Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein

Charakterisierung der immunregulatorischen Effekte der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 auf die antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vorgelegt von Heike Müller
Geboren in Trier
Jahr der Vorlage im Promotionssekretariat: 2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild

Tag der Promotion: 06.12.2013

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis III

II. Tabellenverzeichnis V

III. Abkürzungsverzeichnis VI

1. Einleitung 1
   1.1. Zytokine der Klasse II und Rezeptoren der Klasse II 1
   1.2. Das Immunsystem 11
   1.3. Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ 13
   1.4. Diabetes mellitus 17
   1.5. Ziel der Studie 19

2. Material und Methoden 20
   2.1. Chemikalien und Reagenzien 20
   2.2. Puffer und Medien 20
   2.3. Verwendete Mausstämme 20
   2.4. Genotypisierung der Mäuse 21
   2.5. Immunbiologische Methoden 23
   2.6. Induktion der DTH der Haut gegen das Antigen Ova 24
   2.7. Bestimmung der Blutglukosekonzentration 25
   2.8. Isolation, Aufreinigung und Kultivierung primärer Zellen 25
   2.9. Nachweis antigenspezifischer CD8-T-Zellen 28
   2.10. RNA-Isolation, reverse Transkription und Real-time PCR 29
   2.11. Software und Statistik 31

3. Ergebnisse 32
   3.1. Charakteristika der IL20R2-*Knockout*-Maus 32
   3.2. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die Induktion der CD8-T-Zellen 32
   3.3. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die T-Zell-gesteuerte Immunantwort im Mausmodell der DTH gegen Ova 37
   3.4. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die T-Zell-gesteuerte Immunreaktion im Mausmodell des Diabetes mellitus Typ I 57

4. Diskussion.....63
4.1. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale auf die Induktion von antigenspezifischen CD8-T-Zellen nach Ova-Vakzinierung.....63
4.2. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale im funktionellen Mausmodell der DTH und des EAD.....64
4.3. Korrelation zwischen antigenspezifischer CD8-T-Zell-Antwort und der funktionellen Antwort im DTH-Modell.....67
4.4. IL20R2-vermittelte Immunmodulation der CD8-T-Zellen 72

5. Zusammenfassung.....75

A. Anhang.....92

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gencluster und dreidimensionale Struktur der IL-20-Familie. 2
Abb. 2: Schematische Darstellung der IL20R2-Rezeptorfamilie und ihrer Liganden. 5
Abb. 3: Produzenten und Zielzellen der IL-10-Familie. 7
Abb. 4: Schematische Darstellung der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ. 15
Abb. 5: Schema der DTH-Induktion. 25
Abb. 6: Antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit pCI/Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen. 34
Abb. 7: Antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort nach Protein-Immunisierung in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp-Mäus*en. 36
Abb. 8: Ohrschwellung nach Injektion unterschiedlicher Ova-Konzentrationen ins Ohr. 38
Abb. 9: DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach pCI/Ova-Immunisierung. 39
Abb. 10: DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach pCI/Ova-Immunisierung. 40
Abb. 11: DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung. 42
Abb. 12: Einfluss der Adjuvanzien auf die Entwicklung der DTH. 43
Abb. 13: DTH gegen Ova in RAG1$^{-/-}$-Mäusen. 45
Abb. 14: DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung mit K^b/Ova$_{257-264}$/ODN1826/IFA. 46
Abb. 15: DTH gegen Ova nach CD8-T-Zell-Depletion. 48
Abb. 16: DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung. 49
Abb. 17: Genexpression der Zytokine der IL-10-Familie während der DTH. 51
Abb. 18: DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-transgenen Mäusen. 53
Abb. 19: DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach adoptiven Transfer *in vitro*-stimulierter oder naiver Ova-spezifischer CD8-T-Zellen aus IL20R2$^{-/-}$/OT-I- oder OT-I-transgenen Mäusen. 56
Abb. 20: Diabetes-Induktion in IL20R2$^{-/-}$/RIP-B7.1- und RIP-B7.1-Mäusen nach Immunisierung mit pCI/ppins$_{N110A}$ 58

Abb. 21: Einfluss der IL20R2-Signale auf das OT-I-basierte adoptive Transfermodell naiver CD8-T-Zellen in RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Mäusen. ..59
Abb. 22: Einfluss der IL20R2-Signale auf das adoptive Transfermodell ppins-*geprimter* CD8-T-Zellen in RIP-B7.1-Mäusen. 61

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Rezeptoren der Klasse II und ihre Liganden 4
Tab. 2: Mausstämme 20
Tab. 3: Liste der für die Genotypisierung verwendeten Primer 21
Tab. 4: PCR-Protokoll zur Genotypisierung der Mäuse 22
Tab. 5: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper 23
Tab. 6: Liste der zur Immunisierung verwendeten Plasmide 23
Tab. 7: Liste der Adjuvanzien 24
Tab. 8: Liste der synthetischen Peptide 27
Tab. 9: PCR-Protokoll der β-Actin-PCR 30
Tab. 10: Primersequenzen für die Real-time PCR-Analysen 30
Tab. 11: Protokoll der Real-time PCR 31

III. Abkürzungsverzeichnis

III.a Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle (*antigen-presenting cell)*
B6	C57BL/6JRj Maus
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungscluster *(cluster of differentiation)*
CFA	komplettes Freunds Adjuvans
CFS	koloniestimulierende Faktoren (*colony-stimulating factor*)
CHS	Kontakthypersensitivitätsreaktion (*contact hypersensitivity reaction)*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligonukleotid
DC	dendritische Zelle (*dendritic cell*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DNTB	Dinitrothiocyanobenzol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
DTH	Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (*delayed type hypersensitivity*)
EAD	experimenteller Autoimmundiabetes
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FACS	Fluoreszenz-vermittelte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)
HEL	Hühnereiweiß-Lysozym
i.d.	intradermal
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IFA	inkomplettes Freunds Adjuvans
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
Kat.-Nr.	Katalognummer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinozytenwachstumsfaktor (*keratinocyte growth factor*)

l	Liter
LC	Langerhans-Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
µ	Mikro
M	Molar
MACS	magnetisch-vermittelte Zellsortierung (magnetic activated cell sorting)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (*major hisocompatibility complex*)
Min.	Minuten
n	nano
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NPC	nicht-parenchymale Leberzellen
ODN	unmethyliertes Oligonukleotid
Ova	Ovalbumin
p	piko
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*)
pAPC	professionelle antigenpräsentierende Zelle
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell)*
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphat-buffered saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
ppins	Präproinsulin
Priming	primäre Aktivierung von antigenspezifischen naiven Lymphozyten
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
R1	Rezeptorkette 1
R2	Rezeptorkette 2
RIP	Ratten-Insulinpromotor *(rat insulin promotor)*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
Sek.	Sekunden
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphism*)
SOCS	*suppressor of cytokine signaling*
SRBC	Schafserythrozyten
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
Std. (h)	Stunden
Tab.	Tabelle

TCR	T-Zell-Rezeptor
Temp.	Temperatur
TF	Gewebefaktor (*tissue factor*)
tg	transgen
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (*toll-like receptor*)
TNCB	Trinitrochlorbenzol
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (in Prozent)
w/v	Gewicht pro Volumen (in Prozent)
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)

III.b Abkürzungen der Nukleotide

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

III.c Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Zytokine der Klasse II und Rezeptoren der Klasse II

1.1.1. Mitglieder der Zytokine der Klasse II

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen (~25 kDa), die meist auf einen Stimulus hin, von den unterschiedlichsten Zellen des Körpers gebildet und sezerniert werden. Meist wirken sie regulatorisch auf entzündliche Prozesse. Zu den Zytokinen zählen Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Chemokine [83].

Die Interleukine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26 wurden um das Jahr 2000, aufgrund von Datenbankanalysen, hinsichtlich ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu dem Zytokin IL-10 identifiziert. Diese Gruppe wurde als IL-10-Familie bezeichnet und den Zytokinen der Klasse II zugeordnet [13, 29, 36, 52, 59]. Die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 weisen Gemeinsamkeiten bezüglich der Genloci, Intron-Exon-Struktur, Sekundärstruktur, Rezeptorbindung und Signalkaskadewege auf. Daher bilden diese Zytokine eine Subfamilie innerhalb der IL-10-Familie, die als IL-20-Familie bezeichnet wird. Die Zytokine der Klasse II umfassen außerdem die Gruppe der Interferone des Typ I, das IFN-α, -β, -ε, -κ und -ω, der alleinige Vertreter des Typ II, das IFN-γ und Interferone des Typ III, das IL-28A (IFN-λ2), IL-28B (IFN-λ3) und IL-29 (IFN-λ1) [104]. Daneben wurden vier virale Homologe des Zytokins IL-10 [33, 49, 63, 111] und ein virales Homolog des Zytokins IL-24 [9] identifiziert.

1.1.1.1. Genloci, Genexpression und Proteinstruktur

Die Gene, die die Information zur Bildung der Zytokine der Klasse II enthalten, sind im menschlichen Genom und Mausgenom auf vier Chromosomen lokalisiert. Dort bilden sie je ein Gencluster aus. Der Genabschnitt, der für IL-19, IL-20 und IL-24 kodiert, befindet sich zusammen mit IL-10 auf dem Chromosom 1q32 [13] (Abb. 1A). Die weiteren Gencluster sind auf Chromosom 12q15 (kodiert für IL-22, IL-26 und IFN-γ), Chromosom 19q13 (kodiert für IL-28A, IL-28B und IL-29) und Chromosom 9p22 (kodiert für die Interferone IFN-α, IFN-β, IFN-κ und IFN-ω) lokalisiert [107, 116]. Das Genom von Mensch, Huhn, Fisch und Frosch weist eine Sequenz für IL-26 auf. Dieses konnte bisher nicht in Mäusen identifiziert werden [116].

Die Transkripte der IL-20-Familie zeigen eine ähnliche Exon-Intron-Struktur. Die IL-19- und IL-20-Transkripte bestehen wie das IL-10-Transkript aus fünf Protein-kodierenden Exons, während das IL-24-Transkript sechs Exons aufweist. Die 3'UTR der IL-20-mRNA weist sieben AUUUA-Motive auf, die für eine schnelle Degradation der mRNA verantwortlich sind. In der mRNA des IL-24 wurden drei und in der mRNA des IL-19 nur ein AUUUA-Motiv identifiziert [13, 84, 114].

Für die IL-19-mRNA sind zwei Spleißvarianten bekannt. Ausgebildet wird eine kürzere Form (Exon II-VIII), die die Hauptform darstellt und eine längere Form (Exon I, IV-VIII). Die beiden Formen unterscheiden sich in der Länge des Signalpeptids, dessen Einfluss auf die Sekretion aber noch nicht geklärt ist. Die Hauptform kodiert für ein Protein von 177 Aminosäuren, die längere Form umfasst 215 Aminosäuren [75, 114]. Das Gen des IL-20 kodiert für ein Protein von 176 Aminosäuren [114]. IL-24 bildet mehrere Formen aus. Die Hauptform kodiert für ein Protein von 206 Aminosäuren [2, 116].

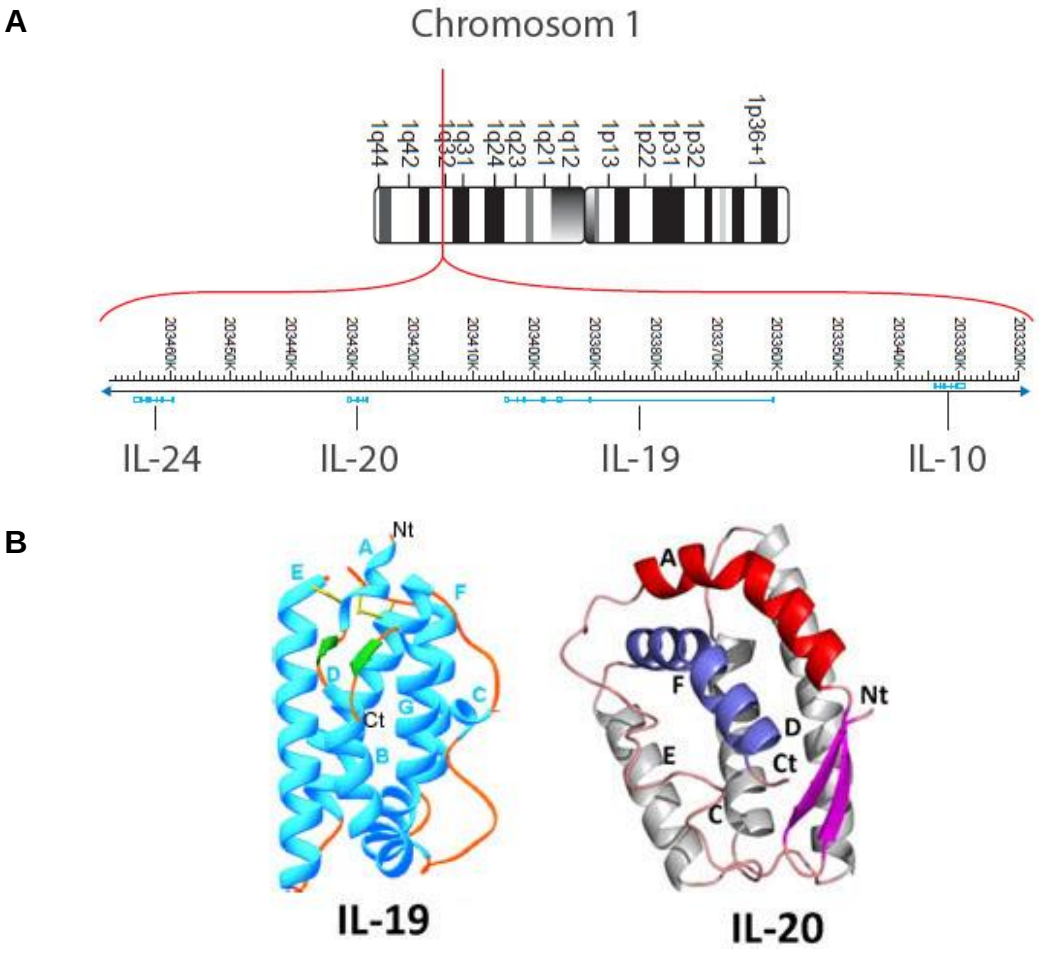


Abb. 1: **Gencluster und dreidimensionale Struktur der IL-20-Familie.** A) Die Gene, die für die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 kodieren, befinden sich zusammen mit IL-10 auf dem

Chromosom 1q32. Modifiziert nach Sabat et al., 2007 [116]. B) IL-19 (links) besteht aus sieben α-Helices (blau), die antiparallel angeordnet sind. Helix A und B sind mit einer β-Faltblattstruktur (grün) verbunden. Eine weitere β-Faltblattstruktur, die sich am C-Terminus befindet, liegt dieser direkt gegenüber. Diese Struktur stellt eine Besonderheit für helikale Zytokine dar. Durch die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren und Cysteine bilden die α-Helices in ihrem Inneren einen hydrophoben Kern. Die Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Modifiziert nach Zdanov, 2010 [150]. IL-20 (rechts) weist eine ähnliche α-helikale Struktur wie IL-19 auf. Am N-Terminus (magenta) des IL-20 befindet sich eine β-Haarnadelstruktur, die sich von der Struktur des Zytokins IL-19 unterscheidet. Die Helix A ist in rot und Helix F in blau dargestellt. Modifiziert nach Logsdon et al., 2012 [81]. A-, B-, C-, D-, E-, F, G-α-Helix Ct: C-Terminus, IL: Interleukin, Nt: N-Terminus.

