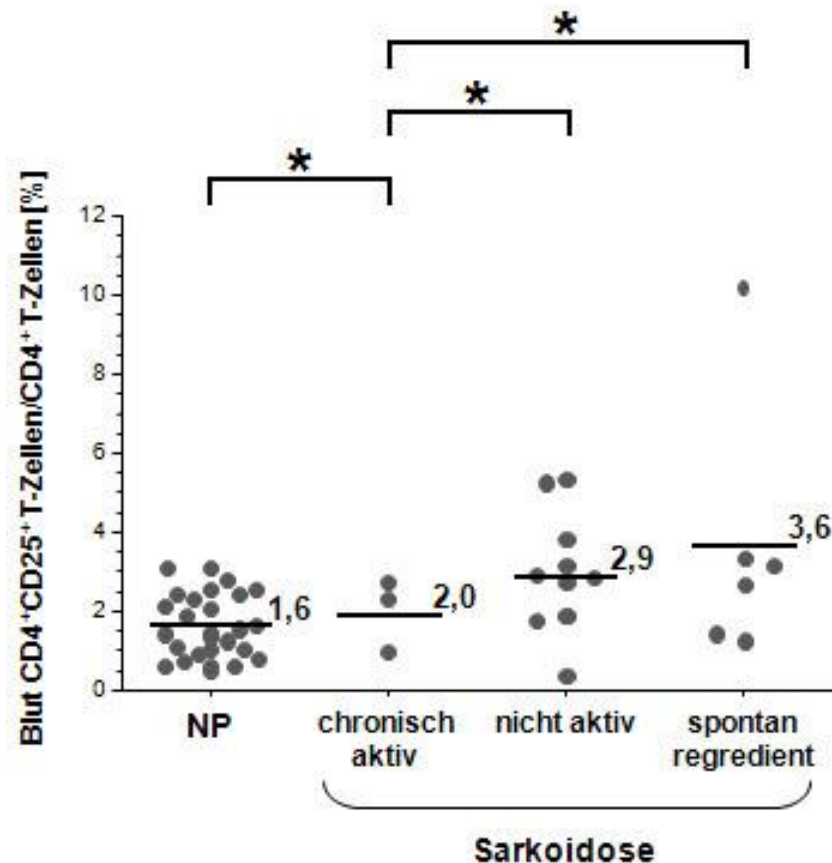


Abb. 4.5: Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen im Blut; NP = Normalpersonen, * = signifikant ($p < 0,05$), ** = hochsignifikant ($p < 0,001$)

4.5 Cokultivierung von CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten und CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten

Um zu zeigen, dass die gemessenen zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auch wirklich regulatorische T-Zellen sind, die die Aktivität und Proliferation von Effektor T-Zellen hemmen können, sind die im Kapitel 3.2.17 beschriebenen Kulturen angelegt worden. Die Ergebnisse der anschließenden Messungen zeigen Abb. 4.6 und Tabelle 4.2.

In den Wells, die nicht zuvor mit CD3- und CD8-Antikörpern beschichtet worden sind, zeigt sich nahezu keine Proliferation der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten. In den gecoateten Wells kommt es durch den Proliferationsreiz zu einer starken Vermehrung der Effektor T-Zellen. Der Großteil der Zellen hat sich dreimal geteilt (31,9% der gemessenen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen).

Fügt man den Kulturen unterschiedliche Mengen an $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten zu, reduziert sich die Proliferation der Effektor-T-Zellen entsprechend dem Verhältnis der zugegebenen regulatorischen T-Zellen. Werden beide Zellarten im gleichen Verhältnis kokultiviert, kommt es zur stärksten Reduktion der Proliferation. Je weniger regulatorische T-Zellen der Kultur hinzugefügt werden, desto eher können die Effektor-T-Zellen proliferieren und sich teilen.

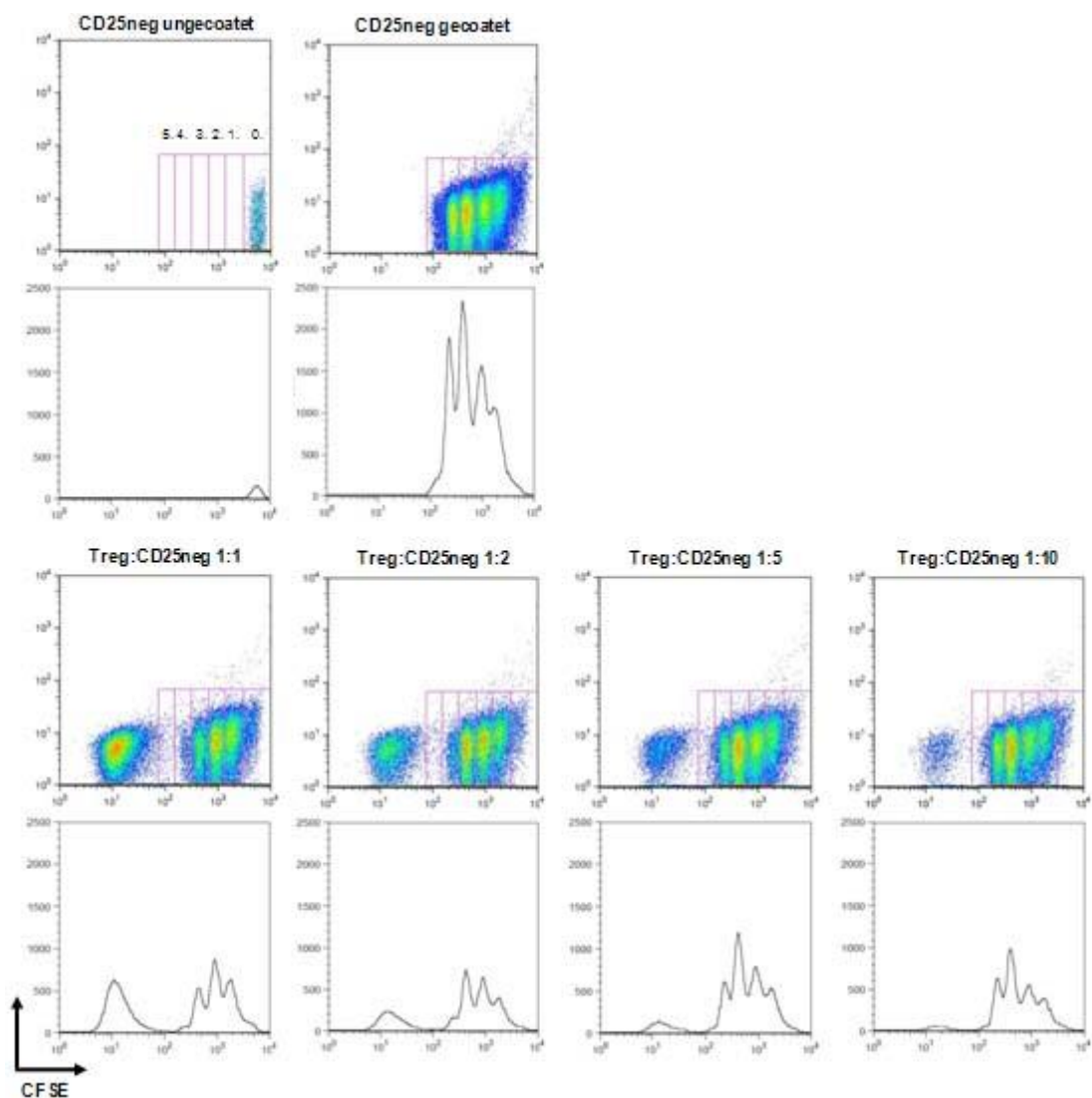


Abb. 4.6: Kokultivierung von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen; in der ersten Zeile Fluoreszenz-Dot-Plot, in der zweiten das dazugehörige Histogramm.

Tabelle 4.2: Übersicht über den Prozentsatz der x.Teilung an den insgesamt gemessenen CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten; der höchste Prozentsatz ist fettgedruckt, der zweithöchste grau hinterlegt

	0.Teilung	1.Teilung	2.Teilung	3.Teilung	4.Teilung	5.Teilung
CD25 ⁺ ungecoatet	99,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
CD25 ⁺ gecoatet	2,9	17,9	23,7	31,9	21,4	1,9
Treg + CD25 ⁺ Verhältnis 1:1	6,3	30,4	37,1	22,5	2,8	0,8
Treg + CD25 ⁺ Verhältnis 1:2	3,8	22,5	32,2	33,9	6,9	0,7
Treg + CD25 ⁺ Verhältnis 1:5	2,8	18,6	26,0	35,1	16,4	1,1
Treg + CD25 ⁺ Verhältnis 1:10	2,5	16,3	22,9	35,6	21,4	1,3

4.6 Korrelation zwischen CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der BAL und zirkulierenden CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten

Mittels der Rangkorrelation nach Spearman kann eine Beziehung zwischen den CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten aus der BAL und den zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten hergestellt werden.

Setzt man als Variablen den Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten an den Gesamt-Lymphozyten in der BAL und Prozentsatz der zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten ein, erhält man einen positiven Korrelationskoeffizient r_s ($r_s=0,465$). Der p-Wert beträgt 0,0385. Somit ist das Ergebnis signifikant.

Wiederholt man denselben Test mit dem Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten an den CD4⁺ T-Zellen, zeigt sich hingegen keine Korrelation mehr ($r_s=0,209$, $p=0,371$).

4.7 TNF- α in den Überständen von BAL-Flüssigkeit

Die Auswertung des ELISAs zeigt, dass im Überstand der BAL-Flüssigkeit von Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf am meisten TNF- α gemessen

werden kann. Die Konzentration beträgt hier im Durchschnitt 1391 pg/ml (SD $\pm$ 1541 pg/ml). Bei Patienten, deren Erkrankung spontan sistiert, wird durchschnittlich eine TNF- α Konzentration von 248 pg/ml (SD $\pm$ 314 pg/ml) gemessen. Somit wird bei einem chronisch aktiven Verlauf der Sarkoidose signifikant mehr TNF- α produziert als bei einem spontan regredienten Verlauf ($p=0,0339$). Bei Patienten, deren Sarkoidose zur Zeit der Messung nicht aktiv gewesen ist, kann eine TNF- α Konzentration von 489 pg/ml (SD $\pm$ 786 pg/ml) nachgewiesen werden. Hier zeigt sich weder ein signifikanter Unterschied zu den Patienten mit einem spontan regredienten Verlauf ($p=0,6699$) noch zu Patienten mit einem Fortschreiten der Erkrankung ($p=0,0885$).

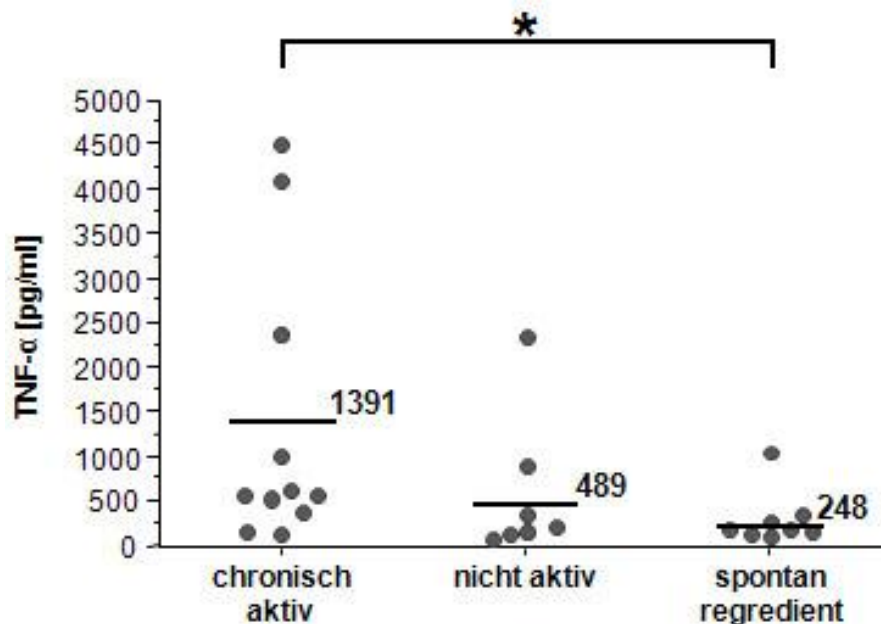


Abb. 4.7: Konzentration von TNF- α im Überstand der BAL-Flüssigkeit von Sarkoidose-Patienten; * = signifikant ($p < 0,05$), ** = hochsignifikant ($p < 0,001$)

4.8 Korrelation zwischen TNF- α und CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der BAL

Mittels der Rangkorrelation nach Spearman kann eine Beziehung zwischen dem aus dem Überstand der BAL gemessenen TNF- α und den CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten aus der BAL hergestellt werden.

Setzt man als Variablen den Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten an den Gesamt-Lymphozyten und das gemessene TNF- α ein, erhält man einen

negativen Korrelationskoeffizient r_s ($r_s = -0,398$). Der p-Wert beträgt 0,0325. Somit ist das Ergebnis signifikant.

Wiederholt man denselben Test mit dem Prozentsatz der $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten an den $CD4^+$ T-Zellen, fällt die Beziehung noch deutlicher aus. Der Korrelationskoeffizient r_s beträgt $r_s = -0,540$ bei einem p-Wert von $p=0,00261$.