Die Zytokine der IL-10-Familie weisen in der Primärstruktur kaum Gemeinsamkeiten (15-40 %) auf [32, 114]. Die Proteine zeigen aber Übereinstimmungen in der Position hydrophober Reste und konservierter Cysteine. Diese sind an der Ausbildung der Sekundärstruktur beteiligt [19, 32, 116]. Daraus ergibt sich bei allen Zytokinen der IL-10-Familie eine ähnliche Sekundärstruktur, bestehend aus sechs bis sieben α-Helices, die von A bis G bezeichnet werden [116, 149]. Die dreidimensionale Struktur von IL-20 wurde erst im Jahr 2012 untersucht [81], die des IL-19 wurde bereits im Jahr 2003 identifiziert [19] (Abb. 1B). Während IL-10 als Dimer vorliegt, handelt es sich bei den Zytokinen der IL-20-Familie um Monomere [150]. Die IL-20-Familie ist hoch konserviert. So zeigen IL-19 oder IL-20 von Mensch und Maus eine Übereinstimmung von über 70 % und IL-24 von Mensch und Ratte eine Übereinstimmung von 78 % in der Aminosäuresequenz auf [13, 17, 75].

1.1.2. Rezeptoren der Klasse II

Die Zytokine der Klasse II entfalten ihre Aktivität, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Die Rezeptoren der Klasse II umfassen zwölf Mitglieder und sind klassische Transmembranproteine. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Fibronektineinheiten vom Typ III, die aus zwei antiparallelen β-Faltblattstrukturen mit je sieben β-Strängen besteht. Eine Ausnahme stellt der IFNAR1 mit vier Fibronektineinheiten dar. Die extrazelluläre Domäne ist weitgehend konserviert und besteht aus ~210 Aminosäuren [81, 100, 107, 150]. Im Gegensatz zur extrazellulären Domäne variiert die intrazelluläre Domäne in ihrer Länge und zeigt keine Sequenzübereinstimmungen [66]. Ein funktionsfähiger Rezeptor besteht aus zwei unterschiedlichen Rezeptorketten (Heterodimer). Die

längere Einheit wird als Rezeptorkette 1 (R1) und die kürzere Einheit als Rezeptorkette 2 (R2) bezeichnet. Eine Ausnahme zu den heterodimeren Transmembranproteinen bildet der Gewebefaktor (TF), mit nur einer Rezeptoruntereinheit und das IL-22-*binding protein* (IL22BP), als löslicher Faktor [107]. Die in Tab. 1 aufgeführten Paarungen der R1- und R2-Kette bilden einen funktionellen Rezeptor. Weitere Rezeptorkombinationen aus den genannten Rezeptoruntereinheiten sowie Homodimere konnten nicht bestätigt werden [28, 81]. Ein Charakteristikum der Rezeptoren der Klasse II ist, dass eine Rezeptorkette in mehreren Komplexen verwendet wird. Des Weiteren können sich mehrere Liganden einen Rezeptorkomplex teilen. Ein Ligand wiederum kann an verschiedene funktionelle Rezeptorkomplexe binden [107].

Tab. 1: **Rezeptoren der Klasse II und ihre Liganden**

R1	R2	Ligand	Quelle
IL10R1	IL10R2	IL-10	[62]
IL20R1	IL20R2	IL-19, IL-20, IL-24	[13, 28, 139]
IL22R1	IL20R2	IL-20, IL-24	[28, 102, 139]
IL22R1	IL10R2	IL-22	[61, 145]
IL20R1	IL10R2	IL-26	[126]
IL28R1	IL10R2	IL-28A, IL-28B, IL-29	[104]
IFNAR1	IFNAR2	IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω	[104]
IFNGR1	IFNGR2	IFN-γ	[104]
IL-22BP		IL-22	[108]
TF		FVIIa	[108]

grau: IL20R2-Rezeptorfamilie, BP: *binding protein*, IL: Interleukin, TF: *tissue factor*, R1: Rezeptorkette 1, R2: Rezeptorkette 2

1.1.2.1. IL20R2-Rezeptorfamilie

Angelehnt an die Nomenklatur des IL-10-Rezeptors (IL10R1/IL10R2) wurden die Rezeptoren der IL-20-Familie als IL20R1, IL22R1 und IL20R2 bezeichnet. Die Rezeptorkette IL20R2 kann mit zwei unterschiedlichen R1-Ketten, dem IL20R1 oder dem IL22R1, einen Komplex eingehen. Diese werden unter der Bezeichnung IL20R2-Rezeptorfamilie zusammengefasst. Die Liganden IL-19, IL-20 und IL-24 binden an den IL20R1/IL20R2-Rezeptorkomplex (Typ I). IL-20 und IL-24, nicht aber IL-19, können zudem an den Komplex IL22R1/IL20R2 (Typ II) binden (Abb. 2) [13, 28, 102, 139].

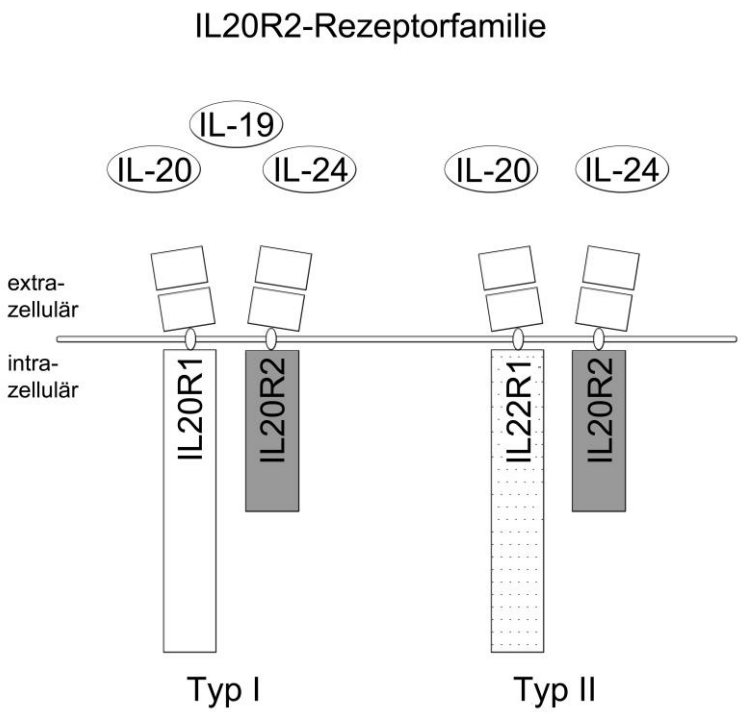


Abb. 2: **Schematische Darstellung der IL20R2-Rezeptorfamilie und ihrer Liganden.** Die Liganden IL-19, IL-20 und IL-24 sind oberhalb ihrer korrespondierenden Rezeptorkomplexe abgebildet. Dargestellt ist die extrazelluläre Domäne (zwei Fibronektineinheiten vom Typ III), transmembrane Domäne und die intrazelluläre Einheit des Rezeptors. Ein funktionsfähiger Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, einer längeren R1-Kette und einer kürzeren R2-Kette. Die IL20R2-Kette liegt in beiden Rezeptorkomplexen vor und bildet mit der IL20R1-Kette den Rezeptorkomplex Typ I und mit der IL22R1-Kette den Rezeptorkomplex Typ II. Des Weiteren können mehrere Liganden an einen Rezeptorkomplex binden. Zudem kann ein Ligand an verschiedene Rezeptorkomplexe binden. IL: Interleukin, R1: Rezeptorkette 1, R2: Rezeptorkette 2

1.1.2.2. Rezeptorbindung und Signalweiterleitung

Die Bindung Ligand:R2:R1 erfolgt bei den Zytokinen IL-19, IL-20 und IL-24 im Verhältnis 1:1:1, wobei der Ligand zuerst an die R2-Kette, dann die R1-Kette bindet [81, 105]. Dem gegenüber steht das Bindungsverhalten der Zytokine IL-10, IL-22, IL-26 und IFN-γ. Diese binden zuerst an die R1-Kette, dann die R2-Kette [53, 81, 103, 126]. Die Zytokine der IL-20-Familie können nach Bindung an einen funktionellen Rezeptor den Januskinase/*signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT)-Signalweg aktivieren. Bisher wurde *in vitro* eine Aktivierung von STAT3 und bei hohen Zytokinkonzentrationen eine Aktivierung von STAT1 nachgewiesen [102]. Zudem konnte STAT3 in einer humanen Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT-Zellen) [13, 37, 66] und STAT5 in einer humanen fetalen Keratinozyten-Zelllinie (KERTr) [134] gezeigt werden. Die STAT-Dimere

migrieren in den Zellkern und binden dort direkt an STAT-Bindungselemente verschiedener Promotoren wie z.B. der *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Familie [65, 114, 131]. In humaner Epidermis sind zahlreiche weitere Gene bekannt, die durch die Zytokine der IL-20-Familie induziert werden, wie Chemokine, S100-Familie, β-Defensine, Serinproteasen, Keratine, epidermale Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren [113]. Für die Zytokine der IL-20-Familie wurde auch eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs gezeigt [89, 96, 100]. So induzierte IL-20 die Aktivierung des Erk1/2-Signalwegs in einer Endothelzelllinie [134] oder in *rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* (RASF) [50]. Ein bisher unbekannter Signalweg wird in OVCAR-3-Zellen (humane Ovarialkarzinom-Zellline) über den IL20R1/IL20R2 nach Stimulation mit IL-19 und IL-24 aktiviert, aber nicht mit IL-20 [102].

1.1.3. Expression der Zytokine der IL-20-Familie und der IL20R2-Rezeptorfamilie

Eine schematische Darstellung der Produzenten und Zielzellen der Zytokine ist in Abb. 3 dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert.

Expression der Zytokine der IL-20-Familie in Immunzellen: IL-10 wird von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert. Hingegen ist die Expression der Zytokine der IL-20-Familie auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt. IL-19, IL-20 und IL-24 werden von Monozyten exprimiert [17, 36, 92, 143]. Während der Reifung der Monozyten zu Makrophagen oder DC wird die Expression des Zytokins IL-19 herabgesetzt. IL-20 wird in reifen DC exprimiert, nicht aber in Makrophagen. IL-24 konnte in beiden Zellen nicht nachgewiesen werden [144]. B-Zellen exprimieren das Zytokin IL-19 in geringen Mengen [143]. IL-24 wird, wie die Zytokine IL-22 und IL-26, von aktivierten T-Zellen gebildet [17, 92, 143, 144]. Dabei wird IL-24 von der T-Helferzelle 2 (Th2) und IL-22 und IL-26 von der T-Helferzelle 1 (Th1) exprimiert [122, 143]. Zudem exprimieren aktivierte Immunzellen vermehrt die Zytokine der IL-20-Familie [92, 143, 144].

Expression der Zytokine der IL-20-Familie in Gewebszellen: Die Zytokine der IL-20-Familie werden im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der IL-10-Familie auch in Gewebszellen gebildet. IL-19, IL-20 und IL-24 werden in Zellkulturlinien des Kolons und Brustgewebes exprimiert. IL-19 wird zudem in Zellkulturlinien des

Pankreas und der Prostata, IL-24 in Hautzellen und IL-20 in Zellkulturlinien der Haut, Lunge, Zunge und Ösophagus exprimiert [47, 92]. In einer *Mikroarray*-Analyse von Geweben wurde IL-20 in Epithelzellen der Haut und Lunge sowie in Endothelzellen des Gastrointestinaltrakts, des Urogenitaltrakts, der Leber und der Niere vorgefunden [47]. Eine Analyse der Haut hat ergeben, dass Keratinozyten die Hauptproduzenten der Zytokine der IL-20-Familie sind [66]. Zudem werden die Zytokine der IL-20-Familie unter stimulierenden Bedingungen bzw. in inflammatorischem Gewebe sekretiert. In Keratinozyten wird IL-19, IL-20 und IL-24 unter stimulierenden (IFN-γ, IL-4 oder IL-1β) Bedingungen und IL-20 und IL-24 zudem unter nicht-stimulierenden Bedingungen gebildet [66]. Manche Organe und Gewebe regulieren die Expression der Zytokine nach Stimulation herauf wie die Leber (IL-19), die Milz (IL-19, IL-24) [140] oder die humane Amnion-Chorion-Membran (IL-19, IL-20) [88]. Außerdem wurde in erkrankter Haut der Psoriasis [112] und der atopischen Dermatitis erhöhte Werte der Zytokine der IL-20-Familie nachgewiesen [66].

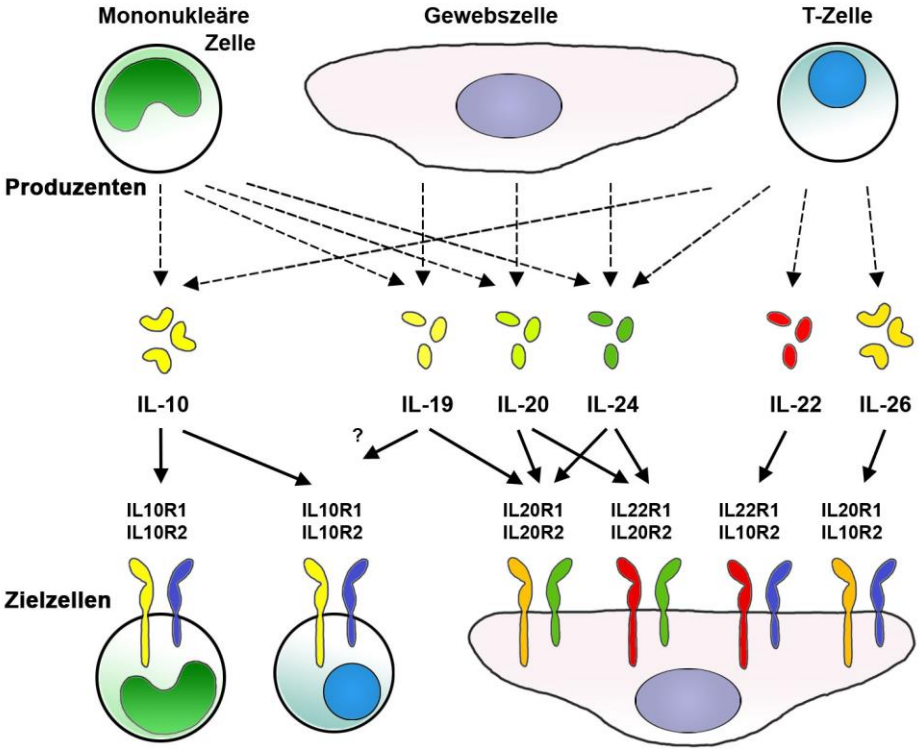


Abb. 3: **Produzenten und Zielzellen der IL-10-Familie.** Produzenten der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 sind Immunzellen und Gewebszellen. Die Zytokine IL-10, IL-22 und IL-26 hingegen werden ausschließlich von Immunzellen exprimiert. Die korrespondierenden Rezeptorketten der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 sowie der Zytokine IL-22 und IL-26 wurden bisher nur auf Gewebszellen identifiziert. Die Zielzellen des IL-10 sind Immunzellen. Modifiziert nach Sabat, 2010 [114]. IL: Interleukin, R1: Rezeptorkette 1, R2: Rezeptorkette 2

Expression der IL-20-Rezeptorfamilie in Immunzellen: Die Zielzellen der Zytokine der IL-20-Familie wurden identifiziert, indem Zellen oder Gewebe auf die Genexpression von funktionellen Rezeptoren untersucht wurden [143]. Die Genexpression der IL20R2-Kette ist in Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, DC, T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen nachgewiesen, allerdings nur in geringer Konzentration. Die Expression der korrespondierenden R1-Ketten (IL20R1, IL22R1) wurde dort nicht belegt. Der für IL-10 funktionelle Rezeptor IL10R1/IL10R2 bilden hingegen alle Immunzellen aus [66, 92, 143, 144].

Expression der IL-20-Rezeptorfamilie in Gewebszellen: Die Rezeptorkette IL20R1 wird in zahlreichen Organen und Geweben exprimiert, während die Expression der Rezeptorketten IL22R1 und IL20R2 begrenzt ist. Eine Koexpression der Rezeptorkomplexe IL20R1/IL20R2 (Typ I) und IL22R1/IL20R2 (Typ II) wurde bisher nur in wenigen Organen identifiziert. Die Haut und die Lunge weisen eine Expression aller drei Rezeptorketten (IL20R1, IL22R1, IL20R2) auf und bilden beide Rezeptortypen (Typ I und II) aus [13, 92, 102, 140, 143]. In der Haut wurden Keratinozyten als die Zellen identifiziert über die die Zytokine der IL-20-Familie ihre Aktivität entfalten [13, 66, 102]. Außerdem werden die Rezeptorketten IL20R1 und IL20R2 in verschiedenen Drüsen und reproduktiven Organen wie Ovar, Plazenta und Testis exprimiert [102, 114, 140].

1.1.4. Funktion der Zytokine der IL-20-Familie

1.1.4.1. Einfluss der IL-20-Familie auf Immunzellen

Bisher gibt es keine Hinweise, dass die Zytokine der IL-20-Familie direkt an Immunzellen binden können (fehlender Nachweis eines funktionellen Rezeptors und der STAT3-Aktivierung) [66, 92, 143, 144]. Dennoch konnten mehrere Arbeitsgruppen einen Einfluss der Zytokine der IL-20-Familie auf T-Zellen und Monozyten belegen. IL-19 und IL-20 spielen eine Rolle bei der Polarisierung der CD4-T-Zellen Richtung Th2, sodass vermehrt Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 ausgeschüttet werden [37, 74, 98]. Zudem weist das ausgebildete Zytokinprofil von *in vitro*-aktivierten (anti-CD3/anti-CD28) CD4-T-Zellen aus *Wildtyp*-Mäusen, im Vergleich zu CD4-T-Zellen aus IL20R2$^{-/-}$-Mäusen, eine Th2-Polarisierung der CD4-T-Zellen auf. Die Zytokine der IL-20-Familie beeinflussen auch CD8-T-Zellen. So konnte eine vermehrte Produktion von IFN-γ und IL-2 in IL20R2-defizienten

CD8-T-Zellen nach der *In-vitro*-Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 im Vergleich zu CD8-T-Zellen aus *Wildtyp*-Mäusen nachgewiesen werden [137]. Weiteren Arbeitsgruppen gelang es, durch Stimulation mit IL-19, die Induktion des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) in CD8-T-Zellen nachzuweisen [72, 141]. Des Weiteren induziert IL-19 die Expression von IL-6 und TNF-α in Monozyten aus murinen Milzzellen [75]. In Monozyten aus humanen PBMC, konnte nach Stimulation mit IL-19 eine Erhöhung von IL-10 festgestellt werden [54]. Zudem bildeten Makrophagen von IL-19$^{-/-}$-Mäusen, nach der Stimulation mit LPS, eine signifikant höhere TNF-α-, IL-12-, IL-6- und IL-1β-Expression im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen aus. DC aus IL-19$^{-/-}$-Mäusen zeigten dagegen kein verändertes Zytokinprofil [5]. IL-24 induziert in PBMC die Sekretion von IL-6, TNF-α und IFN-γ. Die Sekretion dieser Zytokine wird von IL-10 inhibiert, was auf eine antagonistische Wirkung der beiden Zytokine hindeutet [17, 139].

Trotz der in Punkt 1.1.1.1 bis 1.1.3 erwähnten Gemeinsamkeiten ist die Aufgabe der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 in der Regulation von Immunreaktionen unklar. So ist bisher nicht bekannt, ob die Zytokine redundante oder gegensätzliche Aufgaben ausüben oder deren Funktion in der Regulation der Immunantwort wie eine antiinflammatorische oder proinflammatorische Wirkung.

1.1.4.2. Zytokine der IL-20-Familie in inflammatorischen Erkrankungen

Die Zytokine der IL-20-Familie wurden bei zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis, Asthma, Diabetes mellitus Typ I [8, 148], chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis [50, 64, 118], atrophische Arthritis, vaskuläre Erkrankungen [20, 35] und Urämie [48] beschrieben. Manche Autoren weisen IL-19 v.a. Funktionen in der Immunregulation zu, IL-20 in der Haut und IL-24 in der Suppression bzw. Apoptose von Tumorzellen. An dieser Stelle sollen Beispiele dargestellt werden.

Die meisten Daten liegen bisher im Zusammenhang mit Psoriasis vor, einer Erkrankung der Haut mit silbriger Abschuppung der Hautzellen. Histologisch ist eine Hyperproliferation der Keratinozyten zu beobachten. Die Pathogenese der Psoriasis ist unklar, dennoch gilt die Erkrankung als T-Zell-abhängige (Th1) Erkrankung [94, 95]. Immunzellinfiltrate sowie ein verändertes Zytokinprofil (erhöhte Expression der Zytokine IL-6, IL-8, IL-12, TNF, IFN-γ) wurden in psoriatischen Plaques nachgewiesen [115, 123]. Die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-

24 sowie die Rezeptorketten IL20R1, IL22R1 und IL20R2 sind in psoriatischen Plaques vermehrt vorzufinden. Kontrollpersonen sowie nicht-betroffene Haut von Psoriasispatienten zeigten keine Expression der Zytokine und eine geringere Expression der Rezeptorketten in der Haut [13, 66, 72, 112, 141]. Das Serum von Psoriasispatienten weist gegenüber Kontrollpersonen eine geringere Konzentration an IL-19 und IL-20 auf [72, 141]. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) des IL-19-, IL-20- und IL-24-Gens sind mit einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber Psoriasis assoziiert [66]. IL-20-, IL-24- und IL-22-transgene (tg) Mäuse, die durch eine Überexpression des Zytokins gekennzeichnet sind, zeigen Hautveränderungen (Keratinozytenproliferation) ähnlich der Psoriasis und sterben neonatal [13, 44, 79, 142]. Bei IL-19- und IL20R2-*Knockout*-Mäusen konnten keine pathologischen Veränderungen oder Symptome beobachtet werden [5, 137].

Der Pathologie von Asthma wird eine erhöhte Expression von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-13) zugeschrieben. Bei Asthmapatienten korreliert das Th2-Zytokinprofil mit der erhöhten IL-19-Konzentration im Serum. Die Mäuse, denen IL-19-Plasmid-DNA injiziert wurde, wiesen ebenfalls eine Erhöhung des Th2-Zytokinprofils auf. Zudem zeigten aktivierte CD4-T-Zellen nach der *In-vitro*-Stimulation mit IL-19 eine erhöhte Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 gegenüber nicht-stimulierten Zellen. Ferner wurde in einem Mausmodell für Asthma vermehrt IL-19-mRNA nach dem Allergenkontakt in der Lunge und im Serum von BALB/c Mäusen gemessen [74]. In bronchialen Epithelzellen konnte IL-19 nachgewiesen werden [151]. IL-19 ist vermutlich auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und Morbus Crohn beteiligt. IL-19$^{-/-}$-Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)-induzierter Kolitis. Dies korreliert mit der Akkumulation von Makrophagen und einer erhöhten Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-6, TNF-α sowie mit IL-12 und KC [5]. Des Weiteren wird IL-24 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben [3].

IL-24 wurde zuerst in humanen Melanozyten (Zellkultur) nach Stimulation mit IFN-β und dem Proteinkinase-C-Aktivator Mezerein identifiziert. IL-24 hemmt die Proliferation von Melanozyten und weiterer Tumorzellen [26, 52, 128]. Das Zytokin könnte daher eine Rolle in der Tumorsuppression spielen.

1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus vor Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten zu schützen. Dieses körpereigene Abwehrsystem kann in zwei Komponenten eingeteilt werden: die unspezifische Immunantwort (angeborenes Immunsystem) und das adaptive Immunsystem (erworbene Immunantwort). Zu der unspezifischen Abwehr zählen neben den physiologischen Barrieren wie der Haut auch zelluläre Bestandteile wie Monozyten, Makrophagen, DC, NK-Zellen, Granulozyten und Mastzellen. Die humoralen Komponenten bestehen aus dem Komplementsystem, den Akute-Phase-Proteinen, dem Lysozym und den Zytokinen. Das adaptive Immunsystem besteht aus Zellen, die spezifisch bestimmte Antigene erkennen. Dazu gehören die T-Zellen und B-Zellen. Die Antikörper der B-Zellen stellen die humorale Ebene der adaptiven Immunantwort dar. Das unspezifische und adaptive Immunsystem wirken bei einer Entzündungsreaktion zusammen, wobei das Erste dem adaptiven Immunsystem vorausgeht [90, 101].

1.2.1. Antigenaufnahme und Antigenpräsentation

Antigenpräsentierende Zellen (APC) nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren diese auf ihrer Oberfläche. Zu den professionellen APC (pAPC) gehören B-Zellen, Makrophagen und DC [90]. Extrazelluläre Antigene können über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-II präsentiert werden und CD4-T-Zellen aktivieren. Aber auch eine Kreuzpräsentation der extrazellulären Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8-T-Zellen ist möglich. Intrazelluläre Antigene wie Viren werden den T-Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert [24, 90, 120, 121].

1.2.2. T-Zellaktivierung

T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und stellen die zellvermittelte Immunantwort bei der Bekämpfung von Pathogenen dar. Nach ihrer Entwicklung im Thymus werden zwei Hauptklassen unterschieden: T-Zellen, die das Korezeptorprotein CD4 und T-Zellen, die das Protein CD8 tragen [90].

Zur Aktivierung der T-Zellen werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal stellt die Bindung zwischen antigenspezifischem T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der

Oberfläche der T-Zellen und dem peptidbeladenen MHC-Molekül der APC dar. CD4-T-Zellen binden an MHC-Klasse-II-Moleküle, während CD8-T-Zellen an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. Das zweite Signal zur Aktivierung der T-Zellen ist der kostimulierende Rezeptor der T-Zellen. Besonders gut untersucht ist der Oberflächenrezeptor CD28. Dieser bindet an die kostimulierenden Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86), die von pAPC exprimiert werden. Die aktive Form der T-Zellen wird als T-Effektorzelle bezeichnet [10, 39, 90].

1.2.3. Erkennung von Pathogenen durch TLR

Die Zellen der unspezifischen und adaptiven Immunantwort exprimieren TLR. Aber auch Nicht-Immunzellen, wie Epithelzellen, Keratinozyten, Myozyten, Fibroblasten und Astrozyten können TLR ausbilden [86, 99]. Keratinozyten exprimieren den TLR1-6 und 9 [93]. Von den bisher dreizehn identifizierten TLR werden die TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 auf der Zelloberfläche exprimiert. Die TLR3, 7, 8, 9, 11 und 13 befinden sich endosomal und sind an der Erkennung von DNA-Sequenzen beteiligt [99]. Die TLR erkennen konservierte mikrobielle Strukturen, die pathogenassoziierten molekularen Muster (PAMP). Bei den PAMP handelt es sich um verschiedene Merkmale der Pathogene, die sich von körpereigenen Zellen unterscheiden wie Lipopolysaccharid (LPS), das in der Zellmembran gramnegativer Bakterien enthalten ist (bindet an TLR4) oder unmethylierte CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-Oligonukleotide (binden an TLR9) [86, 90, 99]. Bindet ein PAMP an einen TLR, wird die Zelle über Signalkaskaden zur Produktion von Immunmediatoren wie proinflammatorischer Zytokine (IFN-α, IFN-β, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12) angeregt, welche eine Entzündungsreaktion begünstigen. Bei den TLR sind zwei Signalkaskadewege bekannt. TLR1-2 und TLR5-13 signalisieren über den MyD88-Signalweg und aktivieren Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, AP-1 und IRF1, 5 und 7. Der TLR3 verwendet den TRIF-Signalweg und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie IRF3 und NF-κB. Der TLR4 kann beide Signalkaskadewege aktivieren [86, 90, 99].

1.2.4. Autoimmunität

Eine Autoimmunität entsteht, wenn körpereigene Stoffe vom Immunsystem als körperfremd angesehen werden. Diese körpereigenen Stoffe aktivieren das Immunsystem und führen zu einer Zerstörung des betroffenen Gewebes [27, 42].