Stellt man den Prozentsatz der $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten an den $CD4^+$ T-Zellen und die TNF- α Konzentration in einem Streudiagramm dar und trägt eine Regressionsgerade ein, wird das Ergebnis der Rangkorrelation nach Spearman bestätigt (siehe Abb. 4.8)

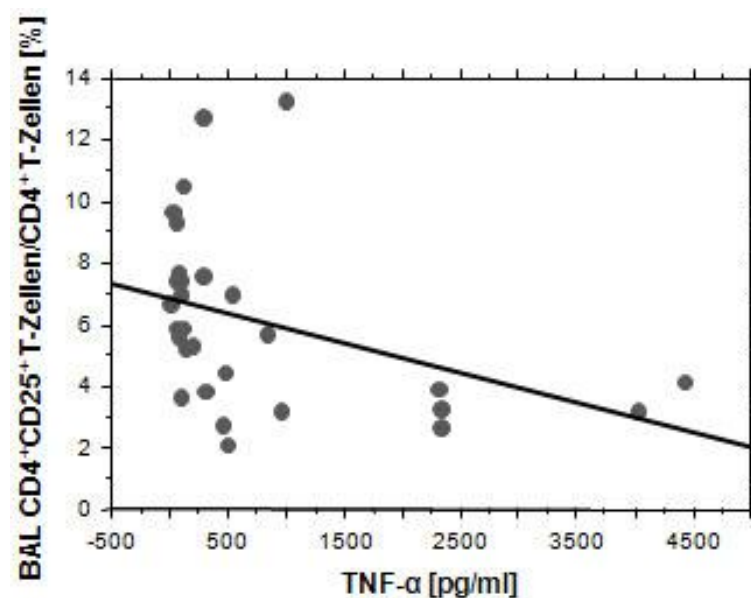


Abb. 4.8: Streudiagramm mit eingetragener Regressionsgerade; $r=0,395$.

Man erhält einen Regressionskoeffizienten von $r=0,395$ bei einem p-Wert von $p=0,0341$.

Somit ist die Konzentration des TNF- α in der BAL umso höher, je niedriger der Prozentsatz der $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten in der BAL ist und umgekehrt.

Eine Aussage über eventuelle kausale Zusammenhänge kann anhand dieses Testes nicht getroffen werden.

4.9 CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten

4.9.1 Verschiedene Protokolle

Die Bestimmung des Prozentsatzes der CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen in der BAL sowie im Blut gestaltet sich schwierig. Es hat mehrere Versuche gebraucht, um das bestmögliche Protokoll herauszufinden. Fügt man den Zellen 1 µl oder 1,5 µl Stammlösung Anti-human-Foxp3 bei, lässt sich eine Treg-Population nicht eindeutig abgrenzen (siehe Abb. 4.9). Das intrazelluläre Foxp3 wird nicht suffizient angefärbt. Verwendet man für 1 Million Zellen 3 µl Stammlösung Anti-human-Foxp3, lässt sich vergleichbar den Messungen nach Anfärben des CD25-Moleküls eine Population abgrenzen (siehe Abb. 4.9). Gleichermaßen suffizient angefärbt wird das Foxp3-Molekül bei dem Protokoll mit dem Anti-human Foxp3 Staining Set (siehe Abb. 4.9).

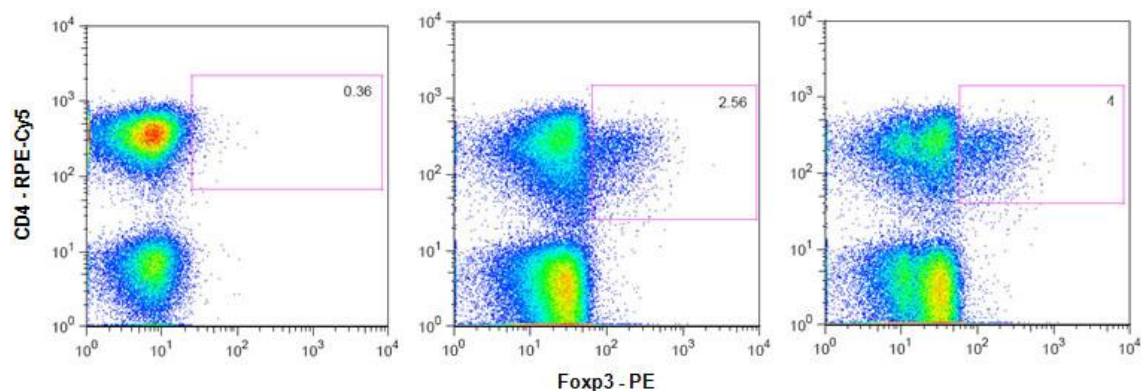


Abb. 4.9: Übersicht über die verschiedenen Anfärbeprotokolle; 1 µl Stammlösung Anti-human-Foxp3 (links), 3 µl (Mitte), Anti-human Foxp3 Staining Set (rechts).

Für die Auswertung werden ausschließlich die Ergebnisse der Messungen mit 3 µl Stammlösung Anti-human-Foxp3 auf 1 Million Zellen.

4.9.2 Übersicht über die verschiedenen Probandengruppen bei der BAL-Messung

Tabelle 4.3 liefert eine Übersicht über die gemessenen Personengruppen bei der BAL-Messung. Es wird die Anzahl der Probanden, das Durchschnittsalter, die Geschlechtsverteilung, die Zellzahlen in der BAL sowie die Lungenfunktion in der jeweiligen Gruppe aufgeführt.

Tabelle 4.3: Übersicht über die verschiedenen Probandengruppen bei der BAL; FVC = forcierte Vitalkapazität, TLC = totale Lungenkapazität, CO Diff = CO-Diffusionskoeffizient, FEV1 = 1-Sekundenkapazität

	Sarkoidose			
	gesamt (n=12)	chronisch aktiv (n=4)	nicht aktiv (n=5)	spontan regredient (n=3)
Alter	45,7 ± 14,9	45,5 ± 15,3	50,0 ± 19,3	38,7 ± 1,2
Geschlecht w/m	7/5	2/2	3/2	2/1
BAL Zellzahl/100ml	14,0 ± 9,4	18,1 ± 7,3	7,0 ± 2,7	20,3 ± 13,0
Alveolarmakrophagen [%]	54,5 ± 25,9	41,0 ± 20,8	68,8 ± 17,5	48,7 ± 38,7
Lymphozyten [%]	39,2 ± 24,1	45,0 ± 23,1	28,8 ± 15,9	48,7 ± 37,7
Neutrophile Granulozyten [%]	4,8 ± 12,1	12,5 ± 20,3	1,1 ± 1,1	0,7 ± 1,2
Eosinophile Granulozyten [%]	1,0 ± 1,1	1,0 ± 0,8	0,7 ± 0,4	1,3 ± 2,3
CD4/CD8	4,6 ± 3,8	1,7 ± 1,3	7,2 ± 4,5	4,2 ± 0,9
FVC [%]				
TLC [%]	83,4 ± 6,8	75,5 ± 5,0	86,5 ± 6,2	84,7 ± 5,5
CO Diff [%]	96,4 ± 20,4	81,0 ± 41,0	105,5 ± 13,3	94,7 ± 12,5
FEV1 [%]	83,6 ± 13,8	70,5 ± 0,7	85,0 ± 15,5	90,3 ± 12,5

4.9.3 CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL

Bei den Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf sind 0,5% (SD $\pm$ 0,2%) der Lymphozyten in der BAL auch Foxp3⁺. Patienten, deren Erkrankung zum Zeitpunkt der Messung nicht aktiv gewesen ist, liegt der Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten an den Gesamt-Lymphozyten in der BAL bei 2,0% (SD $\pm$ 0,6%). Dies sind signifikant mehr regulatorische T-Zellen als bei chronisch aktiven Verläufen der Sarkoidose (p=0,0068). Die Patienten, bei denen sich die Sarkoidose spontan zurückgebildet hat, haben einen Prozentsatz CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL von 3,3% (SD $\pm$ 1,0%). Dies sind signifikant mehr regulatorische T-Zellen als bei Patienten, deren Erkrankung momentan nicht aktiv ist (p=0,0220) und hochsignifikant mehr als bei chronisch aktiven Sarkoidosen (p=0,0003) (siehe Abb. 4.10).

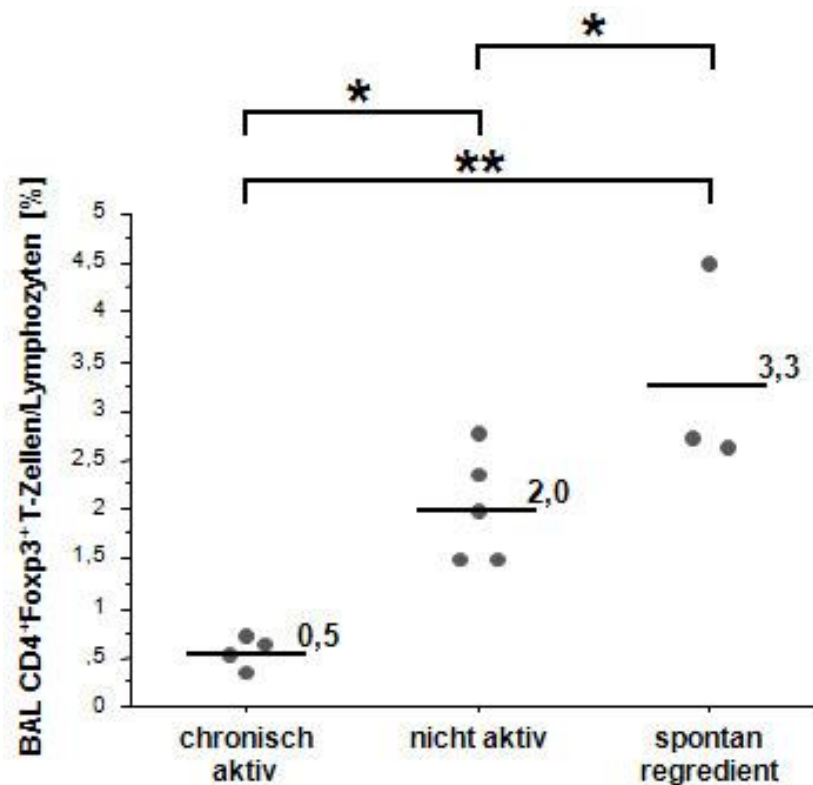


Abb. 4.10: Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen an Lymphozyten in der BAL; * = signifikant (p<0,05), ** = hochsignifikant (p<0,001)

Misst man den Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten an CD4⁺ T-Zellen in der BAL so kommt man auf dasselbe Ergebnis. Die wenigsten CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL lassen sich bei Patienten mit chronisch aktivem Verlauf ihrer Sarkoidose messen. Hier beträgt der Prozentsatz CD4⁺Foxp3⁺ T-

Lymphozyten an den CD4⁺ T-Zellen 1,6% (SD $\pm$ 0,3%). Die sind signifikant weniger regulatorische T-Zellen als bei spontan regredienten Verläufen ($p=0,0015$). Hier sind 6,2% (SD $\pm$ 2,3%) der CD4⁺ T-Zellen auch Foxp3⁺. Der Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten bei Patienten, bei denen sich keine Symptome zur Zeit der Messung geäußert haben, beträgt 3,4% (SD $\pm$ 1,2%). Somit sind das signifikant weniger regulatorische T-Zellen als bei spontan regredienten Verläufen ($p=0,0183$) (siehe Abb. 4.11).

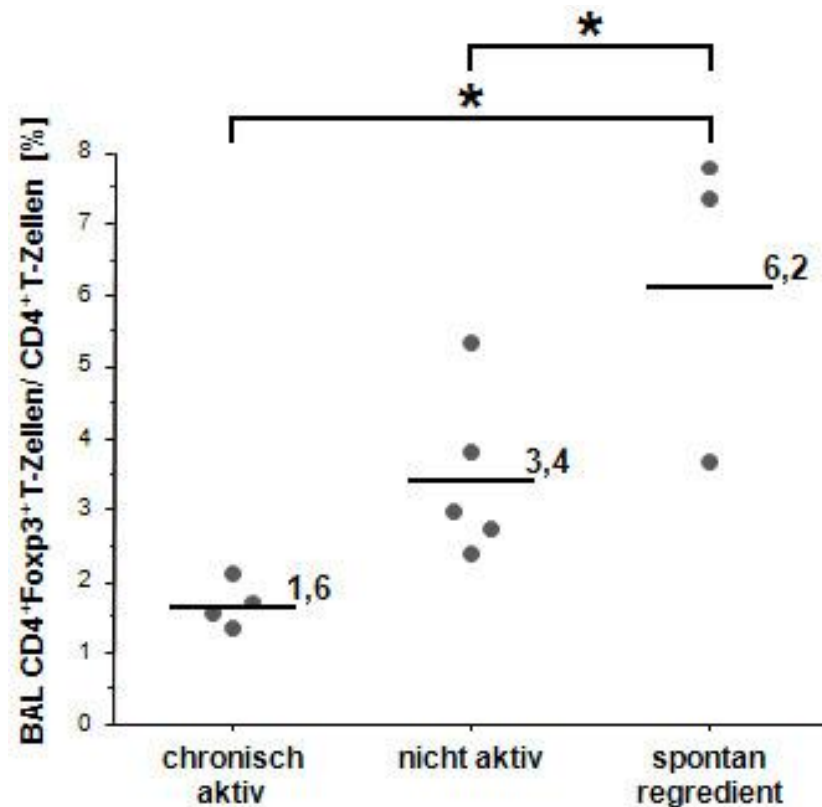


Abb. 4.11: Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen in der BAL; * = signifikant ($p<0,05$), ** = hochsignifikant ($p<0,001$)

4.10 Vergleich der CD25- und der Foxp3-Messungen im FACS

Bei den Messungen der CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL zeigt sich dasselbe Verteilungsmuster als bei den Messungen der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten. Bei chronisch aktiven Verläufen können am wenigsten regulatorische T-Zellen gemessen werden, bei den spontan regredienten Verläufen am meisten. Bei den zur Zeit der Messung nicht aktiven Verläufen liegen die Messwerte zwischen denen der beiden zuvor genannten Verlaufsformen.