Eine Selbst-Fremd-Erkennung findet während der Reifung der T-Zellen im Thymus durch positive und negative Selektion statt (zentrale Toleranz). Zudem ermöglicht die periphere Toleranz durch Deletion, Anergie oder Suppression von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eine Zerstörung oder Inaktivierung der autoreaktiven T-Zellen [40, 135]. Obwohl den CD8-T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Initiation, Progression und Regulation der Autoimmunität zugeschrieben wird, beruht diese nach heutigen Erkenntnissen auf einem multifaktoriellen Geschehen an der verschiedene Zellpopulationen wie T-Zellen, B-Zellen $T_{reg,}$ Suppressorzellen, NK-Zellen, natürliche Killer-T-Zellen (NKT)-Zellen und Zytokine sowie Umwelt- und genetische Faktoren beteiligt sind [14, 109, 133, 138].

1.2.5. TCR-transgene Mäuse

B6-OT-I-Mäuse besitzen einen tg TCR, der das Epitop 257-264 des Ovalbumins ($Ova_{257-264}$) auf MHC-Klasse-I-Molekülen vom Haplotyp $H\text{-}2K^b$ erkennt. Dieser TCR wird auf CD8-T-Zellen exprimiert [22, 46]. B6-OT-II-Mäuse dagegen besitzen einen tg TCR, der das Epitop 323-339 des Ovalbumins ($Ova_{323-339}$) auf MHC-Klasse-II-Molekülen vom Haplotyp $H\text{-}2IA^b$ erkennt. Dieser TCR wird auf CD4-T-Zellen exprimiert. [7, 110]. Die Genrekombination zur Herstellung von TCR anderer Spezifität ist weitgehend verhindert. Das Verhältnis der T-Zellen verschiebt sich zugunsten des tg Rezeptors, d.h. bei OT-I-Mäusen bilden >90% der CD8-T-Zellen den tg Rezeptor aus. Der restliche Anteil fällt den CD8-T-Zellen mit einem TCR anderer Spezifität und CD4-T-Zellen zu. Da die TCR eine bekannte Spezifität besitzen, ist eine antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen möglich.

1.3. Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ

Unter Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ werden Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell, 1963 zusammengefasst. Im Gegensatz zum Typ I-III, welche Antikörper-vermittelt sind, wird der Typ IV durch die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen ausgelöst [23]. Je nach beteiligtem T-Zell-Subtyp und vorhandenem Zytokinprofil werden vier Formen unterschieden. Typ IVa bezieht sich auf die Aktivierung von Th1-Zellen,

die das Zytokin IFN-γ sekretieren und Makrophagen aktivieren, wie es bei der Kontaktdermatitis oder Tuberkulinreaktion vorkommt. Bei Typ IVb sekretieren Th2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und lösen eine B-Zell- und Eosinophil-Antwort aus. Beispiele hierfür sind das chronische Asthma und die chronische allergische Rhinitis. In Typ IVc produzieren zytotoxische CD8-T-Zellen Perforin, Granzyme B und Fas-Ligand, die eine Apoptose der Gewebszellen verursachen. Dies führt zu Erkrankungen wie der Kontaktdermatitis, des Stevens-Johnsons-Syndroms oder der Gewebeabstoßung. In Typ IVd exprimieren CD4- und CD8-T-Zellen die Zytokine IL-8 und GM-CSF. Diese aktivieren Neutrophile und verursachen pustuläre Exantheme wie bei der akuten generalisierten exanthematischen Pustulose oder der Behcet Krankheit [1, 25]. Die Symptome der lokalen Entzündungsreaktion wie Hautschwellungen und Rötung bilden sich bei Typ IV erst nach 24-72 Stunden aus, während es sich bei Typ I-III um unmittelbare Reaktionen handelt. [23].

1.3.1. Entstehung einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ

Die Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ besteht aus zwei Phasen: der Sensibilisierungsphase und der Effektorphase. Die Sensibilisierungsphase umfasst die Schritte der Antigenaufnahme, Prozessierung und *Priming* der T-Zellen. Gelangt ein Antigen in die Haut, wird dieses von pAPC (DC, LC) aufgenommen und prozessiert. Die mit Antigenfragmenten beladenen APC migrieren in die regionalen Lymphknoten. Die Migration der APC wird von proinflammatorischen und chemotaktischen Signalen beeinflusst, die von den APC selbst oder von Keratinozyten ausgeschüttet werden. In der parakortikalen Zone des Lymphknotens findet die Antigenpräsentation statt. Die T-Zelle, deren TCR, das Antigen erkennt, wird aktiviert. Dieser Vorgang wird als *Priming* der T-Zellen bezeichnet. Die antigenspezifischen T-Zellen verlassen den Lymphknoten und patrouillieren zwischen Blut, lymphatischen Organen und peripherem Gewebe. Die Sensibilisierungsphase verläuft symptomfrei und wird von den betroffenen Personen nicht wahrgenommen (Abb. 4).

Der zweite Schritt in der Ausbildung einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ist die Effektorphase. Ein erneuter Kontakt mit dem gleichen Antigen führt wiederum zur Aufnahme und Prozessierung des Antigens durch APC. Zudem liegt durch den Antigenkontakt ein proinflammatorisches Milieu in der

Haut vor, an deren Ausschüttung maßgeblich Keratinozyten, aber auch Zellen des Immunsystems beteiligt sind. Dies verstärkt die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, was den zuvor *geprimten* antigenspezifischen T-Zellen das Einwandern in die Haut erleichtert. Ein wesentliches Kennzeichen der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ist diese Rekrutierung der antigenspezifischen T-Zellen in das Gewebe. Die T-Zellen binden an die APC, die das spezifische Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese aktivierten T-Zellen produzieren daraufhin Zytokine, die das Einwandern weiterer Immunzellen in die Haut begünstigen und so eine lokale Inflammation induzieren. Diese Phase äußert sich durch klinische Symptome wie Rötung (Erythem) und Schwellung (Ödem) der Haut (Abb. 4) [55, 60, 82, 93, 115].

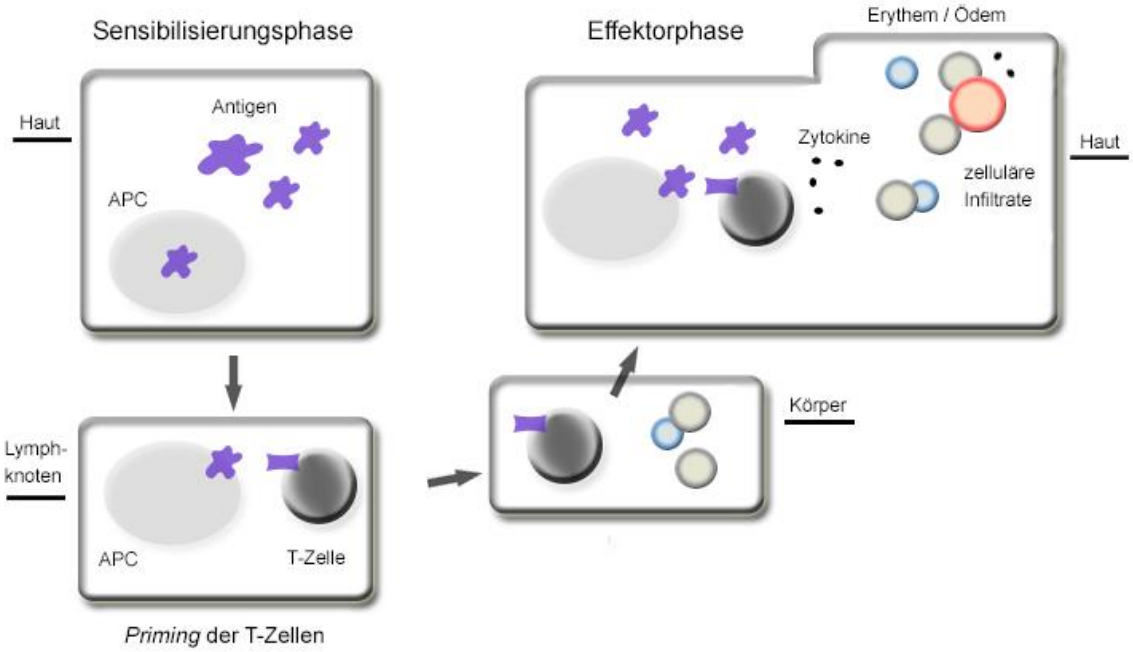


Abb. 4: **Schematische Darstellung der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ.** Die Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ist in zwei Phasen gegliedert: die Sensibilisierungsphase und die Effektorphase. Der erste Schritt in der Ausbildung einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Sensibilisierungsphase) ist die Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen (APC) in der Haut. Während der Migration der APC in die regionalen Lymphknoten wird das Antigen prozessiert und dann auf MHC-Molekülen an naive T-Zellen präsentiert. Letzteres wird als *Priming* der T-Zellen bezeichnet. Die antigenspezifischen T-Zellen patrouillieren im Körper. Ein erneuter Kontakt mit dem gleichen Antigen (Effektorphase) führt zur Aufnahme des Antigens von APC. Die zuvor *geprimten* T-Zellen werden in die Haut rekrutiert und binden an die APC. Die nun aktivierten T-Zellen produzieren verschiedene Zytokine, die weitere Immunzellen veranlassen in die Haut einzuwandern und so eine lokale Inflammation in der Haut auslösen.

Je nach Antigen und ihrem Eintrittsweg in den Körper werden zwei Hauptformen der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV unterschieden. In der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ, die hier als DTH bezeichnet wird, gelangt das Antigen auf subkutanem (s.c.) oder intradermalem (i.d.) Weg in den Körper. Meist handelt es sich um intrazelluläre mikrobiologische Agenzien oder Proteine. In der Kontakthypersensitivitätsreaktion (CHS) dagegen erfolgt die Antigenaufnahme über die Epidermis. Die Antigene in der CHS werden als Kontaktallergene bezeichnet. Klassische Kontaktallergene sind Haptene wie Pentadecacatechol (Giftsumach) oder Metallionen wie Nickel und Chromat. Kontaktallergene wirken meist in gebundener Form an Proteine (Hapten-Protein- bzw. Hapten-Peptid-Komplex) immunogen [55, 60, 82].

1.3.2. Hypersensitivitätsreaktionen von Typ IV im Tiermodell

1.3.2.1. Das DTH-Modell

Das Modell der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ stellt ein *In-vivo*-Modell für die antigenspezifische T-Zell-abhängige lokale Entzündung der Haut dar. Im DTH-Modell kann die Sensibilisierungsphase durch Immunisierung der Tiere mit einem Antigen induziert werden. Als Modellantigen dient meist Ovalbumin (Ova), Hühnereiweiß-Lysozym (HEL) oder Schafserythrozyten (SRBC). Erste Beobachtungen der DTH im Tiermodell machte Dienes, 1929. Er stellte fest, dass nach Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Proteinen eine verspätete Immunreaktion ähnlich der Tuberkulinreaktion entsteht. Freund forschte auf diesem Gebiet weiter und entwickelte das Freunds Adjuvans (CFA) [11, 127]. CFA ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*. CFA weist Nebenwirkungen wie Läsionen oder Bildung eines Granuloms auf. Dessen Einsatz wird daher in Tierversuchen nicht mehr empfohlen. Eine Alternative stellt das inkomplette Freunds Adjuvans (IFA) dar. IFA ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion ohne Mykobakterium, was aber die Gabe eines Adjuvans erforderlich macht [127]. Adjuvanzien sind Substanzen, die die Immunogenität des Antigens erhöhen [90]. Mehr als 100 Adjuvanzien wurden bisher beschrieben. Oft handelt es sich dabei um PAMP, die TLR aktivieren [127]. 5-14 Tage nach der Immunisierung der Mäuse kann durch erneute i.d. Injektion des Antigens die Effektorphase der DTH ausgelöst werden. Geeignete Stellen zur Antigeninjektion

in Mäusen ist das Ohr oder die Fußsohle. Als Maß für die antigenspezifische T-Zell-abhängige lokale Entzündung der Haut kann die erythematöse Schwellung nach Antigeninjektion herangezogen werden. Die Schwellung entsteht durch zelluläre Infiltrate, die in das betroffene Gewebe einwandern und eine Entzündungsreaktion verursachen. Durch die Wahl des Antigens, des Adjuvans und des Applikationsweges kann die Immunantwort beeinflusst werden.

1.3.2.2. Das CHS-Modell

Im CHS-Modell erfolgt die Sensibilisierung sowie das Auslösen der CHS (Effektorphase) durch epidermale Applikation des Kontaktallergens. Gängige Kontaktallergene im Tiermodell sind Dinitrofluorbenzol (DNFB), Trinitrochlorbenzol (TNCB) und Dinitrothiocyanobenzol (DNTB) [56].

1.4. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine weltweit verbreitete Stoffwechselerkrankung, deren Prävalenz im Jahr 2012 bei 8,3 % lag [31]. Der Diabetes wird, je nach Ursache des Entstehens, in vier Hauptgruppen eingeteilt: Diabetes mellitus Typ I, Diabetes mellitus Typ II, Gestationsdiabetes und andere spezifische Diabetestypen, der genetische oder medikamentöse Ursachen oder Erkrankungen des Pankreas zugrunde liegen. Trotz der unterschiedlichen Ursache des Diabetes ist das gemeinsame Charakteristikum eine Hyperglykämie [51]. Während die Entstehung des Diabetes mellitus Typ II (häufigste Form, 90 %) stark von der Lebensweise beeinflusst wird [77], zählt der Diabetes mellitus Typ I (5 %) zu den Autoimmunerkrankungen. Diabetes mellitus Typ I ist eine T-Zell-vermittelte Reaktion, die zur Destruktion der insulinproduzierenden β-Zellen und schließlich zum Erliegen der Insulinproduktion (absoluter Insulinmangel) führt [78, 147]. Die Ursache des Diabetes mellitus Typ I ist noch nicht aufgeklärt. Studien weisen darauf hin, dass ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen, immunologischen und Umweltfaktoren besteht [45]. Bei den immunologischen Faktoren spielen autoreaktive CD8-T-Zellen eine entscheidende Rolle [76, 87, 136]. Aber auch eine Beteiligung weiterer Immunzellen wie CD4-T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und DC wird derzeit diskutiert [71, 135]. Zudem wurde ein verändertes Zytokinprofil, darunter Zytokine der Klasse II, im Plasma

von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I festgestellt [148]. Eine genomweite Assoziationsstudie des Diabetes mellitus Typ I identifizierte IL-19 und IL-20 als neue Kandidaten für diese Erkrankung [8].