Vergleicht man die Ergebnisse der zwei Messungen miteinander, entsteht der Eindruck, dass weniger Foxp3⁺ T-Zellen in der BAL gemessen werden können als CD25⁺ T-Zellen. Vergleicht man jedoch die einzelnen Messungen miteinander, zeigt sich, dass der Prozentsatz der CD4⁺Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL dem der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten weitgehend entspricht (siehe Abb. 4.12).

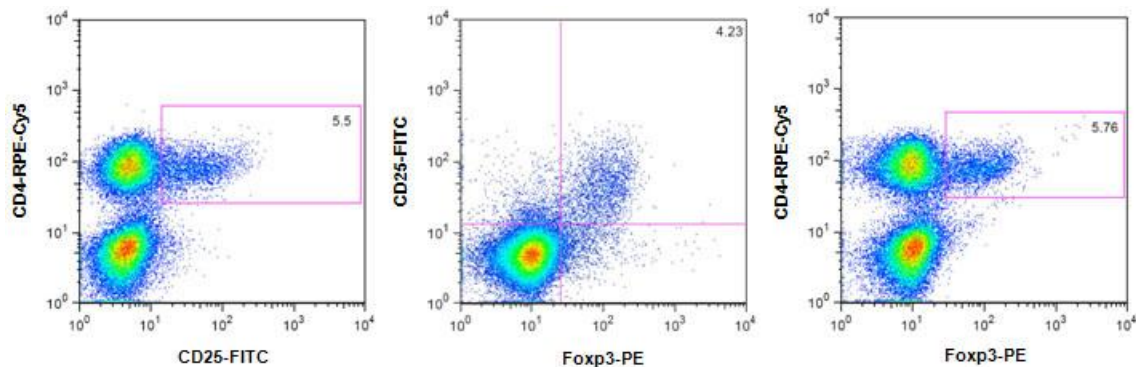


Abb. 4.12: Vergleich der CD25- und der Foxp3-Messungen im FACS

Das bedeutet, dass die gemessenen CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten auch Foxp3 exprimieren.

5 Diskussion

Die Sarkoidose gilt als das Ergebnis einer überschießenden T_H1-Immunreaktion eines genetisch prädisponierten Individuums auf ubiquitär vorkommende Antigene [siehe Kapitel 1.1.1 und 1.1.2]. Die T_H1-Immunreaktion wird durch einen „Sarkoid“ Stimulus induziert und ist der Anfang einer komplexen Serie von Lymphozyten-Makrophagen-Interaktionen, die in der Produktion einer Vielzahl von Zytokinen mündet [siehe Kapitel 1.1.2]. Daraus resultieren eine vornehmlich aus T_H1-Lymphozyten bestehende Alveolitis und eine Anhäufung von Alveolarmakrophagen, die als Vorstufe der typischen nicht-verkäsenden Epitheloidzell-haltigen Granulome vermutet wird.

Es ist noch wenig bekannt, warum bei einigen Patienten sich die Erkrankung wieder zurückbildet und bei anderen es zu einem Fortschreiten und somit zur kontinuierlichen Zerstörung des betroffenen Organs kommt.

Regulatorische T-Zellen sind ein Mechanismus des Immunsystems Immunreaktionen nach Eliminieren des Antigens wieder herunterzuregulieren [siehe Kapitel 1.2.3].

Miyara *et al.* [83] haben gezeigt, dass der Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen im Blut bei Patienten mit einer aktiven Sarkoidose signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten mit inaktiver Sarkoidose und Kontrollpersonen. Zudem sind in der BAL von Patienten mit aktiver Sarkoidose signifikant mehr regulatorische T-Zellen gemessen worden als bei Patienten mit anderen Lungenerkrankungen. Patienten mit einem chronischen Verlauf der Sarkoidose sowie Normalpersonen sind jedoch nicht in dieser Studie untersucht worden. Diese Lücke wird durch die vorliegende Dissertation geschlossen.

5.1 Mangel an Tregs bei chronisch aktiven Verläufen und Anstieg bei spontan regredienten Verläufen der Sarkoidose

Bei den Messungen im Rahmen dieser Dissertation ist gezeigt worden, dass Patienten mit einer chronisch aktiven Sarkoidose prozentual am wenigsten regulatorische T-Zellen sowohl in der BAL als auch im Blut im Vergleich zu den

anderen Patientengruppen haben. Bei Patienten mit einer Spontanremission der Sarkoidose wird sowohl in der BAL als auch im Blut der höchste Prozentsatz an regulatorischen T-Zellen gemessen. Der Prozentsatz der Tregs ist damit bei dieser Patientengruppe signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit fortschreitender oder nicht aktiver Erkrankung. Im Vergleich zu den Normalpersonen sind die Treg-Zahlen bei Sarkoidosepatienten mit einer Spontanremission zwar etwas höher, der Unterschied erreicht jedoch nicht eine statistische Signifikanz.

Diese Ergebnisse passen gut zu den bereits publizierten Daten von Miyara *et al.* [83], die einen Prozentsatz zirkulierender Tregs an CD4⁺ T-Lymphozyten von 5,1% bei Patienten mit aktiver Sarkoidose (hier: 3,6%), von 1,2% bei Patienten mit inaktiver Erkrankung (hier: 2,9%) sowie 1,3% bei Normalpersonen (hier: 1,6%) gemessen haben. In der BAL ist ein Anteil der Tregs an CD4⁺ T-Lymphozyten von 7,0% (hier: 7,9%) gemessen worden. Idali *et al.* [56] beschreiben dagegen in ihrer Studie eine Reduktion Foxp3⁺ T-Lymphozyten in der BAL bei Patienten mit aktiver Sarkoidose im Vergleich zu Kontrollpersonen. Vergleichbare Treg-Zahlen sind im Rahmen dieser Dissertation bei Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf der Sarkoidose gemessen worden. Da die Studien von Miyara *et al.* und Idali *et al.* sich jedoch in der Patientenauswahl und in Bezug auf die Definition von Aktivität der Sarkoidose unterscheiden, ist ein direkter Vergleich schwierig. Bei Idali *et al.* werden die unterschiedlichen Messwerte auch damit begründet, dass bei dem Gebrauch des CD25-Moleküls als Treg-Marker aktivierte Teffs zu den regulatorischen T-Zellen gerechnet werden und dies zu falsch hohen Messwerten führt. In Kapitel 4.10 wird jedoch gezeigt, dass die hier gemessenen CD25⁺ T-Lymphozyten auch Foxp3⁺ exprimieren und somit der Anteil CD25⁺ Effektor T-Zellen als eher gering einzustufen ist. Nach der Erfahrung unserer Arbeitsgruppe werden zudem die Tregs mit dem FITC-konjugierten Anti-CD25 Antikörper, der bei den Messungen zu dieser Dissertation verwendet worden ist, verlässlicher angefärbt als mit dem oft gebräuchlichen APC (Allophycocyanin)-konjugierten Antikörper. Miyara *et al.* [83] benutzen in ihrer Studie den zweitgenannten Antikörper. Der Gebrauch von unterschiedlich konjugierten Antikörpern und verschiedenen Klonen erschwert

einen direkten Vergleich der Messergebnisse also zusätzlich. Denn die FACS-Antikörper markieren je nach Klon und konjugiertem Fluorochrom das Zielprotein unterschiedlich stark. Liu *et al.* [72] und Sedddiki *et al.* [116] haben gezeigt, dass anhand der Expression von CD127 eine Unterscheidung zwischen CD4⁺CD25⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁺ Teffs möglich ist. Deshalb sind in dieser Arbeit bei der FACS-Auswertung zur Bestimmung der Treg-Zahlen in der BAL als zusätzliche Maßnahme die CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T-Zellen von den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen abgezogen, sodass die hier vorgestellten Daten um die über den TCR kürzlich aktivierten CD4⁺ T-Zellen bereinigt worden sind (siehe Kapitel 3.2.10). Es ist davon auszugehen, dass durch diese Strategie die gemessene Anzahl an CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-Lymphozyten tatsächlich auch der Anzahl regulatorischer T-Zellen entspricht. Dies wird durch die Ergebnisse in Kapitel 4.3 und 4.5 untermauert. Denn anhand der Cokultivierung von Tregs mit Teffs ist gezeigt worden, dass die gemessenen CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten sowohl aus der BAL als auch aus dem Blut tatsächlich die Proliferation der Effektor T-Zellen dosisabhängig supprimieren.

In den letzten Jahren sind mehrere Studien zur Messung der BAL-Tregs auch bei anderen Lungenerkrankungen publiziert worden [10,118,119]. In einer Studie von Smyth *et al.* [119] zur COPD (chronic obstructive pulmonary disease) sind sowohl bei Rauchern mit einer gut erhaltenen Lungenfunktion als auch bei COPD-Patienten im Vergleich zu Nicht-Rauchern erhöhte Treg-Zahlen in der BAL gemessen worden (28,8% und 23,1% vs. 0%, $p < 0,001$ und $p < 0,01$). In einer Studie von Barceló *et al.* [10] sind nur bei Rauchern mit noch guter Lungenfunktion, d.h. ohne COPD erhöhte Treg-Zahlen gefunden worden (16,2% vs. 8,7% bei COPD-Patienten und 6,3% bei Nicht-Rauchern, jeweils $p < 0,01$). Auch bei der Tuberkulose, insbesondere der Miliartuberkulose, sind erhöhte Treg-Zahlen in der BAL gemessen worden [118] und es wird postuliert, dass Tregs durch Mykobakterien vermehrt generiert werden und hierüber ihre Eradikation aktiv verhindern.

Die in den oben zitierten Studien sowie im Rahmen dieser Dissertation gemessenen CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺FoxP3⁺ Tregs stellen jedoch vermutlich keine einheitliche Zellpopulation dar [3,26,146]. Die Mechanismen, die zur

Generierung von Tregs im menschlichen Körper führen, sind generell nur unzureichend verstanden. Man geht davon aus, dass ein Teil der Tregs im Thymus durch die Interaktion der TCRs mit Selbstantigenen entsteht (sogenannte naturally occurring Treg cells, nTregs) [50,51,129,133,151]. Die nTregs benötigen für ihre Entwicklung zudem ein weiteres Signal (Kostimulation), zum Beispiel über CD28 [61]. Ein anderer Teil wird wahrscheinlich in sekundären Lymphorganen (MALT, mucosa associated lymphoid tissue) in der Gegenwart von antiinflammatorischen Zytokinen aus Effektor T-Zellen generiert (sogenannte induced Treg cells, iTregs) [5,64,65,92]. Anders als nTregs sind iTregs imstande sich ohne Kostimulator-Signal zu entwickeln [6,65]. Eine Unterscheidung von nTregs und iTregs anhand bestimmter Marker gestaltet sich jedoch schwierig. Denn beide Typen exprimieren dieselben Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel CD25, CTLA-4, GITR, CD62L und CD45RB^{low}(Maus) bzw. CD45RO⁺(Mensch) [153]. Ferner sind weitere T-Zellen entdeckt worden, die immunregulatorische Fähigkeiten besitzen: Typ 1 regulatorische T-Zellen (T_R1), die durch IL-10 induziert werden [46,136] und T-Helfer-Zellen 3 (T_H3), die zur Entwicklung TGF- β benötigen [139]. T_R1 und T_H3 sind über die Zytokine, die sie sezernieren (IL-10 bei T_R1 und TGF- β bei T_H3), definiert, denn bis dato sind noch keine zelltypischen (Oberflächen)Marker gefunden worden.

Ein weiteres Problem ist, dass viele Daten bezüglich regulatorischer T-Zellen aus dem Maus-Modell stammen und unklar ist, wie gut sich diese Daten auf den Menschen übertragen lassen, zumal Unterschiede zwischen Tregs von Mäusen und Menschen beschrieben worden sind. So können zum Beispiel CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen vom Menschen nach ihrer Aktivierung vorübergehend die Expression von Foxp3 hochregulieren [4,41,138], wohingegen Tregs von Mäusen dazu nicht in der Lage sind [148].