1.4.1. Diabetes mellitus Typ I im Tiermodell

1.4.1.1. RIP-B7.1-Modell

RIP-B7.1-Mäuse exprimieren das kostimulatorische Molekül B7.1 (CD80) in den β-Zellen des Pankreas unter Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (RIP) [41]. Durch Immunisierung der Mäuse mit Präproinsulin (ppins)-kodierender Plasmid-DNA werden autoreaktive CD8-T-Zellen aktiviert. Diese zerstören die insulin-produzierenden β-Zellen des Pankreas. In Folge kommt es zu einem Anstieg der Blutglukose. In dem so induzierten experimentellen Autoimmundiabetes (EAD), wird die Zerstörung der β-Zellen v.a. durch die CD8-T-Zellen ausgelöst. CD4-T-Zellen scheinen keine Rolle zu spielen. Die CD8-T-Zellen können während des *Primings* (*De-novo*-Induktion und Expansion der autoreaktiven CD8-T-Zellen) und der Effektorphase (*cross-talk* zwischen den β-Zellen und den einwandernden CD8-T-Zellen) untersucht werden [57, 106].

1.4.1.2. Transfermodelle für Diabetes mellitus Typ I

Ein Transfermodell zur Untersuchung des Diabetes mellitus Typ I ist das RIP-Ova-tg-Mausmodell. RIP-Ova-tg-Mäuse exprimieren Ova in den pankreatischen β-Zellen unter Kontrolle des RIP-Promotors. Es gibt drei verschiedene Mausmodelle, zwei mit unterschiedlichen Expressionsraten von Ova in den pankreatischen β-Zellen (RIP-Ova^{low}, RIP-Ova^{hi}) und eine membrangebundene Form (RIP-mOva) [12, 67, 68]. In diese Rezipienten werden OT-I-Zellen (CD8-tg TCR, der das Epitop $Ova_{257-264}$ auf MHC-Klasse-I-Molekülen vom Haplotyp H-2K^b erkennt) adoptiv transferiert. In RIP-Ova^{hi}- und RIP-mOva-Mäusen werden die adoptiv transferierten OT-I-Zellen depletiert, welches somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der CD8-T-Zell-Toleranz darstellt. RIP-Ova^{low}-Mäuse zeigen keine Depletion der CD8-T-Zellen, sodass durch adoptiven Transfer von Ova-spezifischen (OT-I)-T-Zellen ein EAD ausgelöst wird [69].

1.5. Ziel der Studie

Die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 (IL-20-Familie) teilen sich gemeinsame Rezeptorkomplexe, den IL20R1/IL20R2 und/oder den IL22R1/IL20R2 (IL20R2-Rezeptorfamilie). Bislang ist wenig über die physiologische Funktion dieser Zytokine bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollten die immunregulatorischen Effekte der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 in IL20R2-defizienten Mäusen untersucht werden.

a) Im Vergleich zu *Wildtyp* (B6)-Mäusen sollte geprüft werden, ob die fehlende Signaltransduktion der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen eine Auswirkung auf die *De-novo*-Induktion von antigenspezifischen CD8-T-Zellen durch DNA- oder protein-basierte Immunisierungen hat. Als Modellantigen sollte Ovalbumin (Ova) verwendet werden.
b) Eine hohe Genexpression der IL20R2-Rezeptorfamilie und der Zytokine der IL-20-Familie wurde in der Haut identifiziert. Die Immunregulation und Funktion der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 auf adaptive T-Zell-Antworten sollte daher in der Haut mittels eines T-Zell-vermittelten Mausmodells, der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH) gegen Ova, untersucht werden. Dieses Modell ist zur Charakterisierung der T-Zellen während des *Primings* (primäre Aktivierung von antigenspezifischen naiven T-Zellen durch DNA- oder protein-basierte Immunisierungen) und der T-Zell-gesteuerten Entzündungsreaktion (Effektorphase) in der Haut geeignet. Die Effektorphase im DTH-Modell sollte zudem im adoptiven Transfermodell Ova-spezifischer T-Zellen analysiert werden.
c) Die Auswirkungen der fehlenden Signaltransduktion der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen sollte ferner in dem T-Zell-abhängigen Modell des experimentellen Autoimmundiabetes (EAD) untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Eine Liste, aller nicht explizit im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien, befindet sich im Anhang.

2.2. Puffer und Medien

Eine Liste der verwendeten Puffer und Medien ist im Anhang aufgeführt.

2.3. Verwendete Mausstämme

Für die Tierversuche wurden männliche und weibliche Mäuse folgender Mausstämme auf C57BL/6JRj Hintergrund verwendet.

Tab. 2: **Mausstämme**

Mausstamm	**Herkunft**
C57BL/6JRj (Abk.: B6 oder *Wildtyp*)	Janvier (Frankreich)
IL20R2$^{-/-}$	beschrieben von Wahl et al., 2009 [137]
K^{b}/Ova$_{257-264}$-TCR-transgene OT-I (Abk:OT-I)	Zucht Universität Ulm
IL20R2$^{-/-}$/OT-I	Zucht Universität Ulm Kreuzung aus IL20R2$^{-/-}$ x OT-I
RAG1$^{-/-}$	Zucht Universität Ulm
RIP-B7.1	beschrieben von Harlan et al., 1994 [41]
IL20R2$^{-/-}$/RIP-B7.1	Zucht Universität Ulm Kreuzung aus IL20R2$^{-/-}$ x RIP-B7.1
RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}	Zucht Universität Ulm Kreuzung aus RIP-B7.1 x RIP-Ova^{low} RIP-Ova^{low} beschrieben von Blanas et al., 1996 [12]

C57BL/6JRj-Mäuse wurden bei der Firma Janvier (Frankreich) erworben. Alle weiteren Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Ulm (Deutschland) unter SPF-Bedingungen in einem zwölfstündigen Tag- und Nachtrhythmus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gezüchtet und gehalten. Für alle Versuche wurden geschlechts- und altersangepasste Mäuse zwischen 7-14 Wochen verwendet.

Wenn nötig, wurden die Mäuse, wie im Versuchsantrag angegeben, mit Isofluran (Forene, Kat.-Nr. B506, Abbott) oder durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Xylazin (Rompun, Bayer) und Esketamin (Ketanest S, Pfizer) nach Vorgaben des Tierschutzgesetzes betäubt. Die Mäuse wurden durch CO_2-Begasung getötet. Alle Tierversuche wurden gemäß der lokalen Bestimmungen und des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.4. Genotypisierung der Mäuse

2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien und Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Bestimmung des Genotyps IL20R2$^{-/-}$, RIP-B7.1 oder RIP-Ova^{low} wurde die genomische DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse mit Lysepuffer (Art.-Nr. 31-101-T, PEQLAB) und 0,2 mg/ml Proteinase K (Art.-Nr.19131, Qiagen) nach Angaben des Herstellers (PEQLAB) isoliert. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem *Taq*DNA-Polymerase-Kit (Art.-Nr. 201205, Qiagen) durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 30 µl wurden 1x CoralLoad PCR-Puffer, 1x Q-Lösung, 2,3 mM $MgCl_2$ und 1,5 Units Polymerase unter Zugabe von 0,3 mM pro dNTP (Art.-Nr. 0032 003.303, Eppendorf), je 0,3 µM des Forward- und Reverse-Pimers (Primerpaare Tab. 3) und ~100 ng der isolierten DNA aus Schwanzbiopsien gelöst.

Tab. 3: **Liste der für die Genotypisierung verwendeten Primer**

#	Primer	Sequenz
1	UW107	5’ CAGTCCCATAGAGTACACTGAG 3’
2	UW108	5’ GGGAGAGAAAATGCCCCAAACC 3’
3	B7-INS1-fow	5’ CAAACAACAGCCTTACCTTCGG 3’
4	B7-INS2-rev	5’ GCCTCCAAAACCTACACATCCT 3’
5	IMR6021	5’ CAAGCACATCGCAACCA 3’
6	IMR6022	5’ GCAATTGCCTTGTCAGCAT 3’

Die Oligonukleotide (Primer) wurden bei Biomers, Ulm erworben. Die Primer wurden in sterilem Wasser aufgelöst und auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 4: **PCR-Protokoll zur Genotypisierung der Mäuse**

	Primer 1-2 und 3-4				Primer 5-6		
Zyklus	**Temp.(°C)**	**Dauer**	**Zyklen**		**Temp.(°C)**	**Dauer**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	94	2‘	1		94	3‘	1
Denaturierung	94	30“	38		94	30“	38
Primer-hybridisierung	58	30“			56	30“	
Elongation	72	1‘			72	30“	
Finale Elongation	72	7‘	1		72	5‘	1
	4	∞			4	∞	

‘ Minuten, “ Sekunden

Die verwendeten Primer und das PCR-Protokoll für die Genotypisierung der Mäuse ist in Tab. 3 und Tab. 4 aufgeführt. Die Wahl des Primers ermöglicht die Unterscheidung von *wildtyp* Gen und mutiertem Gen. Das IL20R2-Gen wurde mit dem Primerpaar 1-2, das RIP-B7.1-Gen mit dem Primerpaar 3-4 und das RIP-Ova^{low}-Gen mit den Primern 5-6 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach Sambrook, 2000 [119] in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1mM EDTA) aufgetrennt. Als Standard wurde ein 1 kb Marker (Kat.-Nr. 15615-024, Invitrogen) aufgetragen.

2.4.2. Genotypisierung durch Durchflusszytometrie

Der Nachweis des Genotyps OT-I oder RAG1$^{-/-}$ erfolgte durch durchflusszytometrische Analyse. Nach der Entnahme von 30-50 µl Blut aus der *Vena caudalis mediana* erfolgte die Lyse der Erythrozyten 2x für 5 Minuten bei 37 °C in Lysepuffer (0,16 M NH_4Cl, 0,17 M Tris, pH 7,2). Die Zellen wurden mit FACS A gewaschen (Zentrifugation 200 g, 5 Min, RT). Anschließend wurden die membranständigen Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/CD32 (Fc-Block) für 15 Minuten bei 4 ℃ blockiert. Nach einem weiteren Waschschritt in FACS A wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 ℃ in Antikörperlösung (Verdünnung 1:200) inkubiert. Zur Bestimmung des Genotyps OT-I wurden der anti-CD3-, anti-CD8- und anti-Vβ5.1,5.2-Antikörper verwendet (Tab. 5). Zur Bestimmung der RAG1$^{-/-}$-Mäuse wurde der anti-CD3- und anti-CD19-Antikörper eingesetzt (Tab. 5). Nach der Färbung wurden die Zellen in FACS A gewaschen und mit 1 % Paraformaldehyd

(PFA) fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur oder LSR II, BD).

Tab. 5: **Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper**

Antikörper	Konjugation	Klon	Firma	Kat.-Nr.
anti-CD3	PerCP	145-2C11	BDBiosciences	553067
anti-CD3	APC	145-2C11	Biolegend	100312
anti-CD8	APC	53-6.7	Biolegend	100712
anti-CD19	PE	6D5	Biolegend	115508
anti-Vβ5.1,5.2	FITC	MR9-4	BDBiosciences	553189
anti-CD25	APC	PC61	Biolegend	102012
anti-CD44	PerCP	IM7	Biolegend	103036
anti-CD62L	FITC	MEL-14	Biolegend	104406
anti-IFN-γ	FITC	XMG1.2	Biolegend	505806

2.5. Immunbiologische Methoden

2.5.1. Immunisierung der Mäuse

a) DNA-Immunisierung

100 µg der Plasmid-DNA (Tab. 6) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl PBS gelöst und je 50 µl intramuskulär (i.m.) pro *Musculus tibialis anterior* injiziert. Kontrollmäuse erhielten das gleiche Volumen pCI in PBS.

Tab. 6: **Liste der zur Immunisierung verwendeten Plasmide**

Plasmid	Insert	Hersteller
pCI	-	Promega, Kat.-Nr. E1731
pCI/Ova	Ovalbumin	Thermo Fisher Scientific
pCI/ppins$_{N110A}$	Präproinsulin Substitution der AS 21 der A-Kette, N gegen A	Thermo Fisher Scientific

b) Protein-Immunisierung

Zur Protein-Immunisierung der Mäuse (100 µL je Maus) wurden, soweit nicht anders angegeben, 50 µg des Proteinantigens Ovalbumin (Ova) (Kat.-Nr. A5253, Sigma) mit 50 µg des Adjuvans (Tab. 7, Gruppe 1-3) in 50 µl PBS und gleichem Volumen IFA (Kat.-Nr. F5506, Sigma) gelöst und zu einer homogenen Emulsion

vermischt. Das Adjuvans Quil-A (30 µg) (Tab. 7, Gruppe 4) wurde mit 50 µg Ova in 100 µL PBS gelöst. Kontrollmäuse erhielten das gleiche Volumen PBS bzw. ein 1:1 Gemisch aus IFA und PBS. Je 100 µl der Immunisierungslösung wurde s.c. seitlich der Schwanzbasis der Mäuse injiziert.

Tab. 7: **Liste der Adjuvanzien**

#	**Produkt**	**Beschreibung**	**Hersteller**	**Kat.-Nr.**
1	ODN1826	unmethylierte CpG-Oligonukleotide, (C = Cytosin, p = Phosphat, G= Guanin)	Biomers, Ulm	
2	ODN1982	unmethyliertes Oligonukleotid ohne CpG-Motiv	Biomers, Ulm	
3	LPS	Lipopolysaccharid	Sigma	L2143
4	Quil-A	Saponin	Brenntag, Dänemark	L77-337

Die CpG-Oligonukleotide ODN1826 5´ TCCATGACGTTCCTGACGTT 3´ (CpG-Motive sind unterstrichen) und ODN1982 5´ TCCAGGACTTCTCTCAGGTT 3´ (nicht-CpG-Motiv) wurden in sterilem Wasser aufgelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.2. Depletion der CD8-T-Zellen

Die Mäuse wurden immunisiert (Punkt 2.5.1). 300 µg des anti-CD8-Antikörpers (Kat.-Nr. 22150080, Klon YTS-169, ImmunoTools) wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl PBS gelöst und am Tag 0, 4 und 5 nach der Immunisierung i.p. injiziert. Die vollständige Depletion der CD8-T-Zellen wurde mit PerCP-konjugiertem anti-CD3-Antikörper und APC-konjugiertem anti-CD8-Antikörper (Verdünnung 1:200) im Durchflusszytometer überprüft, wie im Punkt 2.4.2 beschrieben.

2.6. Induktion der DTH der Haut gegen das Antigen Ova

Wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben wurden die Mäuse immunisiert (Tag 0). Soweit nicht anders angegeben, wurde die Induktion der DTH am Tag 5 nach der Immunisierung durchgeführt. Dazu wurden 10 µg Ova in 12,5 µl PBS gelöst und i.d. in das rechte Mausohr injiziert. Da bei der Bestimmung der Δ Ohrschwellung lediglich die Schwellung erfasst werden sollte, welches durch das injizierte Antigen

verursacht wurde, war es erforderlich, dass das Tier außerdem 12,5 µl PBS in das linke Ohr i.d. injiziert bekam. Aus diesem Grund wurde die Ohrdicke des linkes Ohrs (PBS) von der Ohrdicke des rechten Ohrs (Ova) subtrahiert. Die Ohrdicke wurde vor der Injektion und nach der Injektion (24, 48, 72 Stunden) mit einem Mikrometer (Mitutoyo) gemessen. Die ∆ Ohrschwellung (in µm) wurde nach folgender Formel berechnet: [(Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)] – [(Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)].

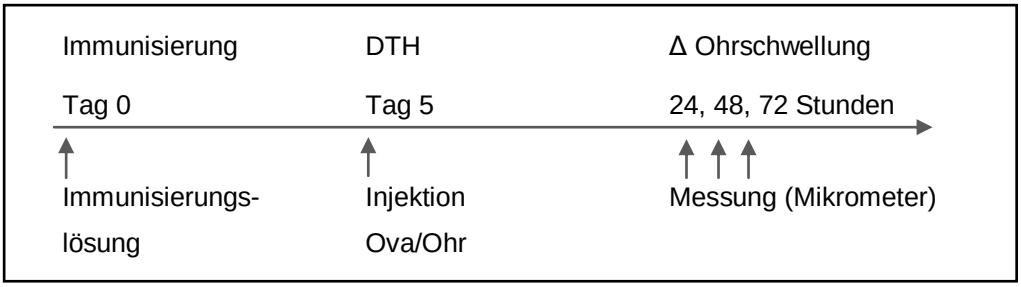


Abb. 5: **Schema der DTH-Induktion.** Am Tag 0 erfolgte die Immunisierung der Mäuse gegen Ova. Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von Ova (bzw. PBS) in das Ohr ausgelöst. Die Ohrschwellung wurde, soweit nicht anders angegeben, 24, 48 und 72 Stunden nach der Antigeninjektion mit einem Mikrometer gemessen und die ∆ Ohrschwellung ermittelt. DTH: Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (hier: lokale Inflammation der Haut; gegen Proteine wie Ovalbumin (Ova))

2.7. Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Ein Diabetes wurde diagnostiziert, wenn zwei aufeinanderfolgende Messungen eine Blutglukosekonzentration von 250 mg/dl (3,8 mmol/l) überschreiten. Gemessen wurden die Werte mit einem Blutglukosemessgerät (Gerät: OneTouch Ultra, Teststreifen: Kat.-Nr. 0344, Lifescan). Die diabetische Inzidenz bezeichnet das Verhältnis diabetischer zu nicht-diabetischen Tieren.

2.8. Isolation, Aufreinigung und Kultivierung primärer Zellen

2.8.1. Isolation der Milzzellen

Nach Entnahme der Milz wurde diese in 10 ml PBS/1 % FCS überführt. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz durch ein steriles Metallsieb gedrückt. Nach Zentrifugation bei 200 g für 5 Min bei RT erfolgte die Lyse der

Erythrozyten für 5 Minuten bei 37 °C in Lysepuffer. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal in PBS/1 % FCS gewaschen und dabei vorhandene Gewebestücke entfernt. Zur *In-vitro*-Stimulation (Punkt 2.8.4) der Milzzellen wurden diese in RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen oder standen für den adoptiven Transfer (Punkt 2.8.3) oder durchflusszytometrische Untersuchungen (Punkt 2.9) bereit.

2.8.2. Isolation der nicht-parenchymalen Zellen der Leber

Nach Eröffnung des Bauchraums der Mäuse wurde die Leber über eine Kanüle in der Pfortader mit 10 ml *Liver Perfusion Medium* (Kat.-Nr. 17701-038, Gibco) und 5 ml *Liver Digest Medium* (Kat.-Nr. 17703-034, Gibco) perfundiert. Die Gallenblase wurde entfernt und die Leber in 10 ml *Liver Digest Medium* überführt. Die Leber wurde zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 ℃ im Wasserbad inkubiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Leber durch ein steriles Metallsieb gedrückt und in PBS/1 % FCS aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 50 g für 5 Min bei RT wurde das Pellet erneut in 50 ml PBS/1 % FCS gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 35%igem Percoll (Kat.Nr. P4937, Sigma) aufgenommen und anschließend mit 70%igem Percoll überschichtet und bei 800 g für 20 Minuten zentrifugiert. Die an der Grenzschicht entstandene Zellschicht wurde abgenommen und in PBS überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 450 g wurden die Erythrozyten in Lysepuffer für 3 Minuten lysiert und anschließend die nicht-parenchymalen Zellen (NPC) der Leber in PBS gewaschen. Die NPC wurden zur weiteren Analyse (Punkt 2.9) in RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin oder PBS aufgenommen.

2.8.3. Aufreinigung und adoptiver Transfer der CD8-T-Zellen

Wie unter Punkt 2.8.1 aufgeführt, wurden aus der Milz die Milzzellen gewonnen. Die CD8-T-Zellen wurden mittels negativer Selektion (MACS-Aufreinigung) *mit CD8a$^+$ T Cell Isolation Kit II* (Kat.-Nr. 130-095-236, Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 200 g, 5 Min, RT) und zur Vereinzelung der Zellen durch ein Sieb mit 35 µm Porengröße (Kat.-Nr. 352235, BD) gegeben. Die im Versuch angegebene Zellzahl wurde in einem Volumen von 200 µl gelöst und intravenös (i.v.) in die *Vena caudalis mediana* von geschlechts- und

altersangepassten Rezipienten injiziert. Vor dem Transfer wurde der naive Phänotyp ($CD25^{low}CD44^{int}CD62L^{high}$) (Tab. 5) der CD8-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (Punkt 2.4) bestimmt.

2.8.4. Stimulation der CD8-T-Zellen mit Peptiden (*in vitro*)

Die isolierten Milzzellen (Punkt 2.8.1) oder NPC (Punkt 2.8.2) wurden in 96-well Rundbodenplatten (Kat.-Nr. 163320, Nunc) zusammen mit den in Tab. 8 aufgeführten Peptiden in RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C/5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung intrazellulärer Zytokine in den CD8-T-Zellen (Punkt 2.9.2) wurden $1x10^6$ Milzzellen mit dem antigenspezifischen Peptid $K^b/Ova_{257-264}$ oder dem Kontrollpeptid $K^b/HBcAg_{93-100}$ in je einer Endkonzentration von 0,5 µM sowie 5 µg/ml Brefeldin A (BFA) (Kat-Nr. ALX-350-019-M010, Alexis) für 4 Stunden in RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C/5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert (Punkt 2.9.2). Zum Nachweis des Zytokins IFN-γ im ELISA (Punkt 2.9.3) wurden $1x10^6$ Milzzellen der immunisierten Tiere in 96-well Rundbodenplatten zusammen mit 1 µM $K^b/Ova_{257-264}$ in RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin für 24, 48 und 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert (Punkt 2.9.3). Für die adoptiven Transferexperimente wurden die isolierten Milzzellen einer Milz mit 3 µg/ml $K^b/Ova_{257-264}$ in einer Petrischale mit 10 ml RPMI-Medium/5 % FCS/1 % Penicillin/Streptomycin für 3 Tage stimuliert und wie in Punkt 2.8.3 beschrieben fortgeführt.

Tab. 8: **Liste der synthetischen Peptide**

Epitop	Aminosäuresequenz	Hersteller
H2-$K^b/Ova_{257-264}$	SIINFEKL	Thermo Fisher Scientific
H2-$K^b/HBcAg_{93-100}$	MGLKFRQL	Thermo Fisher Scientific

$K^b/Ova_{257-264}$ ist ein Klasse I (K^b)-restringiertes Epitop des Ovalbumins.

$K^b/HBcAg_{93-100}$ ist ein Klasse I (K^b)-restringiertes Epitop des Hepatitis B Core Antigens

Die synthetischen Peptide wurden in DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt.

2.9. Nachweis antigenspezifischer CD8-T-Zellen

2.9.1. Bestimmung der $K^b/Ova_{257-264}$-spezifischen CD8-T-Zellen

Die Milz oder Leber der Mäuse wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Immunisierung (Punkt 2.5.1) entnommen. Die separierten Zellen (Punkt 2.8.1 und 2.8.2) wurden in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und einmal mit FACS A gewaschen (Zentrifugation 200 g, 5 Min, RT). Anschließend erfolgte die Blockierung der membranständigen Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/CD32 (Fc-Block) für 15 Minuten bei 4 °C. Es folgte ein Waschschritt in FACS A. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4 °C in einer Lösung inkubiert, die aus APC-konjugiertem anti-CD8-Antikörper (Tab. 5, Verdünnung 1:200) und PE-konjugiertem H2-$K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer (Kat.-Nr. T03000, Beckman Coulter, Verdünnung 1:100) bestand. Nach der Färbung wurden die Zellen einmal in FACS A gewaschen und mit 1 % PFA fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur oder LSR II, BD).

2.9.2. Nachweis antigenspezifischer IFN-γ^+ CD8-T-Zellen

Nach der *In-vitro*-Restimulation (Punkt 2.8.4) der Milzzellen wurden die Zellen in FACS A gewaschen (Zentrifugation 200 g, 5 Min, RT) und die membranständigen Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/CD32 (Fc-Block) für 15 Minuten bei 4 °C blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4 °C in APC-konjugiertem anti-CD8-Antikörper (Tab. 5, Verdünnung 1:200) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Fixierung der Zellen mit 1 % PFA für 15 Minuten bei 4 °C, gefolgt von einem weiteren Waschschritt in FACS A. Zur intrazellulären Zytokinfärbung wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten bei RT in FACS B vorinkubiert, das zur Permeabilisierung der Zellmembran dient. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung mit FITC-konjugiertem IFN-γ-Antikörper (Tab. 5, Verdünnung 1:200 in FACS B) für 30 Minuten bei RT. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit FACS B gewaschen und in FACS A aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur oder LSR II, BD).

2.9.3. Bestimmung der antigenspezifischen IFN-γ-Konzentration im ELISA

Die Überstände wurden nach der *In-vitro*-Stimulation (Punkt 2.8.4) mit einem klassischen *Sandwich-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) analysiert. Die ELISA-Platten (MaxiSorp, 96-well Flachboden, Kat.-Nr. 442404, Nunc) wurden über Nacht bei 4 °C mit 2 µg/ml anti-IFN-γ-Antikörper (Kat.-Nr. 551216, BD Pharmigen) in Puffer (0,1 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$, pH 9) beschichtet. Nach Entfernen des ungebundenen Antikörpers wurden die Platten zur Blockierung eine Stunde bei RT mit Blockierungspuffer (PBS/3 % (w/v) BSA) behandelt und anschließend zweimal mit Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20) gewaschen. Die Proben wurden zusammen mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Zytokins (IFN-γ-Standard, Kat.-Nr. 554587, BD Pharmigen) auf die Platten aufgetragen und für 3 Stunden bei RT inkubiert und anschließend viermal gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Detektionsantikörper, 0,25 µg/ml biotinylierter anti-IFN-γ-Antikörper (Kat.-Nr. 554410, BD Pharmigen) in PBS/3 % BSA, für 1 Stunde bei RT auf die Platten geben. Nach 6-maligem Waschen der Platten wurde 1 µg/ml Steptavidin-konjugierte Alkalische-Phosphatase (SAP) (Kat.-Nr. 016-050-084, Jackson ImmunoResearch) in PBS/3 % BSA gelöst und die Platten für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach 8 weiteren Waschschritten wurde 1 mg/ml des SAP-Substrats p-Nitrophenyl-Phosphat (Kat.-Nr. 71768, Fluka) in Diethanolaminpuffer (1 M Diethanolamin, 4 mM $CaCl_2$, 3 mM NaN3) zu den Platten hinzugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5-10 Minuten durch Zugabe von 0,5 M EDTA, pH 8 gestoppt. Die Extinktion wurde bei 405/490 nm mit dem Elisa-Reader (Synergy HT, Bio-Tek) und mit KC4 Software Version 3.1 (Bio-Tek) gemessen.

2.10. RNA-Isolation, reverse Transkription und Real-time PCR

Nach Induktion der DTH (Punkt 2.6) wurden den Mäusen Ohrgewebe zu definierten Zeitpunkten entnommen. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließen bei -80 °C gelagert. Das Gewebe wurde in RLT-Puffer/10 µl/ml β-Mercaptoethanol homogenisiert und anschließend mit 20 mg/ml Proteinase K (Art.-Nr.19131, Qiagen) für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Die RNA wurde mittels RNeasy-Mini-Kit (Kat.-Nr. 74104, Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die genomische DNA wurde mit DNase I (Kat.-Nr. 79254,

Qiagen) entfernt. Die Konzentration der RNA wurde im Nanodrop (PEQLAB) bestimmt.

Anschließend wurde die RNA mit SuperScript II Reverse Transkriptase (Kat. Nr. 18064-014, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgewandelt. Die Qualität der cDNA wurde mittels β-Actin PCR mit 0,2 µM der Primer UW61 (5'-GGGAATGGGTCAGAAGGACT) und UW62 (5'-TTTGATGTCACGCACGATTT) und des *Taq*DNA-Polymerase-Kit (Kat.-Nr. 201205, Qiagen) (Punkt 2.4.1) überprüft. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 9 angegeben. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel (Punkt 2.4.1) aufgetragen.

Tab. 9: **PCR-Protokoll der β-Actin-PCR**

Zyklus	**Temp. (°C)**	**Dauer**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	94	2‘	1
Denaturierung	94	1‘	30
Primerhybridisierung	58	1‘	
Elongation	72	1,5‘	
Finale Elongation	72	3‘	1
	4	∞	

‘ Minuten, ‘‘ Sekunden

Um die relative Expression der mRNA zu bestimmen, wurde die Real-time PCR mit SYBR®Green PCR (Kat.-Nr. 4309155, Applied Biosystem) durchgeführt. Die Primerpaare (300 nM) sind in Tab. 10 aufgeführt. Die quantitative PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) durchgeführt, dabei wurde bei jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde β-Actin verwendet, das zur Standardisierung der eingesetzten cDNA Menge dient. Für die Berechnung der relativen Expression der mRNA wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode verwendet.

Tab. 10: **Primersequenzen für die Real-time PCR-Analysen**

Produkt	**Forward**	**Reserve**
IL-19	5’ ATG AAG ACA CAG TGC GCG TC 3’	5’ GTG TCA GGC TGC AGG AG 3’
IL-20	5’ CCA GGA TCT AGG TGT AAG ATG 3’	5’ GAG ATT CTT GGA CAG GAG TG 3’
IL-22	5’ ATG GCT GTC CTG CAG AAA TCT ATG AG 3’	5’ CAA GTC TAC CTC TGG TCT CAT GGA C 3’
IL-24	5’ GAG TTG GGG ACT ACA GAT TCT CC 3’	5’ GTG CAC TCT CAC TAA TGG GAA GC 3’

Die Oligonukleotide (Primer) wurden bei Biomers, Ulm erworben. Die Primer wurden in sterilem Wasser aufgelöst und auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 11: **Protokoll der Real-time PCR**

Temp. (°C)	Dauer	Zyklenzahl
50	2‘	1
95	10‘	1
95	15‘‘	40
60	60‘‘	

‘ Minuten, ‘‘ Sekunden

2.11. Software und Statistik

Zur Auswertung der FACS Daten wurde FCS Express Version 3 (De Novo Software) verwendet.