5.2 Tregs proliferieren in der Lunge von Sarkoidosepatienten

Wie die Ergebnisse dieser Dissertation vermuten lassen, hat die Zahl der regulatorischen T-Zellen im betroffenen Organ und im Blut Einfluss auf den Ausgang der Erkrankung. In dieser Arbeit sind in der BAL erhöhte Werte an

Tregs bei Patienten mit spontaner Remission der Sarkoidose im Vergleich zu den anderen Patientengruppen gemessen worden. Im Vergleich zu den Normalpersonen können bei diesen Sarkoidose-Patienten zwar tendenziell mehr Tregs gemessen werden. Der Unterschied zu der Kontrollgruppe ist jedoch nicht signifikant. Anhaltspunkte für eine Erklärung, wie die erhöhten Treg-Zahlen bei Sarkoidose-Patienten, deren Erkrankung spontan ausheilt, zustande kommen, liefert eine Studie von Taflin *et al.* [125]. Sie hat gezeigt, dass sich regulatorische T-Zellen in Granulomen von betroffenen Organen vermehren. In Lymphknoten von Sarkoidose-Patienten exprimieren Tregs signifikant mehr Ki-67, einen Proliferationsmarker, als in Lymphknoten von Normalpersonen. Unterstützt wird diese Beobachtung von einer weiteren immunhistologischen Studie [83]. Diese zeigt, dass in befallenen Lymphknoten von Sarkoidose-Patienten signifikant mehr regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden können als in Lymphknoten von Kontrollpersonen. Zudem ist herausgefunden worden, dass diese Tregs in der Peripherie der Granulome akkumulieren. Taflin *et al.* [125] beschreiben dagegen eine Akkumulation der Tregs im Innern der Granulome. Ma *et al.* [75] und Yale Rosen [105] sprechen ebenfalls von einer Anhäufung CD4⁺ T-Lymphozyten im Zentrum von Sarkoid-Granulomen. Um die genaue Lokalisation regulatorischer T-Zellen in Granulomen von betroffenen Organen zu klären, bedarf es aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse noch weiterer Studien. Unbestritten dürfte jedoch sein, dass sich Tregs in Granulomen von betroffenen Organen vermehren. Stimmig dazu sind erhöhte Werte für IL-2, welches ein wichtiger Faktor für die Proliferation und Aktivierung der regulatorischen T-Zellen darstellt, in der Lunge von Sarkoidosepatienten mit hoch aktiver Alveolitis nachgewiesen worden [98]. Doch scheint dies nicht der einzige Lösungsansatz, der die erhöhten Messwerte an regulatorischen T-Zellen in der BAL erklären könnte, zu sein. Ein weiterer ist deren Rekrutierung an den Ort der Entzündungsreaktion mittels Chemokinen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass BAL-Tregs in hoher Zahl CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3) exprimieren, zirkulierende Tregs desselben Patienten hingegen nur in geringem Ausmaß [83]. CXCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der

unter anderem auch auf T_H1-Lymphozyten exprimiert wird. Diese Zellen finden sich ebenfalls vermehrt in der BAL und Lunge von Sarkoidosepatienten [2,60]. CXCR3 bindet unter anderem CXCL9 (CXC-Ligand 9, auch MIG für Monokine induced by Gamma-Interferon) und CXCL 10 (auch interferon-gamma-induced protein, IP-10). Beide Chemokine werden von aktivierten Makrophagen produziert und sind bei der aktiven Sarkoidose erhöht [82,127]. Eine andere Studie zeigt, dass auch CCL4 (C-C Motiv-Ligand 4) via CCR5 (C-C Motiv Rezeptor 5) auf den Tregs eine Rolle bei der Migration der regulatorischen T-Zellen an den Ort der Entzündung spielen könnte [19]. Auch CCR5 wird bei der Sarkoidose vermehrt exprimiert [59,96]. Der hohe Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen in der BAL lässt sich demnach zum einen durch die Proliferation von Tregs vor Ort und zum andern durch die Rekrutierung derselben Zellen aus dem Blut via einer vermehrten Chemokinproduktion erklären.

Wie die Erhöhung der im Rahmen dieser Dissertation gemessenen zirkulierenden Tregs im Vergleich zu den anderen Patientengruppen und den Normalpersonen zustande kommt, ist noch unklar. Sowohl Miyara *et al.* [83] als auch Taflin *et al.* [125] diskutieren in ihren Arbeiten eine Rückverteilung der proliferierten Tregs aus dem betroffenen Organ in das Blut. In dieser Arbeit zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten an den Gesamt-Lymphozyten in der BAL und dem Prozentsatz der zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten. Somit steigen die zirkulierenden Tregs gemeinsam mit den Tregs aus der BAL an. Dies kann aber nur als Hinweis gewertet werden. Zumal man keine Korrelation mehr erhält, betrachtet man den Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten an CD4⁺ T-Zellen. Diese Unstimmigkeit könnte jedoch damit zusammenhängen, dass während der Sarkoidose eine Umverteilung speziell der CD4⁺ T-Lymphozyten aus dem Blut in die Lunge stattfindet (erhöhter CD4/CD8-Quotient). Durch die Reduktion der CD4⁺ T-Lymphozyten und dem gleichzeitigen Anstieg der regulatorischen T-Zellen im Blut verändert sich das Verhältnis dieser beiden Zellarten zueinander. Die Folge sind veränderte Durchschnittswerte und damit wohl eine Aufhebung der Korrelation.

Im Rahmen dieser Arbeit sind bei den Patienten mit einer spontanen Remission der Sarkoidose die Tregs in der BAL und im Blut während der akuten Erkrankungsphase gemessen worden. Eine nochmalige Messung nach Ausheilung der Sarkoidose ist nicht erfolgt. Jedoch haben Patienten mit nicht aktiver Sarkoidose signifikant niedrigere Treg-Messwerte in der BAL und im Blut als die Patienten mit spontan regredienten Sarkoidose während der akuten Erkrankungsphase. Offensichtlich kommt es nach der Remission der Erkrankung zu einer Reduktion der Treg-Zahlen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen von Miyara *et al.* [83] gestützt. Sie haben gezeigt, dass sich die in der akuten Erkrankungsphase erhöhten Treg-Zahlen nach der Remission der Sarkoidose normalisiert haben. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass regulatorische T-Zellen die IL-2 Produktion der aktivierten Effektor T-Zellen inhibieren. Kultiviert man $CD4^+CD25^-$ T-Lymphozyten mit regulatorischen T-Zellen, sieht man eine Reduktion der Transkription des IL-2-Gens [126], der IL-2 mRNA [90,130] und schließlich des IL-2 selbst in den Überständen der Kulturen [83,130]. Durch den Mangel an IL-2 fehlt den Tregs dieser wichtige Überlebensfaktor. Denn regulatorische T-Zellen sind hochdifferenzierte Zellen und deshalb anfällig für Apoptose [3,40,124]. IL-2 verhindert diesen programmierten Zelltod bei Tregs [124]. Durch das fehlende IL-2 gehen die regulatorischen T-Zellen in die Apoptose, was eine Reduktion der Tregs zur Folge haben könnte.

5.3 Die spontane, pulmonale TNF- α Produktion korreliert invers mit der Anzahl an BAL-Tregs

Die BAL-Zellen von Patienten mit chronisch aktiver Sarkoidose haben spontan am meisten TNF- α produziert. Bei Patienten mit einer Spontanremission der Sarkoidose lassen sich im Vergleich zu chronisch aktiven Verläufen eine signifikant niedrigere TNF- α Produktion nachweisen. Patienten, deren Erkrankung zur Zeit der Messung nicht aktiv gewesen ist, zeigen keinen signifikanten Unterschied zu chronisch progredienten oder spontan regredienten Verläufen und weisen auch keine nennenswerte TNF- α Produktion auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation bestätigen die früheren Beobachtungen von Ziegenhagen *et al.* [157], dass TNF- α in den Überständen kultivierter BAL-Zellen von Patienten mit fortschreitender Sarkoidose im Vergleich zu nicht aktiven Verläufen und Kontrollpersonen erhöht ist. Zwischen Patienten mit nicht aktiver Sarkoidose und Normalpersonen wird ebenfalls ein signifikanter Unterschied beobachtet. In einer weiteren Studie haben kultivierte Alveolarmakrophagen von Patienten mit chronisch aktiver und Kortikosteroid-resistenter Sarkoidose am meisten TNF- α produziert [155].

Die Mechanismen, die der verstärkten TNF- α Produktion bei der chronisch aktiven Sarkoidose zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Fehrenbach *et al.* [36] haben gezeigt, dass Alveolarmakrophagen die Hauptproduzenten von TNF- α in der Lunge von Sarkoidosepatienten sind. Die enge Interaktion von T-Lymphozyten und Makrophagen bestimmt die TNF- α Produktion (siehe Kapitel 1.1.2). Tregs können in diese Interaktion eingreifen, indem sie durch verschiedene Mechanismen die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, Dendritische Zellen) unterdrücken und so indirekt die Aktivierung von Effektor T-Zellen blockieren. So werden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), wichtige Oberflächenproteine der APCs, welche Kostimulatorsignale vermitteln, durch CTLA-4 auf der Oberfläche der Tregs herunter reguliert oder es wird deren Hochregulierung verhindert [93,142]. Über CD223 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3) auf Tregs, welches an MHC II-Molekülen von unreifen APCs bindet, kommt es zu einer verminderten Antigen-Präsentation durch die APCs [7171]. Durch CD39 auf den Tregs wird extrazelluläres ATP, welches ein Indikator für Zell- und Gewebeerstörung darstellt, abgebaut. Diese katalytische Inaktivierung des extrazellulären ATPs ist ein weiterer antiinflammatorischer Mechanismus, der möglicherweise von Tregs gebraucht wird [28]. Indem regulatorische T-Zellen zum einen Kostimulatorsignale senken, zum andern die Antigen-Präsentation von APCs vermindern, stören sie die Interaktion von Makrophagen und T-Lymphozyten und somit auch die TNF- α Produktion.

Miyara *et al.* haben gezeigt, dass zirkulierende regulatorische T-Zellen von Sarkoidosepatienten die TNF- α Produktion von Effektor T-Zellen nur insuffizient

unterdrücken [83]. Im Gegensatz zu den Tregs von Normalpersonen können Tregs von Patienten mit einer aktiven Sarkoidose die TNF- α und die IFN- γ Produktion nicht signifikant inhibieren. Ehrenstein *et al.* haben vergleichbare Resultate für die Tregs bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) gezeigt [34]. Tregs, die von Patienten mit aktiver RA isoliert worden sind, sind nicht in der Lage gewesen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (darunter auch TNF- α) durch aktivierte Teffs und Monozyten zu unterdrücken. Interessanterweise haben isolierte regulatorischen T-Zellen von RA-Patienten, die drei Monate mit Infliximab behandelt worden sind, diese Fähigkeit wieder zurückerlangt. In diesem Zusammenhang von Bedeutung ist die Beobachtung von Valencia *et al.* [134], dass TNF via Tumornekrosefaktor Rezeptor II (TNFRII) die Expression von Foxp3 mRNA und Foxp3 Protein herunter reguliert und so die Fähigkeit der Tregs zur Suppression negativ beeinflusst. Folglich könnte TNF- α selbst die Kapazität der Tregs die TNF- α Produktion zu unterdrücken erniedrigen und so die eigene Produktion positiv verstärken.

Passend zu den Ergebnissen von Valencia *et al.* kann im Rahmen dieser Dissertation eine negative Korrelation zwischen dem aus dem Überstand der BAL gemessenen TNF- α und den CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten aus der BAL hergestellt werden. Somit ist die Konzentration des TNF- α in der BAL umso höher, je niedriger der Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten in der BAL ist und umgekehrt. Dieses Ergebnis wird durch mehrere Studien untermauert, bei denen eine Therapie einer Rheumatoiden Arthritis und eines Morbus Crohn mit Infliximab zu einer Beeinflussung der Treg-Zahl und deren Fähigkeit zur Suppression geführt hat. Ehrenstein *et al.* [34] haben gezeigt, dass die Behandlung einer aktiven Rheumatoiden Arthritis mit Infliximab einen signifikanten Anstieg der regulatorischen T-Zellen im Blut der Patienten zur Folge hat. Tregs, die von Patienten mit aktiver Erkrankung vor der Therapie mit Infliximab isoliert worden sind, sind nicht in der Lage die TNF- α und IFN- γ Freisetzung durch autologe Effektor T-Zellen zu inhibieren. Diese Fähigkeit haben die regulatorischen T-Zellen drei Monate nach der Behandlung zurückgewonnen. Die Studie von Nadkarni *et al.* [85] zeigt ebenfalls einen Anstieg der zirkulierenden Tregs bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis vier

bis sechs Monate nach einer Anti- TNF- α Therapie und bestätigt die Ergebnisse von Ehrenstein *et al.* Ein Anstieg der Mucosa-ständigen Tregs bei Patienten mit Morbus Crohn nach Infliximab-Therapie ist das Ergebnis einer Studie von Ricciardelli *et al.* [104].

Vergleichbare Studien für die Sarkoidose gibt es nicht. Jedoch gibt es mehrere Fallberichte, einige Fallserien sowie eine randomisierte kontrollierte Studie [12] über die Behandlung von Therapie-resistenter Sarkoidose mit Infliximab. Unter Anti-TNF- α Therapie ist es unter anderem zu einer Verbesserung der Lungenfunktion bei pulmonaler Sarkoidose [39], der kognitiven Fähigkeiten, des Verhaltens und der motorischen Funktion bei Neurosarkoidose [97] oder einer kompletten Rückbildung von Granulomen in der Haut [78] gekommen.

Sowohl bei Miyara *et al.* als auch im Rahmen dieser Arbeit ist eine hohe Zahl an regulatorischen T-Zellen bei Sarkoidose-Patienten mit spontan regredientem Verlauf, die eine gute Prognose haben, gemessen worden. Daher kann man offensichtlich davon auszugehen, dass eine Anti-TNF- α Therapie auf die Tregs bei der Sarkoidose einen vergleichbaren Effekt hat wie bei der Rheumatoiden Arthritis und dem Morbus Crohn.

Über welchen Mechanismus TNF- α die Zahl der regulatorischen T-Zellen beim Menschen beeinflussen könnte, ist noch nicht bekannt. Wie bereits oben erwähnt haben Valencia *et al.* [134] gezeigt, dass TNF- α via TNFRII die Expression von Foxp3 mRNA und Foxp3 Protein herunter reguliert und so die Funktion der Tregs inhibiert. Die Studie von Zanin-Zhorov *et al.* [152] liefert einen weiteren Mechanismus, wie TNF- α die Funktion von Tregs beeinflusst. Demnach induziert TNF- α die vermehrte Rekrutierung von Protein Kinase C- θ (PKC- θ) an die immunologische Synapse, was zu einer Abnahme der Funktionsfähigkeit der Tregs führt. Ob TNF- α durch ähnliche Mechanismen die Anzahl der regulatorischen T-Zellen direkt beeinflusst, ist noch nicht untersucht worden. Eine andere mögliche Erklärung könnten Erkenntnisse über sogenannte Th17-Zellen im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen liefern.

Th17-Zellen sind erstmalig von Aggarwal *et al.* [1] und Langrish *et al.* [70] als eigenständige Population von CD4⁺ T-Zellen beschrieben worden, die nach der Behandlung von MNCs mit IL-23 entstanden sind und große Mengen an IL-17 produziert haben. Sie entwickeln sich aus naiven T-Zellen nach Stimulation mit TGF- β und IL6/IL-21 [81]. IL-1 und IL-23 können die Differenzierung noch verstärken [81]. Th17-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese organspezifischer Autoimmunerkrankungen. IL-17 produzierende T-Zellen können Symptome einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) von einer Maus auf die andere übertragen [70]. Das durch diese Zellen produzierte IL-17 verstärkt die TNF- α und IL-1 β Produktion [58] genauso wie die Produktion von Chemokinen [150] und verstärkt dadurch die Entzündungsreaktion.