GraphPad Prism Version 4 (GraphPad Software, Inc.) wurde zur Erstellung der Grafiken und zur statistischen Analyse der Daten herangezogen. Gezeigt wurde der Mittelwert mit ± Standardabweichung (±SD). Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein ungepaarter t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurde je ein repräsentatives Experiment aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakteristika der IL20R2-*Knockout*-Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde die von unserer Arbeitsgruppe generierte IL20R2-*Knockout*-Maus (IL20R2$^{-/-}$-Maus) verwendet. Der *Knockout* des Zytokinrezeptorgens IL20R2 inaktiviert die Signalweiterleitung der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 (IL-20-Familie) über den IL-20-Rezeptorkomplex Typ I (IL20R1/IL20R2) und IL-20-Rezeptorkomplex Typ II (IL22R1/IL20R2). Durch das Fehlen der IL20R2-vermittelten Signale in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen können im Vergleich zu *Wildtyp* (B6)-Mäusen Rückschlüsse über die physiologische Rolle der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 getroffen werden. Bei der Analyse der IL20R2$^{-/-}$-Maus wurde festgestellt, dass die Mäuse gesund sind. Die Lymphozyten wie T-, NK-, NKT- und B-Zellen wiesen keine Veränderungen in der absoluten Anzahl und bei den Oberflächenmarkern im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen auf. Auch die Zellzahl und Verteilung der APC wie DC und Makrophagen waren nicht verändert.

3.2. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die Induktion der CD8-T-Zellen

3.2.1. Induktion von CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit pCI/Ova

Bisher wird kontrovers diskutiert, ob die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 Immunzellen wie T-Zellen beeinflussen. Einige Studien beschreiben, dass die Zytokine der IL-20-Familie T-Zellen (trotz des fehlenden Nachweises eines funktionellen Rezeptors) durch die Ausbildung eines bestimmten Zytokinprofils oder in der Induktion verschiedener Produkte beeinflussen können. Zudem stellte unsere Arbeitsgruppe fest, dass IL20R2-vermittelte Signale die CD8-T-Zell-Antwort *in vitro* und *in vivo* negativ regulieren. Daher wurde überprüft, ob IL20R2-vermittelte Signale *in vivo* einen Einfluss auf die *De-novo*-Induktion und Expansion von CD8-T-Zellen nehmen. Dazu wurden IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse i.m. mit 100 µg des DNA-Konstrukts pCI/Ova (kodiert für Ovalbumin) immunisiert. Den Kontrolltieren wurde der pCI-Vektor injiziert (Punkt 2.5.1). Es ist bekannt, dass Immunisierungen mit DNA-Konstrukten effektiv CD8-T-Zell-Antworten induzieren.

Ferner wurde für Ova ein MHC-Klasse-I (H-2K^b)-bindendes Epitop (K^b/Ova$_{257-264}$, Aminosäuresequenz SIINFEKL) identifiziert, das ganz spezifisch von CD8-T-Zellen erkannt wird (Abb. 6A). Die K^b/Ova-spezifische CD8-T-Zell-Antwort wurde 12 Tage nach der Immunisierung der Mäuse in den Milzzellen durch die quantitative Bestimmung mit K^b/Ova$_{257-264}$-Tetrameren oder der *Ex-vivo*-Stimulation mit Peptiden und Bestimmung der IFN-γ-Frequenzen im Durchflusszytometer und der IFN-γ-Sekretion im ELISA ermittelt (Punkt 2.9).

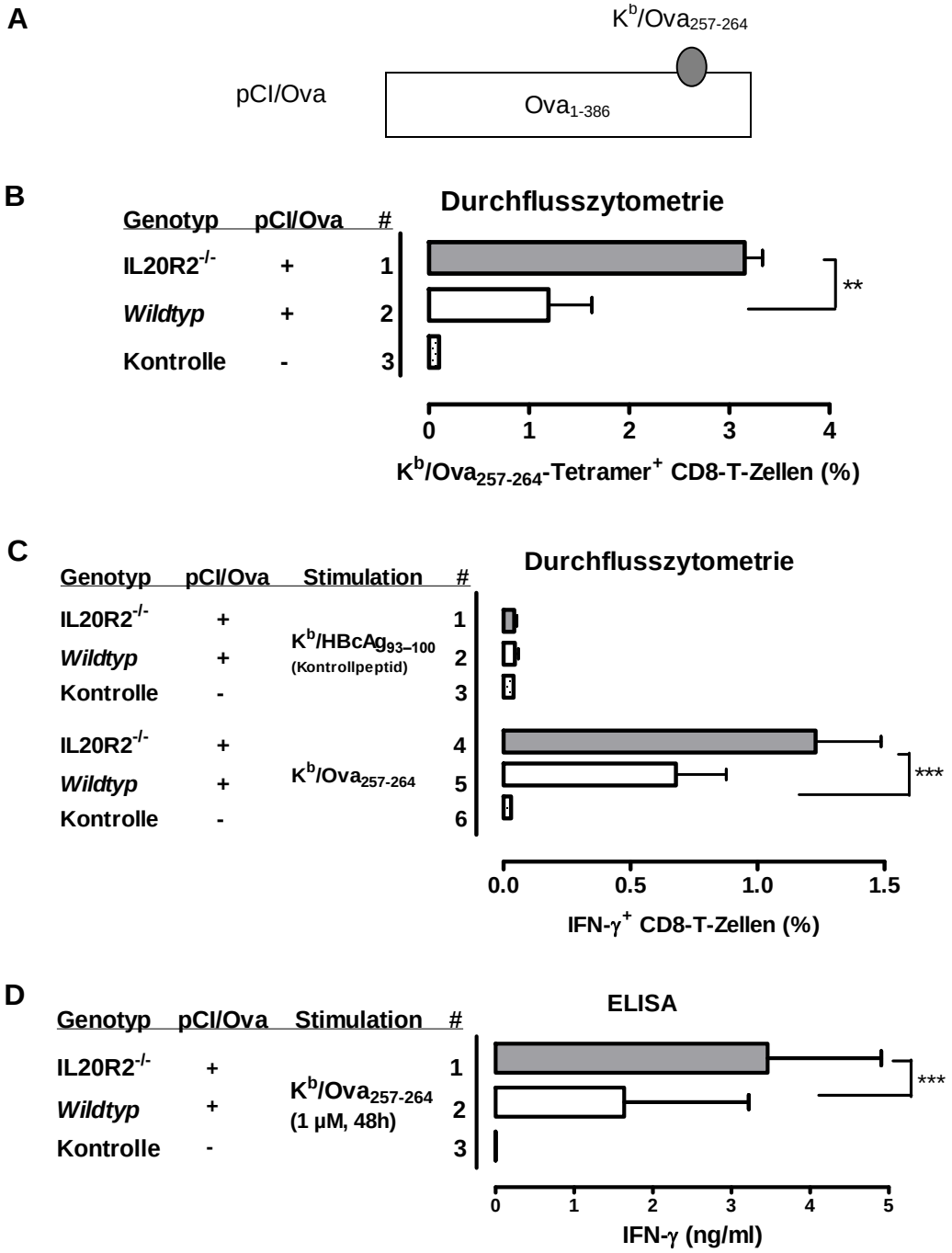


Abb. 6: **Antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit pCI/Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen.** A) Dargestellt ist das Ova-kodierende DNA-Konstrukt pCI/Ova (enthält die Sequenz des Ovalbumin) mit dem $K^b/Ova_{257-264}$ (SIINFEKL) Epitop. B) IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit je 50 µg pCI/Ova oder pCI-Vektor (Kontrolle) pro *Musculus tibialis anterior* immunisiert. Die Milz wurde am Tag 12 entnommen. Zur Detektion der $K^b/Ova_{257-264}$-spezifischen CD8-T-Zellen wurden die isolierten Milzzellen mit $K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer und anti-CD8-Antikörper angefärbt. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden mit FCS Express ausgewertet und auf lebende Lymphozyten *gegated*. C) Zur Detektion der IFN-γ^+ CD8-T-Zellen wurden die isolierten Milzzellen der immunisierten Mäuse für 4 Stunden *ex vivo* mit $K^b/Ova_{257-264}$ oder dem Kontrollpeptid $K^b/HBcAg_{93-100}$ in Gegenwart von BFA restimuliert. Die Färbung erfolgte mit anti-CD8-Antikörper und anschließender intrazellulärer Färbung mit IFN-γ-Antikörper. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert und auf lebende CD8-T-Zellen *gegated*. D) Zur Bestimmung der antigenspezifischen IFN-γ-Sekretion wurden die isolierten Milzzellen der immunisierten Mäuse für 48 Stunden *ex vivo* mit $K^b/Ova_{257-264}$ restimuliert und anschließend im ELISA gemessen. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; Mittelwerte (±SD).

Zuerst wurden die Milzzellen immunisierter IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse isoliert und die antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort mit $K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer-Färbung im Durchflusszytometer ermittelt (Punkt 2.9.1). IL20R2$^{-/-}$-Mäuse zeigten eine signifikant höhere Anzahl $K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer$^+$ CD8-T-Zellen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen (Abb. 6B). Zur Bestimmung der IFN-γ^+ CD8-T-Zellen wurden die isolierten Milzzellen immunisierter Mäuse mit $K^b/Ova_{257-264}$ oder dem Kontrollpeptid $K^b/HBcAg_{93-100}$ in Gegenwart von BFA restimuliert. Anschließend wurde die intrazelluläre IFN-γ-Produktion der CD8-T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt (Punkt 2.9.2). Die Frequenz der IFN-γ^+ CD8-T-Zellen war in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 6C). Diese Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Ergänzend dazu wurde nach der Immunisierung der Mäuse mit pCI/Ova die IFN-γ-Sekretion nach *Ex-vivo*-Restimulation der Milzzellen mit $K^b/Ova_{257-264}$ im ELISA ermittelt (Punkt 2.9.3). Dabei wurde eine signifikant höhere IFN-γ-Sekretion der Zellen von immunisierten IL20R2$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen nachgewiesen (Abb. 6D). Die Anzahl antigenspezifischer CD8-T-Zellen lag bei den Kontrollmäusen (Immunisierung mit pCI-Vektor, Abb. 6B, Gruppe 3, Abb. 6C Gruppe 3 und 6, Abb. 6D Gruppe 3) und bei der Restimulation der Milzzellen mit

dem Kontrollpeptid K^b/$HBcAg_{93-100}$ (Abb. 6 C, Gruppe 1-3) unterhalb der Nachweisgrenze.

Mithin wurde in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen durch die Immunisierung mit pCI/Ova-DNA eine höhere Anzahl K^b/$Ova_{257-264}$-Tetramer$^+$ CD8-T-Zellen und eine erhöhte Frequenz antigenspezifischer IFN-γ^+ CD8-T-Zellen induziert als in *Wildtyp*-Mäusen. Dies zeigt, dass IL20R2-vermittelte Signalwege in der *Wildtyp*-Maus die Induktion und Expansion der CD8-T-Zellen während des *Primings* behindern.

3.2.2. Induktion von CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA

Um das Ergebnis der DNA-Immunisierung mit pCI/Ova zu bestätigen, wurde als weitere Immunisierungsstrategie die Protein-Immunisierung mit Ova gewählt. IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit einer Emulsion aus 50 µg Ova, 50 µg ODN1826 (TLR9-Agonist) und IFA immunisiert. Kontrolltieren wurde IFA/PBS oder PBS injiziert. Das Gemisch wurde s.c. seitlich der Schwanzbasis der Mäuse gespritzt (Punkt 2.5.1). 12 Tage später wurde die K^b/Ova-spezifische CD8-T-Zell-Antwort analysiert.

In den Milzzellen konnte 12 Tage nach der Protein-Immunisierung der Mäuse mit Ova/ODN1826/IFA nur eine geringe Anzahl K^b/$Ova_{257-264}$-Tetramer$^+$ CD8-T-Zellen erfasst werden. Deshalb wurden nicht-parenchymale Zellen (NPC) der Leber analysiert, die eine höhere Anzahl antigenspezifischer T-Zellen enthalten. Nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA wiesen IL20R2$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen signifikant mehr K^b/$Ova_{257-264}$-Tetramer$^+$ CD8-T-Zellen in den NPC der Leber auf (Abb. 7A). Des Weiteren wurde die IFN-γ-Produktion der antigenspezifischen CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen ermittelt. Am Tag 12 nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA und *Ex-vivo*-Restimulation der Milzzellen mit K^b/$Ova_{257-264}$ war die Frequenz von IFN-γ^+ CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 7B). Die IFN-γ-Sekretion wurde zusätzlich im ELISA ermittelt. Nach *In-vitro*-Stimulation der Milzzellen mit K^b/$Ova_{257-264}$ wurde signifikant mehr IFN-γ bei den mit Ova/ODN1826/IFA-immunisierten IL20R2$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen festgestellt (Abb. 7C). Somit war gezeigt, dass die Ova/K^b-spezifische CD8-T-Zell-Antwort in DNA- und protein-immunisierten IL20R2$^{-/-}$-Mäusen signifikant erhöht war (Abb. 6 und Abb. 7).