Betelli *et al.* [14] beschreiben ein Gleichgewicht zwischen Th17 und Tregs bei Mäusen. Führt man den Zellkulturen aus stimulierten naiven T-Zellen TGF- β zu, entwickeln sich Foxp3⁺ T-Zellen. Verabreicht man naiven T-Zellen während der Differenzierung TGF- β plus IL-6, wird die Foxp3 Expression unterdrückt und es kommt stattdessen zur Differenzierung zu IL-17 produzierenden T-Zellen. Die beiden Zelltypen scheinen sich demnach aus denselben Vorläuferzellen zu entwickeln abhängig von den Zytokinen, die in der Umgebung präsentiert werden.

Für IL-6 ist bereits gezeigt worden, dass es die Differenzierung von naiven T-Zellen in Richtung von Th17-Zellen lenkt. Dagegen gibt es noch keine Daten dazu, ob und wenn ja wie TNF- α in diese Differenzierung eingreift und somit die Zahl der regulatorischen T-Zellen direkt beeinflussen könnte.

Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese liefert eine Studie unserer Arbeitsgruppe. 20 Patienten mit histologisch gesicherter Sarkoidose haben für 28 Tage durch Inhalation via Vernebler synthetisch hergestelltes VIP (vasoactive intestinal peptide) erhalten. VIP ist ein Neuropeptid, welches von neuronalen Zellen und T_H2-Zellen als Antwort auf einen Antigen-Stimulus freigesetzt wird. Es inhibiert die *in vitro* und *in vivo* Produktion von den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-12 und stimuliert die Produktion von den antiinflammatorischen Zytokinen IL-10 und IL-1Ra [29]. So

zeigt sich ein Trend zu einer Reduktion der IL-17 Produktion. Der Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen in der BAL erhöht sich durch die Behandlung mit VIP. Die Reduktion der TNF- α und IL-17 Produktion könnte hierfür eine Erklärung sein.

Die Ergebnisse der in diesem Kapitel zitierten Studien zusammen mit den Beobachtungen im Rahmen dieser Dissertation deuten darauf hin, dass bei der chronisch aktiven Verlaufsform der Sarkoidose ein Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen Faktoren und immunregulatorischen Mechanismen zugunsten der ersteren vorliegt. Bei einer spontanen Remission der Erkrankung könnten dagegen letztlich antiinflammatorische Faktoren, die die akute Entzündungsreaktion erfolgreich gegen regulieren, überwiegen. Durch Unterdrücken proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α [34,85,104] sowie durch Hochregulierung antiinflammatorischer Faktoren kann anscheinend der Ausgang der Erkrankung positiv beeinflusst werden.

5.4 Die immunregulatorische Kapazität der Tregs ist abhängig von mehreren Faktoren

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass die gemessenen regulatorischen T-Zellen sowohl aus der BAL als auch aus dem Blut die Proliferation der Effektor T-Zellen dosisabhängig supprimieren (siehe Kapitel 4.3 und 4.5). Es ist jedoch nicht untersucht worden, ob sich die regulatorischen T-Zellen von den verschiedenen Patientengruppen in ihrer Suppressionsfähigkeit unterscheiden. Erste Ergebnisse hinsichtlich dieser Frage liefern Miyara *et al.* [83]. Sie haben gezeigt, dass zirkulierende Tregs von Patienten mit einer aktiven Sarkoidose die IL-2 Produktion genauso gut inhibieren wie Tregs von Kontrollpersonen. Dagegen sind zirkulierende Tregs von Sarkoidosepatienten nicht in der Lage die TNF- α und die IFN- γ Sekretion vollständig zu unterdrücken. Tregs von Normalpersonen sind jedoch dazu fähig. Miyara *et al.* schließen aus ihren Daten, dass kein intrinsischer Defekt der Patienten-Tregs die Ursache für diese Beobachtungen sei. Einen Hinweis auf eine mögliche Erklärung liefert die Studie von Valencia *et al.* [134]. Sie hat gezeigt, dass TNF via Tumornekrosefaktor Rezeptor II (TNFRII) die Expression von Foxp3 mRNA und

Foxp3 Protein herunter reguliert und so die Fähigkeit der Tregs zur Suppression negativ beeinflusst. Zu den Studien von Miyara *et al.* und Valencia *et al.* passen die Ergebnisse der Untersuchung von Ehrenstein *et al.* [34] bei der Rheumatoiden Arthritis (RA). Tregs, die von Patienten mit aktiver RA vor der Therapie mit Infliximab, einem monoklonalen Antikörper gegen TNF- α , isoliert worden sind, sind wie bei der Sarkoidose nicht in der Lage die TNF- α und IFN- γ Freisetzung durch autologe Effektor T-Zellen zu inhibieren. Diese Fähigkeit haben die regulatorischen T-Zellen drei Monate nach der Behandlung zurückgewonnen. Ein weiterer Lösungsansatz für die geringere Suppressionsfähigkeit der Tregs wäre die Tatsache, dass Effektor T-Zellen unempfindlich gegenüber der Suppression durch regulatorische T-Zellen werden können. So ist gezeigt worden, dass es sowohl *in vitro* [9] als auch *in vivo* [15] bei stark aktivierten Teffs trotz Cokultivierung mit Tregs zu keiner Einschränkung der Proliferation kommt. Passend dazu, sind in der Studie von Miyara *et al.* restliche Mengen von TNF- α und IFN- γ bei der Cokultivierung von Tregs von Kontrollpersonen und CD4⁺CD25⁻ T-Lymphozyten von Sarkoidosepatienten gemessen worden [83]. Es gibt aber auch Hinweise, dass im Gegenzug die Kapazität der regulatorischen T-Zellen Effektor T-Zellen zu supprimieren nach ihrer Proliferation erhöht ist. So supprimieren Tregs die zuvor mit Lipopolysacchariden (LPS) und IL-2 behandelt worden sind, die Proliferation von Teffs viermal stärker als frisch isolierte Tregs [21]. Dasselbe Ergebnis ist erreicht worden nach Behandlung der regulatorischen T-Zellen mit Anti-CD3 und IL-2 [131] sowie nach Cokultivierung mit Ovalbumin (OVA)-stimulierten Dendritischen Zellen [149]. Vergleichbare Resultate haben sich auch in *in vivo*-Modellen ergeben. So können Tregs aus HSV (Herpes simplex Virus)- [123] und Malaria-infizierten [49] Mäusen sowie aus dem ZNS von Mäusen mit EAE [80] oder aus dem Pankreas von Mäusen mit spontan entstehendem Diabetes [24] vermehrt Teffs supprimieren. Passend dazu haben Pinkston *et al.* [98] erhöhte IL-2 Konzentrationen in der Lunge von Sarkoidosepatienten mit hoch aktiver Alveolitis nachweisen können. Dieses IL-2 wird laut einer Studie von O`Gorman *et al.* [91] von Ag-stimulierten Teffs in der Frühphase der Immunantwort produziert und führt zunächst zu der Proliferation

und Aktivierung der Tregs. Folglich werden zunächst die Kontrollmechanismen der Immunreaktion etabliert, bevor diese Immunreaktion richtig in Gang kommt, um einer überschießenden Reaktion entgegenzuwirken. Lösliche IL-2 Rezeptoren (sIL2R) werden ebenfalls von Teffs sezerniert und können freies IL-2 binden. Maier *et al.* [76] haben herausgefunden, dass diese sIL2R den IL-2 Signalweg in Tregs und somit deren Proliferation und Aktivierung verhindern können. Entsprechend können in der gleichen Studie maligne Verläufe der Multiplen Sklerose (MS) mit hohen sIL2R Konzentrationen assoziiert werden. Vergleichbare Ergebnisse liegen auch für die Sarkoidose vor. Hohe sIL2R Konzentrationen besitzen laut einer Studie von Ziegenhagen *et al.* [156] einen prädiktiven Wert für eine Progression der Erkrankung. Es gibt also Hinweise, dass zum einen antiinflammatorische Zytokine die Suppressionsfähigkeit der Tregs negativ beeinflussen sowie stark aktivierte Effektor T-Zellen der Suppression durch Tregs entkommen können, zum andern regulatorische T-Zellen nach ihrer Proliferation eine erhöhte Suppressionsfähigkeit besitzen. Welche dieser beobachteten Mechanismen in welchem Umfang zur Pathophysiologie der Sarkoidose beitragen, kann allerdings noch nicht beantwortet werden.

5.5 Erweitertes Konzept zur Sarkoidose

Ausgehend von den zuvor diskutierten Ergebnissen dieser Dissertation kann ein erweitertes Konzept der pathophysiologischen Vorgänge bei der Sarkoidose vorgeschlagen werden. Es werden dabei mögliche Mechanismen aufgezeigt, die eine Spontanremission der Erkrankung begünstigen oder zu einem Fortschreiten führen.

5.5.1 Spontan regrediente Sarkoidose

Bei der spontan regredienten Verlaufsform der Sarkoidose verursacht der Antigen-Stimulus eine akute effektive Immunreaktion [31,32,47,99,156]. Der Patient zeigt körperliche Symptome wie hohes Fieber, Abgeschlagenheit, unproduktiven Husten oder Dyspnoe. Die hohe Erkrankungsaktivität spiegelt sich in einem eher hohen CD4/CD8-Quotient in der BAL [31,47] und hohen

CRP-Werten im Blut [156] wieder. Im betroffenen Organ kommt es im Rahmen der typischen T_H1 -Immunantwort zur Bildung von Granulomen. Während der Entzündungsreaktion vermehren sich die regulatorischen T-Zellen im betroffenen Organ durch Proliferation und Rekrutierung [19,59,82,83,96,125,127]. Gleichzeitig steigert sich ihre Fähigkeit Teffs zu supprimieren [21,24,49,80,123,131,149]. Ist das Pathogen beseitigt, nehmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [155,157] und die Resistenz von Teffs gegenüber der Suppression durch Tregs ab [9,42]. Regulatorische T-Zellen sind nun in der Lage durch Suppression der Teffs und Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie TGF- β [66,159] die Immunreaktion zu beenden. Die Granulome bilden sich zurück. Die Erkrankung heilt aus und hinterlässt nur eine zarte Narbenbildung in dem betroffenen Organ. Es bleiben keinerlei Einschränkung der Organfunktion zurück. (siehe Abb. 5.13 und Abb. 5.15).

5.5.2 Chronisch aktive Sarkoidose

Patienten mit einem chronisch aktiven Verlauf leiden unter trockenem Husten, thorakalem Engegefühl und zum Teil ausgeprägter Belastungsdyspnoe. Sie zeigen weniger Symptome einer systemischen Reaktion. Der CD4/CD8-Quotient ist eher niedrig, das CRP nur mäßig erhöht oder normal. In den betroffenen Organen lassen sich hingegen hohe Werte proinflammatorischer Zytokine messen (vor allem TNF- α) [155,157], was für eine andauernde Entzündungsreaktion spricht. Möglicherweise aufgrund der hohen TNF- α Produktion und weiterer bisher ungeklärter Faktoren kommt es zu einem Mangel an Tregs. Aufgrund des Mangels und der geringen Suppressionskapazität können die regulatorischen T-Zellen die resistenten Teffs in ihrer Aktivität nicht unterdrücken und folglich die Entzündungsreaktion nicht beenden. Die Erkrankung schreitet fort und führt zur Zerstörung des betroffenen Organs. (siehe Abb. 5.14 und Abb. 5.15).

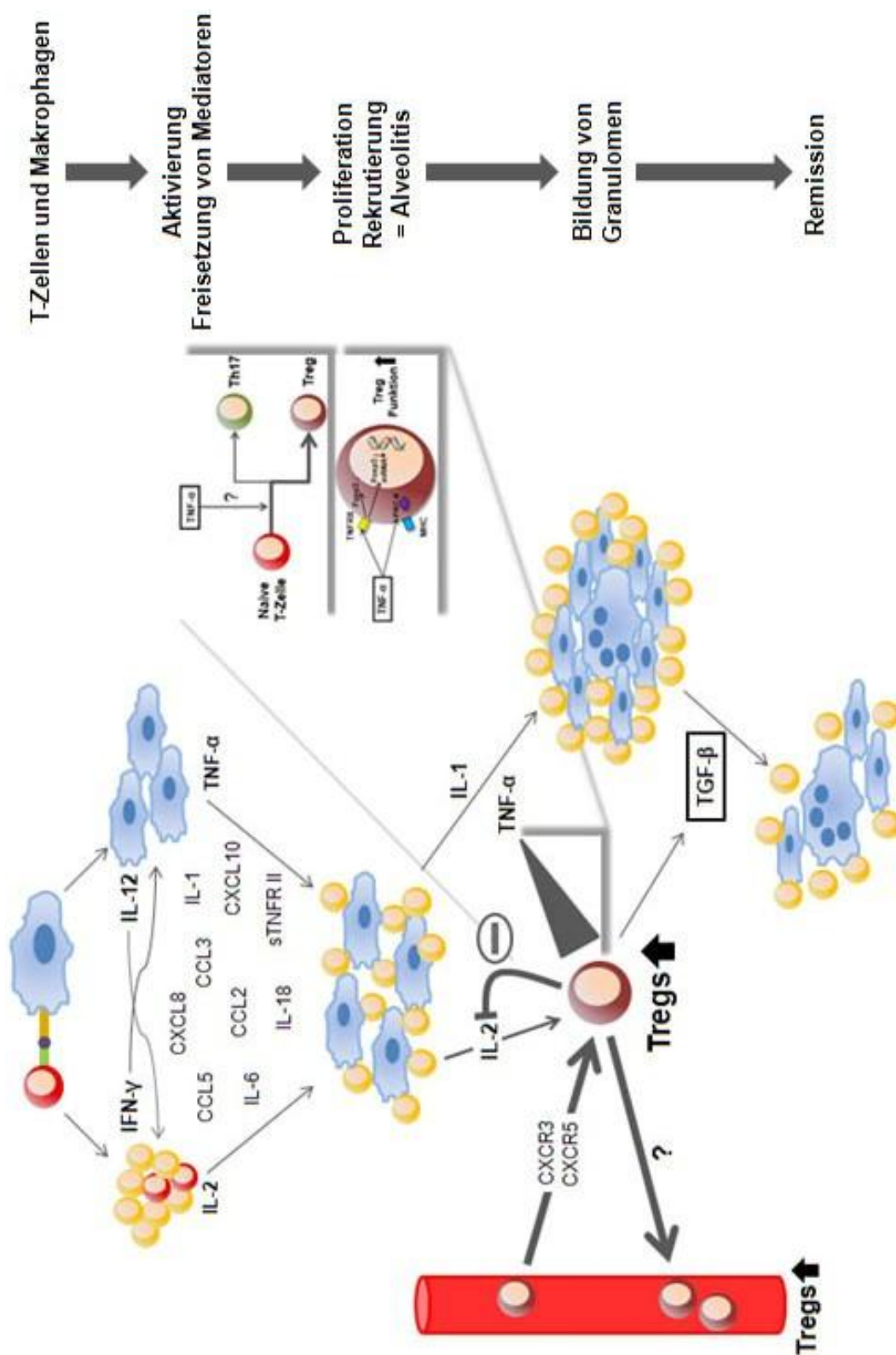


Abb. 5.13: neues Konzept zur spontan regredienten Verlaufsform der Sarkoidose. Erläuterungen siehe Kapitel 5.5.1.

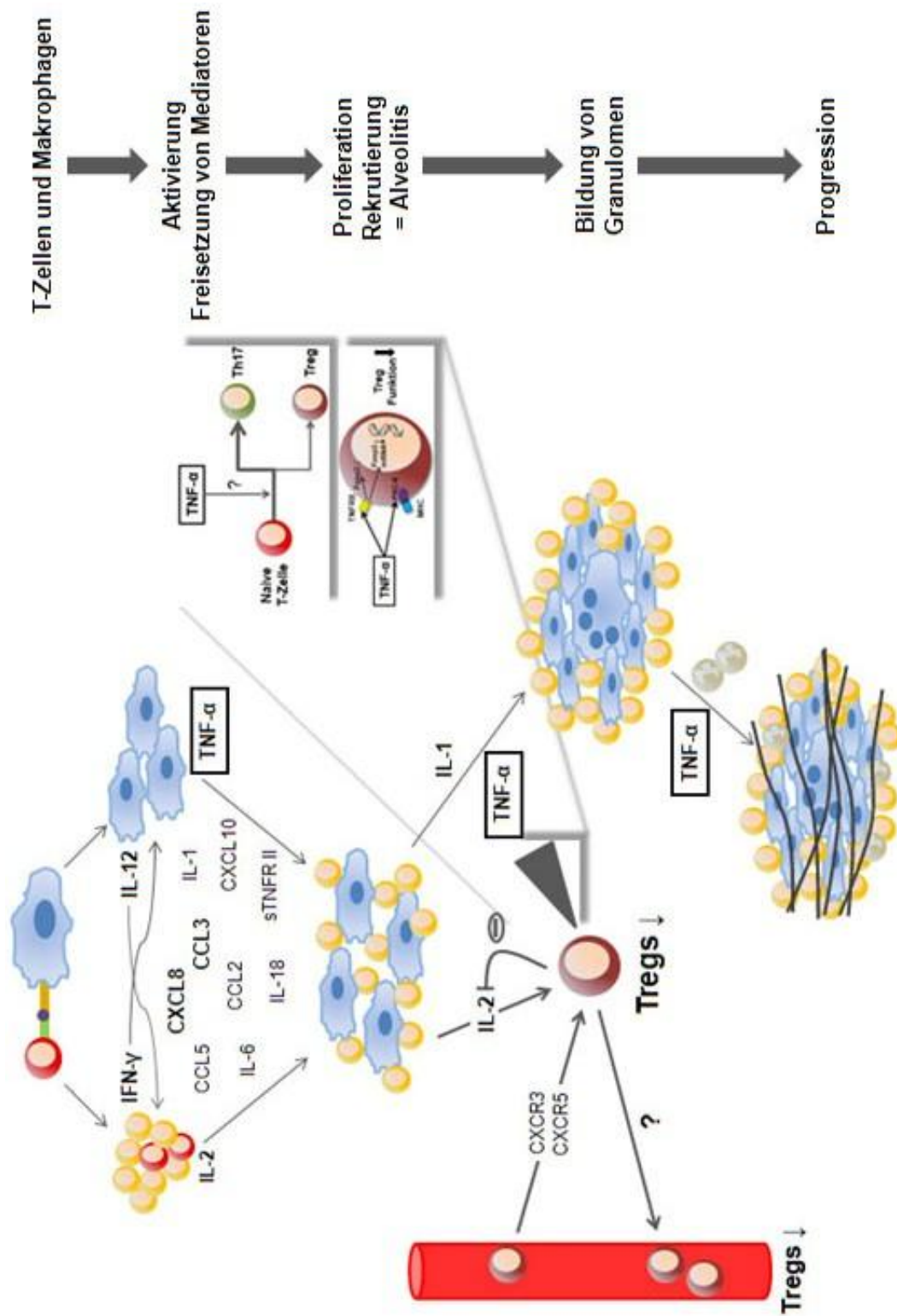


Abb. 5.14: neues Konzept zur chronisch aktiven Verlaufsform der Sarkoidose. Erläuterungen siehe Kapitel 5.5.2.

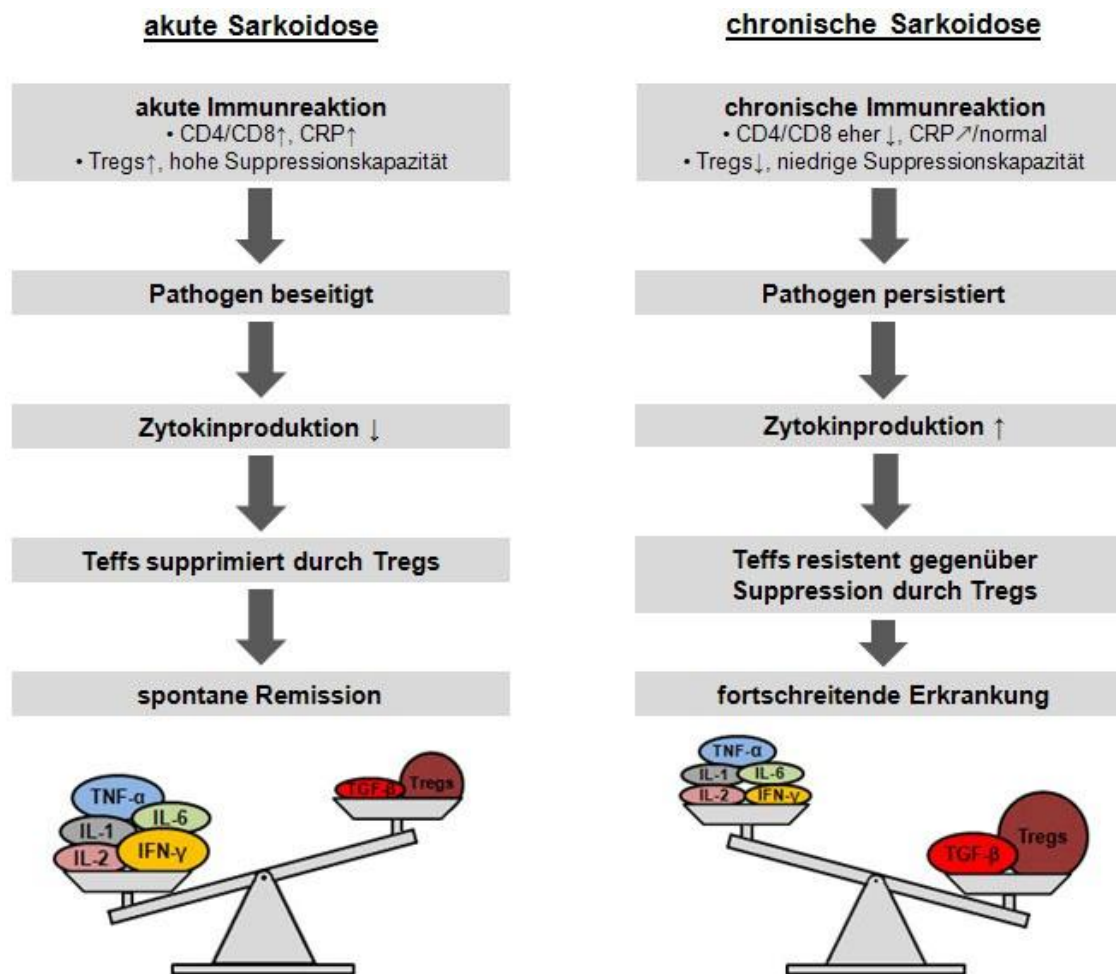


Abb. 5.15: Gegenüberstellung der immunpathophysiologischen Abläufe bei der spontan regredienten und der chronisch aktiven Verlaufsform der Sarkoidose. Erläuterungen siehe Kapitel 5.5.1 und 5.5.2.

5.6 Ausblick

Die Sarkoidose ist eine Systemerkrankung, die durch die Bildung von nicht-verkäsenden Epitheloidzell-haltige Granulomen in den betroffenen Organen charakterisiert ist. In ungefähr der Hälfte der Fälle heilt diese Erkrankung spontan oder nach einer Behandlung aus. Bei einem gewissen Prozentsatz der Patienten nimmt die Sarkoidose jedoch einen chronisch aktiven Verlauf. Diese Patienten benötigen meist eine längerfristige Behandlung mit Kortikosteroiden, um eine zunehmende Dysfunktion der betroffenen Organe zu verhindern. Die kumulative Toxizität der Kortikosteroide macht jedoch einen längerfristigen Gebrauch problematisch. Deshalb herrscht ein Interesse an alternativen Therapien der Sarkoidose.

Im Rahmen dieser Dissertation ist gezeigt worden, dass ein Anstieg der Tregs sowohl im betroffenen Organ als auch im Blut eine Remission der Sarkoidose zur Folge hat. Bei einem Mangel derselben Zellen kommt es zu einer Progression und letztlich zur kontinuierlichen Zerstörung und Dysfunktion des betroffenen Organs. Folglich wäre eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen bei Sarkoidose-Patienten ein Ansatz für ein neues Therapiekonzept.

Eine solche Erhöhung ist sowohl bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis [34,85] als auch bei Morbus Crohn-Patienten [104] durch die Behandlung mit Infliximab erreicht worden. Vergleichbare Studien für die Sarkoidose gibt es noch nicht. Jedoch hat sich gezeigt, dass eine Anti-TNF- α -Behandlung bei Therapie-resistenter Sarkoidose erfolgversprechend ist [12,39,78,97]. Zudem hat in einer Studie unserer Arbeitsgruppe eine Behandlung von 20 Patienten mit histologisch gesicherter Sarkoidose mit synthetisch hergestelltem VIP, welches ebenfalls TNF- α antagonisiert, zu einer Erhöhung der regulatorischen T-Zellen geführt. Diese Ergebnisse decken sich mit der im Rahmen dieser Dissertation gefundenen negativen Korrelation zwischen dem Prozentsatz regulatorischer T-Zellen in der BAL und des aus dem Überstand der BAL gemessenen TNF- α .

All diese Resultate sprechen für die Strategie mittels Anti-TNF- α -Therapie den Prozentsatz der Tregs bei chronisch aktiven, Therapie refraktären Verläufen der Sarkoidose anzuheben und so eine Heilung zu erreichen.

Jedoch ist hier aufgrund von Erkenntnissen bezüglich Tregs im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen Vorsicht geboten. Denn erhöhte Treg-Zahlen sind auch im Blut und in malignen Ergüssen von Patienten mit verschiedenen Arten von Malignomen gemessen worden [73,144,145]. Zudem haben einige Studien gezeigt, dass Tumoren sich regulatorische T-Zellen zunutze machen, um der körpereigenen Abwehr zu entgehen [25,103,143,154].

Es wird deshalb noch einiger Studien bedürfen, um den therapeutischen Nutzen einer solchen neuen Behandlungsstrategie bei der Sarkoidose gegen ihre möglichen negativen Nebenwirkungen abzuwägen.

6 Zusammenfassung

Miyara et al haben als erste den Zusammenhang zwischen der akuten Verlaufsform der Sarkoidose und einer hohen Anzahl der regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der BAL und dem Blut hergestellt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es das Ziel dieser Dissertation gewesen sowohl die Treg-Konzentration in der BAL und im Blut bei verschiedenen Verläufen der Sarkoidose und bei Normalpersonen mittels FACS als auch zusätzlich die spontane TNF- α Produktion der BAL-Zellen durch ELISA zu bestimmen.

In der vorgelegten Arbeit ist gezeigt worden, dass die Anzahl an Tregs bei Patienten mit chronisch aktiver Sarkoidose prozentual sowohl in der BAL als auch im Blut am niedrigsten gelegen ist, im Gegensatz zu Patienten mit einer Spontanremission, bei denen die höchsten Treg-Zahlen nachgewiesen worden sind. Im Vergleich zu Normalpersonen sind die Treg-Zahlen bei Patienten mit einer Spontanremission zwar tendentiell höher, der Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Zudem zeigt die Arbeit, dass die gemessenen Tregs die Proliferation von Effektor T-Zellen dosisabhängig hemmen. Patienten mit chronisch aktiver Sarkoidose zeigen zusätzlich eine signifikant höhere pulmonale TNF- α Produktion als Patienten mit einer Spontanremission. Die TNF- α Produktion korreliert invers mit der Anzahl der BAL-Tregs.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein Anstieg der Tregs sowohl im betroffenen Organ als auch im Blut prognostisch günstig ist. Bei einem Mangel der Tregs in Kombination mit einer hohen TNF- α Produktion kommt es zu einer Progression der Sarkoidose. Ziel einer medikamentösen Therapie muss es daher sein das immunologische Gleichgewicht in Richtung der regulatorischen T-Zellen zu verändern. Die Therapie mit Anti-TNF- α Antikörper oder die Behandlung mit synthetisch hergestelltem VIP haben sich in dieser Hinsicht schon als vielversprechend erwiesen und sind nun aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Dissertation auch immunpathogenetisch begründet.

7 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney (2003), Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278(3): 1910-4.
2. Agostini, C., M. Cassatella, R. Zambello, L. Trentin, S. Gasperini, A. Perin, F. Piazza, M. Siviero, M. Facco, M. Dziejman, M. Chilosi, S. Qin, A.D. Luster, and G. Semenzato (1998), Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J Immunol*, 161(11): 6413-20.
3. Akbar, A.N., M. Vukmanovic-Stejic, L.S. Taams, and D.C. Macallan (2007), The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*, 7(3): 231-7.
4. Allan, S.E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P.C. Orban, S.F. Ziegler, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings (2005), The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest*, 115(11): 3276-84.
5. Apostolou, I. and H. von Boehmer (2004), In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*, 199(10): 1401-8.
6. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer (2002), Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, 3(8): 756-63.
7. Arnett, H.A., S.S. Escobar, E. Gonzalez-Suarez, A.L. Budelsky, L.A. Steffen, N. Boiani, M. Zhang, G. Siu, A.W. Brewer, and J.L. Viney (2007), BTNL2, a butyrophilin/B7-like molecule, is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation. *J Immunol*, 178(3): 1523-33.
8. Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F. Powrie (1999), An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190(7): 995-1004.
9. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler (2002), Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol*, 169(11): 6210-7.
10. Barcelo, B., J. Pons, J.M. Ferrer, J. Sauleda, A. Fuster, and A.G. Agusti (2008), Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J*, 31(3): 555-62.
11. Barnard, J., C. Rose, L. Newman, M. Canner, J. Martyny, C. McCammon, E. Bresnitz, M. Rossman, B. Thompson, B. Rybicki, S.E. Weinberger,

- D.R. Moller, G. McLennan, G. Hunninghake, L. DePalo, R.P. Baughman, M.C. Iannuzzi, M.A. Judson, G.L. Knatterud, A.S. Teirstein, H. Yeager, Jr., C.J. Johns, D.L. Rabin, and R. Cherniack (2005), Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *J Occup Environ Med*, 47(3): 226-34.
12. Baughman, R.P., M. Drent, M. Kavuru, M.A. Judson, U. Costabel, R. du Bois, C. Albera, M. Brutsche, G. Davis, J.F. Donohue, J. Muller-Quernheim, R. Schlenker-Herceg, S. Flavin, K.H. Lo, B. Oemar, and E.S. Barnathan (2006), Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(7): 795-802.
 13. Berlin, M., A. Fogdell-Hahn, O. Olerup, A. Eklund, and J. Grunewald (1997), HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(5): 1601-5.
 14. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo (2006), Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090): 235-8.
 15. Billiard, F., E. Litvinova, D. Saadoun, F. Djelti, D. Klatzmann, J.L. Cohen, G. Marodon, and B.L. Salomon (2006), Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol*, 177(4): 2167-74.
 16. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt (2007), Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204(6): 1303-10.
 17. Brewerton, D.A., C. Cockburn, D.C. James, D.G. James, and E. Neville (1977), HLA antigens in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*, 27(2): 227-9.
 18. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell (2001), Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1): 68-73.
 19. Bystry, R.S., V. Aluvihare, K.A. Welch, M. Kallikourdis, and A.G. Betz (2001), B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*, 2(12): 1126-32.
 20. Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnicka-Worms, and T.J. Ley (2007), Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4): 635-46.
 21. Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J.

- Demengeot (2003), Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 197(4): 403-11.
22. Chae, W.J., O. Henegariu, S.K. Lee, and A.L. Bothwell (2006), The mutant leucine-zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of Foxp3 in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25): 9631-6.
 23. Chen, C., E.A. Rowell, R.M. Thomas, W.W. Hancock, and A.D. Wells (2006), Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*, 281(48): 36828-34.
 24. Clough, L.E., C.J. Wang, E.M. Schmidt, G. Booth, T.Z. Hou, G.A. Ryan, and L.S. Walker (2008), Release from regulatory T cell-mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J Immunol*, 180(8): 5393-401.
 25. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou (2004), Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9): 942-9.
 26. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille (2009), Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5): 626-35.
 27. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold (2004), Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34(9): 2480-8.
 28. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson (2007), Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204(6): 1257-65.
 29. Delgado, M., D. Pozo, and D. Ganea (2004), The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev*, 56(2): 249-90.
 30. Doyle, C., The complete Sherlock Homes with a preface by Christopher Morley. 1930, Garden City: Doubleday & Company.
 31. Drent, M., H. van Velzen-Blad, M. Diamant, H.C. Hoogsteden, and J.M. van den Bosch (1993), Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile. A study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest*, 104(3): 795-800.
 32. Drent, M., R.M. Wirnsberger, J. de Vries, M.P. van Dieijen-Visser, E.F. Wouters, and A.M. Schols (1999), Association of fatigue with an acute

- phase response in sarcoidosis. *Eur Respir J*, 13(4): 718-22.
33. Dubaniewicz, A., S. Kampfer, and M. Singh (2006), Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 86(1): 60-7.
 34. Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, and C. Mauri (2004), Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, 200(3): 277-85.
 35. Eishi, Y., M. Suga, I. Ishige, D. Kobayashi, T. Yamada, T. Takemura, T. Takizawa, M. Koike, S. Kudoh, U. Costabel, J. Guzman, G. Rizzato, M. Gambacorta, R. du Bois, A.G. Nicholson, O.P. Sharma, and M. Ando (2002), Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol*, 40(1): 198-204.
 36. Fehrenbach, H., G. Zissel, T. Goldmann, T. Tschernig, E. Vollmer, R. Pabst, and J. Muller-Quernheim (2003), Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis. *Eur Respir J*, 21(3): 421-8.
 37. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky (2005), A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 6(11): 1142-51.
 38. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky (2003), Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4): 330-6.
 39. Fouchier, S.M., G.M. Moller, M. Van Santen-Hoeufft, C.G. Faber, F.W. Smeenk, and M. Drent (2004), [Successful treatment with infliximab of a patient with refractory sarcoidosis]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 148(49): 2446-50.
 40. Fritzsching, B., N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P.H. Krammer, and E. Suri-Payer (2005), In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol*, 175(1): 32-6.
 41. Gavin, M.A., T.R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W.Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E.L. Ocheltree, P.D. Greenberg, H.D. Ochs, and A.Y. Rudensky (2006), Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17): 6659-64.
 42. George, T.C., J. Bilsborough, J.L. Viney, and A.M. Norment (2003), High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur J Immunol*, 33(2): 502-11.

43. Ginns, L.C., P.D. Goldenheim, R.C. Burton, R.B. Colvin, L.G. Miller, G. Goldstein, C. Hurwitz, and H. Kazemi (1982), T-lymphocyte subsets in peripheral blood and lung lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis: analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol*, 25(1): 11-20.
44. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle (2005), Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174(4): 1783-6.
45. Gorham, E.D., C.F. Garland, F.C. Garland, K. Kaiser, W.D. Travis, and J.A. Centeno (2004), Trends and occupational associations in incidence of hospitalized pulmonary sarcoidosis and other lung diseases in Navy personnel: a 27-year historical prospective study, 1975-2001. *Chest*, 126(5): 1431-8.
46. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo (1997), A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652): 737-42.
47. Grunewald, J., A. Eklund, and O. Olerup (2004), Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(6): 696-702.
48. Hajizadeh, R., H. Sato, J. Carlisle, M. Nadaf, W. Evans, B. Shepherd, R. Miller, S. Kalams, and D. WP (2007), Mycobacterium tuberculosis Antigen 85A induces Th-1 immune responses in systemic sarcoidosis. *J Clin Immunol*, 27: 445-54.
49. Hisaeda, H., K. Tetsutani, T. Imai, C. Moriya, L. Tu, S. Hamano, X. Duan, B. Chou, H. Ishida, A. Aramaki, J. Shen, K.J. Ishii, C. Coban, S. Akira, K. Takeda, K. Yasutomo, M. Torii, and K. Himeno (2008), Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol*, 180(4): 2496-503.
50. Homann, D., A. Holz, A. Bot, B. Coon, T. Wolfe, J. Petersen, T.P. Dyrberg, M.J. Grusby, and M.G. von Herrath (1999), Autoreactive CD4+ T cells protect from autoimmune diabetes via bystander suppression using the IL-4/Stat6 pathway. *Immunity*, 11(4): 463-72.
51. Hori, S., M. Haury, A. Coutinho, and J. Demengeot (2002), Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12): 8213-8.
52. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi (2003), Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609): 1057-61.
53. Hutchinson, J. (1877), Anomalous diseases of skin and fingers: case of livide papillary psoriasis? *Illustrations of clinical surgery*: 42.

54. Iannuzzi, M.C., M.J. Maliarik, L.M. Poisson, and B.A. Rybicki (2003), Sarcoidosis susceptibility and resistance HLA-DQB1 alleles in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(9): 1225-31.
55. Iannuzzi, M.C., S.K. Iyengar, C. Gray-McGuire, R.C. Elston, R.P. Baughman, J.F. Donohue, K. Hirst, M.A. Judson, M.S. Kavuru, M.J. Maliarik, D.R. Moller, L.S. Newman, D.L. Rabin, C.S. Rose, M.D. Rossman, A.S. Teirstein, and B.A. Rybicki (2005), Genome-wide search for sarcoidosis susceptibility genes in African Americans. *Genes Immun*, 6(6): 509-18.
56. Idali, F., J. Wahlstrom, C. Muller-Suur, A. Eklund, and J. Grunewald (2008), Analysis of regulatory T cell associated forkhead box P3 expression in the lungs of patients with sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*, 152(1): 127-37.
57. Ishihara, M., S. Ohno, T. Ishida, H. Ando, T. Naruse, Y. Nose, and H. Inoko (1994), Molecular genetic studies of HLA class II alleles in sarcoidosis. *Tissue Antigens*, 43(4): 238-41.
58. Jovanovic, D.V., J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F.C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J.P. Pelletier (1998), IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160(7): 3513-21.
59. Katchar, K., A. Eklund, and J. Grunewald (2003), Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. *J Intern Med*, 254(6): 564-71.
60. Katoh, S., K. Fukushima, N. Matsumoto, N. Ehara, K. Matsumoto, A. Yamauchi, and M. Hirashima (2005), Accumulation of CXCR3-expressing eosinophils and increased concentration of its ligands (IP10 and Mig) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol*, 137(3): 229-35.
61. Keir, M.E. and A.H. Sharpe (2005), The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev*, 204: 128-43.
62. Kingsley, C.I., M. Karim, A.R. Bushell, and K.J. Wood (2002), CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*, 168(3): 1080-6.
63. Klein, J.T., T.D. Horn, J.D. Forman, R.F. Silver, A.S. Teirstein, and D.R. Moller (1995), Selection of oligoclonal V beta-specific T cells in the intradermal response to Kveim-Siltzbach reagent in individuals with sarcoidosis. *J Immunol*, 154(3): 1450-60.
64. Knoechel, B., J. Lohr, E. Kahn, J.A. Bluestone, and A.K. Abbas (2005), Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med*, 202(10): 1375-86.

65. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, and H. von Boehmer (2005), Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, 6(12): 1219-27.
66. Kruit, A., J.C. Grutters, H.J. Ruven, C.H. van Moorsel, R. Weiskirchen, S. Mengsteab, and J.M. van den Bosch (2006), Transforming growth factor-beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis. *Chest*, 129(6): 1584-91.
67. Kucera, G.P., B.A. Rybicki, K.L. Kirkey, S.W. Coon, M.L. Major, M.J. Maliarik, and M.C. Iannuzzi (2003), Occupational risk factors for sarcoidosis in African-American siblings. *Chest*, 123(5): 1527-35.
68. Kuznitsky, E. and A. Bittdorf (1915), Boecksches Sarkoid mit Beteiligung innerer Organe. *Münchener medizinische Wochenschrift*, 62: 1349-53.
69. Kveim, A. (1941), En ny og spesifikk kutan-reaksjon ved Boecks sarcoid. *Nord Med*, 9: 169-72.
70. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua (2005), IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201(2): 233-40.
71. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B.M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes (2008), Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*, 180(9): 5916-26.
72. Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone (2006), CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*, 203(7): 1701-11.
73. Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan (2002), Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, 169(5): 2756-61.
74. Lopes, J.E., T.R. Torgerson, L.A. Schubert, S.D. Anover, E.L. Ocheltree, H.D. Ochs, and S.F. Ziegler (2006), Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol*, 177(5): 3133-42.
75. Ma, Y., A. Gal, and M.N. Koss (2007), The pathology of pulmonary sarcoidosis: update. *Semin Diagn Pathol*, 24(3): 150-61.
76. Maier, L.M., D.E. Anderson, C.A. Severson, C. Baecher-Allan, B. Healy, D.V. Liu, K.D. Wittrup, P.L. De Jager, and D.A. Hafler (2009), Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA

- on immune responses. *J Immunol*, 182(3): 1541-7.
77. Malek, T.R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong (2002), CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 17(2): 167-78.
 78. Mallbris, L., A. Ljungberg, M.A. Hedblad, P. Larsson, and M. Stahle-Backdahl (2003), Progressive cutaneous sarcoidosis responding to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J Am Acad Dermatol*, 48(2): 290-3.
 79. Mantel, P.Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C.B. Schmidt-Weber (2006), Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*, 176(6): 3593-602.
 80. McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton (2005), Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol*, 175(5): 3025-32.
 81. Mills, K.H. (2008), Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*, 38(10): 2636-49.
 82. Miotto, D., P. Christodoulopoulos, R. Olivenstein, R. Taha, L. Cameron, A. Tsicopoulos, A.B. Tonnel, O. Fahy, J.J. Lafitte, A.D. Luster, B. Wallaert, C.E. Mapp, and Q. Hamid (2001), Expression of IFN-gamma-inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1- and TH2-mediated lung diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 107(4): 664-70.
 83. Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, M. Kambouchner, D. Valeyre, C. Chapelon-Abric, P. Debre, J.C. Piette, and G. Gorochov (2006), The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med*, 203(2): 359-70.
 84. Morrissey, P.J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J.D. Watson (1993), CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med*, 178(1): 237-44.
 85. Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein (2007), Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*, 204(1): 33-9.
 86. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober (2001), Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194(5): 629-44.
 87. Newman, L.S., C.S. Rose, E.A. Bresnitz, M.D. Rossman, J. Barnard, M. Frederick, M.L. Terrin, S.E. Weinberger, D.R. Moller, G. McLennan, G.

- Hunninghake, L. DePalo, R.P. Baughman, M.C. Iannuzzi, M.A. Judson, G.L. Knatterud, B.W. Thompson, A.S. Teirstein, H. Yeager, Jr., C.J. Johns, D.L. Rabin, B.A. Rybicki, and R. Cherniack (2004), A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med*, 170(12): 1324-30.
88. Nguyen, T., X.K. Liu, Y. Zhang, and C. Dong (2006), BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol*, 176(12): 7354-60.
89. Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969), Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(906): 753-5.
90. Oberle, N., N. Eberhardt, C.S. Falk, P.H. Krammer, and E. Suri-Payer (2007), Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4⁺CD25⁺ T cells by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*, 179(6): 3578-87.
91. O'Gorman, W.E., H. Doms, S.H. Thorne, W.F. Kuswanto, E.F. Simonds, P.O. Krutzik, G.P. Nolan, and A.K. Abbas (2009), The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J Immunol*, 183(1): 332-9.
92. O'Neill E, J., A. Sundstedt, G. Mazza, K.S. Nicolson, M. Ponsford, L. Saurer, H. Streeter, S. Anderton, and D.C. Wraith (2004), Natural and induced regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1029: 180-92.
93. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi (2008), Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(29): 10113-8.
94. Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi (2007), Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 446(7136): 685-9.
95. Penhale, W.J., A. Farmer, R.P. McKenna, and W.J. Irvine (1973), Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol*, 15(2): 225-36.
96. Petrek, M., A. Gibejova, J. Drabek, F. Mrazek, V. Kolek, E. Weigl, and R.M. du Bois (2002), CC chemokine receptor 5 (CCR5) mRNA expression in pulmonary sarcoidosis. *Immunol Lett*, 80(3): 189-93.
97. Pettersen, J.A., D.W. Zochodne, R.B. Bell, L. Martin, and M.D. Hill (2002), Refractory neurosarcoidosis responding to infliximab. *Neurology*, 59(10): 1660-1.
98. Pinkston, P., P.B. Bitterman, and R.G. Crystal (1983), Spontaneous release of interleukin-2 by lung T lymphocytes in active pulmonary

- sarcoidosis. *N Engl J Med*, 308(14): 793-800.
99. Planck, A., A. Eklund, and J. Grunewald (2001), Inflammatory BAL-fluid and serum parameters in HLA DR17 positive vs. DR17 negative patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 18(1): 64-9.
 100. Powrie, F. and D. Mason (1990), OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med*, 172(6): 1701-8.
 101. Powrie, F., M.W. Leach, S. Mauze, L.B. Caddle, and R.L. Coffman (1993), Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol*, 5(11): 1461-71.
 102. Prezant, D.J., A. Dhala, A. Goldstein, D. Janus, F. Ortiz, T.K. Aldrich, and K.J. Kelly (1999), The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters. *Chest*, 116(5): 1183-93.
 103. Quezada, S.A., K.S. Peggs, M.A. Curran, and J.P. Allison (2006), CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest*, 116(7): 1935-45.
 104. Ricciardelli, I., K.J. Lindley, M. Londei, and S. Quarantino (2008), Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology*, 125(2): 178-83.
 105. Rosen, Y. (2007), Pathology of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 28(1): 36-52.
 106. Rosen, Y., T.J. Athanassiades, S. Moon, and H.A. Lyons (1978), Nongranulomatous interstitial pneumonitis in sarcoidosis. Relationship to development of epithelioid granulomas. *Chest*, 74(2): 122-5.
 107. Rossman, M.D., B. Thompson, M. Frederick, M. Maliarik, M.C. Iannuzzi, B.A. Rybicki, J.P. Pandey, L.S. Newman, E. Magira, B. Beznik-Cizman, and D. Monos (2003), HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet*, 73(4): 720-35.
 108. Rybicki, B.A., J.L. Walewski, M.J. Maliarik, H. Kian, and M.C. Iannuzzi (2005), The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet*, 77(3): 491-9.
 109. Rybicki, B.A., M.C. Iannuzzi, M.M. Frederick, B.W. Thompson, M.D. Rossman, E.A. Bresnitz, M.L. Terrin, D.R. Moller, J. Barnard, R.P. Baughman, L. DePalo, G. Hunninghake, C. Johns, M.A. Judson, G.L. Knatterud, G. McLennan, L.S. Newman, D.L. Rabin, C. Rose, A.S. Teirstein, S.E. Weinberger, H. Yeager, and R. Cherniack (2001), Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med*, 164(11): 2085-91.

110. Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda (1985), Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*, 161(1): 72-87.
111. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda (1995), Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3): 1151-64.
112. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka (1982), Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*, 156(6): 1577-86.
113. Schaumann, J., *Sur le lupus pernio*. 1934, Stockholm: Norstedt & Söner.
114. Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl, and I. Horak (1991), Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 352(6336): 621-4.
115. Schurmann, M., P. Reichel, B. Muller-Myhsok, M. Schlaak, J. Muller-Quernheim, and E. Schwinger (2001), Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(5): 840-6.
116. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth (2006), Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 203(7): 1693-700.
117. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi (2005), Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 201(5): 723-35.
118. Sharma, P.K., P.K. Saha, A. Singh, S.K. Sharma, B. Ghosh, and D.K. Mitra (2009), FoxP3+ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 179(11): 1061-70.
119. Smyth, L.J., C. Starkey, J. Vestbo, and D. Singh (2007), CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest*, 132(1): 156-63.
120. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell (2008), Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 124(1): 13-22.
121. Song, Z., L. Marzilli, B.M. Greenlee, E.S. Chen, R.F. Silver, F.B. Askin, A.S. Teirstein, Y. Zhang, R.J. Cotter, and D.R. Moller (2005),

- Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *J Exp Med*, 201(5): 755-67.
122. Su, L., R.J. Creusot, E.M. Gallo, S.M. Chan, P.J. Utz, C.G. Fathman, and J. Ermann (2004), Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol*, 173(8): 4994-5001.
 123. Suvas, S., U. Kumaraguru, C.D. Pack, S. Lee, and B.T. Rouse (2003), CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*, 198(6): 889-901.
 124. Taams, L.S., J. Smith, M.H. Rustin, M. Salmon, L.W. Poulter, and A.N. Akbar (2001), Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*, 31(4): 1122-31.
 125. Taflin, C., M. Miyara, D. Nochy, D. Valeyre, J.M. Naccache, F. Altare, P. Salek-Peyron, C. Badoual, P. Bruneval, J. Haroche, A. Mathian, Z. Amoura, G. Hill, and G. Gorochoy (2009), FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol*, 174(2): 497-508.
 126. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi (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(12): 1969-80.
 127. Takeuchi, M., I.K. Oh, J. Suzuki, T. Hattori, A. Takeuchi, Y. Okunuki, Y. Usui, and M. Usui (2006), Elevated serum levels of CXCL9/monokine induced by interferon-gamma and CXCL10/interferon-gamma-inducible protein-10 in ocular sarcoidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(3): 1063-8.
 128. Tang, Q. and J.A. Bluestone (2008), The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*, 9(3): 239-44.
 129. Tarbell, K.V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R.M. Steinman (2004), CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*, 199(11): 1467-77.
 130. Thornton, A.M. and E.M. Shevach (1998), CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2): 287-96.
 131. Thornton, A.M. and E.M. Shevach (2000), Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 164(1): 183-90.

132. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach (2004), Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*, 34(2): 366-76.
133. Tonkin, D.R., J. He, G. Barbour, and K. Haskins (2008), Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo. *J Immunol*, 181(7): 4516-22.
134. Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E.M. Shevach, and P.E. Lipsky (2006), TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, 108(1): 253-61.
135. Valentonyte, R., J. Hampe, K. Huse, P. Rosenstiel, M. Albrecht, A. Stenzel, M. Nagy, K.I. Gaede, A. Franke, R. Haesler, A. Koch, T. Lengauer, D. Seegert, N. Reiling, S. Ehlers, E. Schwinger, M. Platzner, M. Krawczak, J. Muller-Quernheim, M. Schurmann, and S. Schreiber (2005), Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in *BTNL2*. *Nat Genet*, 37(4): 357-64.
136. Vieira, P.L., J.R. Christensen, S. Minaee, E.J. O'Neill, F.J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D.C. Wraith, and A. O'Garra (2004), IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 172(10): 5986-93.
137. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman (2008), How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7): 523-32.
138. Walker, M.R., D.J. Kasprowicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler (2003), Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*, 112(9): 1437-43.
139. Weiner, H.L. (2001), Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182: 207-14.
140. Wilczynski, J.R., M. Radwan, and J. Kalinka (2008), The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci*, 13: 2266-74.
141. Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Prohl, M. Appleby, and M.E. Brunkow (2001), X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 27(1): 18-20.
142. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi (2008), CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899): 271-5.

143. Wolf, D., A.M. Wolf, H. Rumpold, H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, G. Gastl, E. Gunsilius, and C. Marth (2005), The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11(23): 8326-31.
144. Woo, E.Y., C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S.C. Rubin, L.R. Kaiser, and C.H. June (2001), Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 61(12): 4766-72.
145. Woo, E.Y., H. Yeh, C.S. Chu, K. Schlienger, R.G. Carroll, J.L. Riley, L.R. Kaiser, and C.H. June (2002), Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*, 168(9): 4272-6.
146. Workman, C.J., A.L. Szymczak-Workman, L.W. Collison, M.R. Pillai, and D.A. Vignali (2009), The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*, 66(16): 2603-22.
147. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao (2006), FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126(2): 375-87.
148. Yagi, H., T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii, and S. Sakaguchi (2004), Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16(11): 1643-56.
149. Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R.M. Steinman (2003), Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*, 198(2): 235-47.
150. Ye, P., F.H. Rodriguez, S. Kanaly, K.L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J.E. Shellito, G.J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J.J. Peschon, and J.K. Kolls (2001), Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, 194(4): 519-27.
151. Yu, P., R.K. Gregg, J.J. Bell, J.S. Ellis, R. Divekar, H.H. Lee, R. Jain, H. Waldner, J.C. Hardaway, M. Collins, V.K. Kuchroo, and H. Zaghoulani (2005), Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol*, 174(11): 6772-80.
152. Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K.L. Hippen, M. Brown, B.R. Blazar, S.B. Abramson, J.J. Lafaille, and M.L. Dustin, Protein Kinase C- θ Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function.

- Science, 328(5976): 372-6.
153. Zheng, S.G. (2008), The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med*, 1(3): 192-202.
 154. Zhou, G., C.G. Drake, and H.I. Levitsky (2006), Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood*, 107(2): 628-36.
 155. Ziegenhagen, M.W., M.E. Rothe, G. Zissel, and J. Muller-Quernheim (2002), Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 19(3): 185-90.
 156. Ziegenhagen, M.W., M.E. Rothe, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (2003), Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *Eur Respir J*, 21(3): 407-13.
 157. Ziegenhagen, M.W., S. Schrum, G. Zissel, P.F. Zipfel, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (1998), Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *J Investig Med*, 46(5): 223-31.
 158. Ziegenhagen, M.W., U.K. Benner, G. Zissel, P. Zabel, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (1997), Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(5): 1586-92.
 159. Zissel, G., J. Homolka, J. Schlaak, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (1996), Anti-inflammatory cytokine release by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 154(3 Pt 1): 713-9.

8 Danksagung

Meiner Doktormutter PD Dr. A. Prasse danke ich für die Überlassung des aktuellen Themas, Ihre gute Betreuung, Ihre Geduld und Ihre stets unterstützende Haltung.

Bei Herrn PD Dr. R. Marks bedanke ich mich für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Dank gilt auch dem Laborleiter PD Dr. rer. nat. G. Zissel für seine Geduld und seine Bereitschaft, sich allen Fragen mit Engagement anzunehmen.

Zudem bin ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors der Abteilung Pneumologie für die schöne und unterstützende Atmosphäre dankbar. Insbesondere möchte ich hier Niklas Lützen, Kerstin Höhne, Annette Charra hervorheben, mit denen eine intensive Zusammenarbeit, gegenseitige Unterstützung und Ermutigung sowie konstruktive Auseinandersetzung immer möglich war.

Meinen Eltern danke ich sehr für Ihr Vertrauen und Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

9 Lebenslauf

Die Seite 91 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.