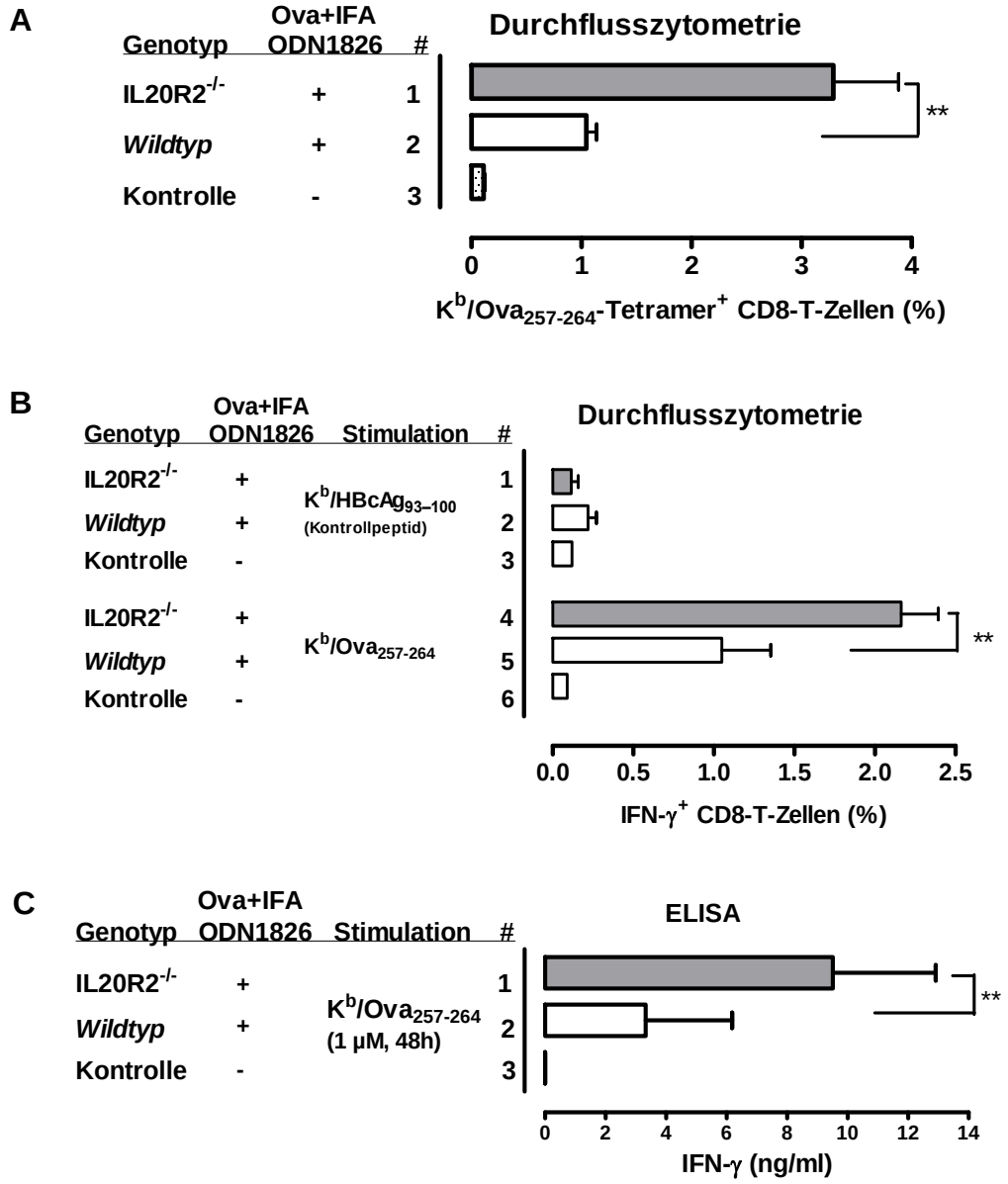


Abb. 7: **Antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort nach Protein-Immunisierung in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp-Mäus*en.** IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp-Mäus*e wurden s.c. (seitlich der Schwanzbasis) mit 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA oder mit IFA/PBS (Kontrolltiere) immunisiert. Die Milz bzw. Leber wurde am Tag 12 entnommen (Punkt 2.8). A) Zur Detektion der $K^b/Ova_{257-264}$-spezifischen CD8-T-Zellen wurden die isolierten NPC mit $K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer und anti-CD8-Antikörper angefärbt. B) Zur Detektion der IFN-γ^+ CD8-T-Zellen wurden die isolierten Milzzellen für 4 Stunden *ex vivo* mit $K^b/Ova_{257-264}$ oder dem Kontrollpeptid $K^b/HBcAg_{93-100}$ in Gegenwart von BFA restimuliert. Die Färbung erfolgte mit anti-CD8-Antikörper und anschließender intrazellulärer Färbung mit IFN-γ-Antikörper. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert und auf lebende CD8-T-Zellen *gegated*. C) Zur Bestimmung der antigenspezifischen IFN-γ-Produktion wurden die isolierten Milzzellen für 48 Stunden *ex vivo* mit $K^b/Ova_{257-264}$ restimuliert und anschließend im ELISA gemessen. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus A) zwei und B-C) drei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant, Mittelwerte (±SD).

3.3. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die T-Zell-gesteuerte Immunantwort im Mausmodell der DTH gegen Ova

3.3.1. Etablierung des DTH-Mausmodells gegen Ova nach DNA-Immunisierung mit pCI/Ova

Ein funktionelles Mausmodell zur Analyse von T-Zell-vermittelten Reaktionen in der Haut stellt die Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH) dar. Dieses Modell ist geeignet, da in der Haut sowohl die IL20R2-Rezeptorfamilie und die korrespondierenden Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 exprimiert werden als auch T-Zell-vermittelte Reaktionen während des *Primings* und der Effektorphase erfasst werden können. Die durch die T-Zellen induzierte lokale Entzündung der Haut kann im DTH-Modell als erythematöse Ohrschwellung gemessen werden. Zur Immunisierung (Sensibilisierungsphase bzw. *Priming* der T-Zellen) sowie zum Auslösen der Effektorphase der DTH wurde das Modellantigen Ova verwendet. Bei Letzterem wurde das Antigen in PBS gelöst und i.d. ins rechte Mausohr injiziert. Danach wurde PBS in das linke Ohr desselben Tiers injiziert. Die Ohrschwellung wurde nach folgender Formel berechnet: Δ Ohrschwellung = [(Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)] – [(Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)] (Punkt 2.6).

Zunächst wurde die effektive Antigenkonzentration im Ohr ermittelt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen des Antigens Ova (0, 10, 20, 50, 100 µg) i.d. in das Ohr von *Wildtyp*-Mäusen injiziert. Die Ohrschwellung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen (24, 48 und 72 Stunden) gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Abb. 8 zeigt den Wert der maximalen Ohrschwellung, der 24 Stunden nach der Injektion gemessen wurde. Bei der Injektion von 10-20 µg Ova in das Ohr von *Wildtyp*-Mäusen (Abb. 8, Gruppe 2-3) und bei Kontrollmäusen (Abb. 8, Gruppe 1) wurde lediglich eine temporäre reversible Ohrschwellung gemessen. Im Gegensatz dazu stieg die Ohrschwellung bei der Injektion von 50 µg Ova ins Ohr (Abb. 8, Gruppe 4-5) im Vergleich zur Kontrollinjektion (Abb. 8, Gruppe 1) an, was auf eine unspezifische Schwellung zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Daten wurde in den folgenden Versuchen eine Antigenkonzentration von 10 µg Ova zum Auslösen einer DTH verwendet.

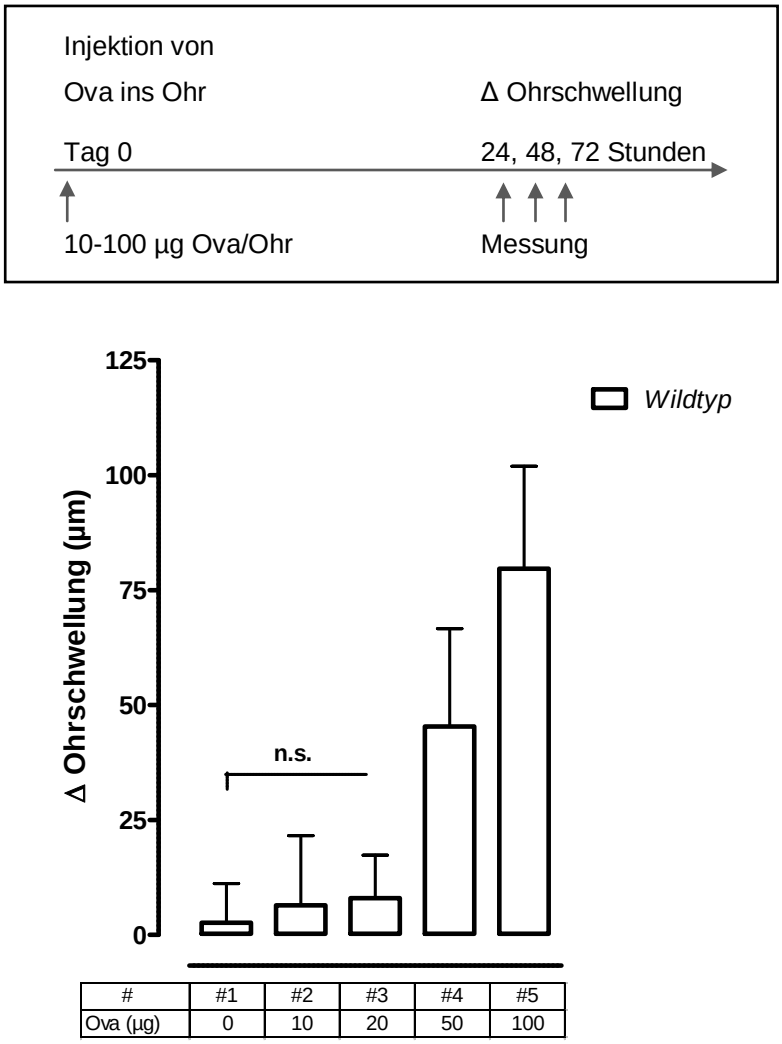


Abb. 8: **Ohrschwellung nach Injektion unterschiedlicher Ova-Konzentrationen ins Ohr.** In *Wildtyp-Mäus*e wurde i.d. 10, 20, 50 oder 100 µg Ova in das rechte Ohr und PBS in das linke Ohr injiziert (Gruppe 2-5). Als Kontrolle wurde PBS ins rechte und linke Mausohr desselben Tiers injiziert (Gruppe 1). Die Ohrschwellung wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen nach Injektion gemessen. Die Abb. zeigt die maximale Ohrschwellung 24 Stunden nach der Injektion. Die Δ Ohrschwellung wurde nach folgender Formel ermittelt: Δ Ohrschwellung = [(Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des rechten Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)] – [(Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{nach Injektion}}$) – (Ohrdicke des linken Ohrs $_{\text{vor Injektion}}$)]. Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von mindestens n=3 Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant.

Zunächst wurde die DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen etabliert. Die Mäuse wurden i.m. mit dem DNA-Plasmid pCI/Ova oder dem pCI-Vektor (Kontrolltiere) immunisiert. Die Effektorphase der DTH wurde durch i.d. Injektion von Ova ins Ohr ausgelöst. Die Ohrschwellung wurde 24, 48, 72 und 144 Stunden nach der Antigeninjektion gemessen und daraus die Δ Ohrschwellung ermittelt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass eine DTH in der Haut durch die i.d. Injektion von Ova

ins Ohr 12 Tage nach der Immunisierung mit pCI/Ova in *Wildtyp*-Mäusen ausgelöst werden kann. Die Entzündungsreaktion erreichte ihr Maximum 48 Stunden nach der Antigeninjektion ins Ohr und bildete sich anschließend vollständig zurück (Abb. 9). In Kontrollmäusen wurde lediglich eine temporäre reversible Ohrschwellung gemessen. Es ist bekannt, dass 12-14 Tage nach der DNA-Immunisierung von Mäusen die höchste Anzahl antigenspezifischer CD8-T-Zellen vorliegt. Eine DTH gegen Ova konnte durch die i.d. Ova-Injektion ins Ohr 5 Tage nach der Immunisierung mit pCI/Ova nicht ausgelöst werden (Abb. 9). In den folgenden Experimenten wurde daher die Effektorphase der DTH 12 Tage nach der DNA-Immunisierung der Mäuse induziert.

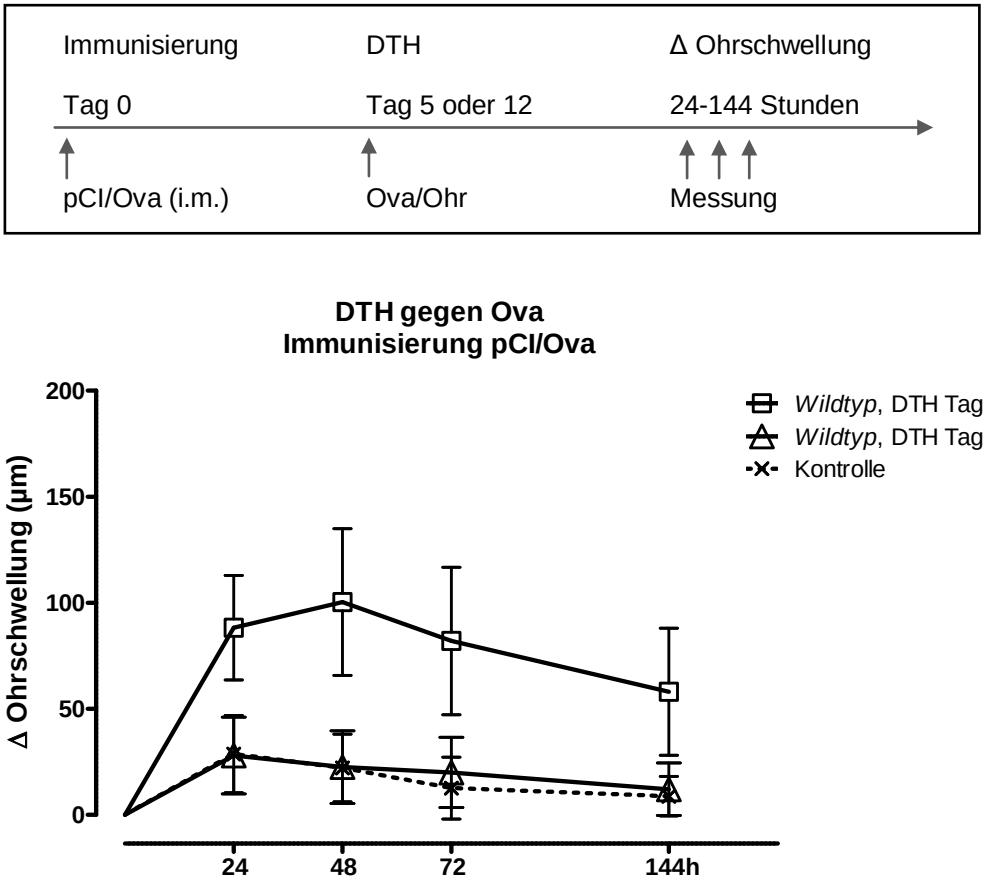


Abb. 9: **DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach pCI/Ova-Immunisierung.** *Wildtyp*-Mäuse wurden mit je 50 µg pCI/Ova oder pCI (Kontrolltiere) in PBS pro *Musculus tibialis anterior* immunisiert. Die DTH wurde 5 oder 12 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr derselben Maus injiziert. Die Ohrschwellung wurde 24, 48, 72 und 144 Stunden nach der Antigeninjektion gemessen. Die Δ Ohrschwellung wurde, wie unter Punkt 2.6 angegeben, berechnet. Dargestellt wurden die Mittelwerte (±SD) eines repräsentativen Experiments aus zwei unabhängigen Versuchen; Mittelwerte (±SD).

3.3.2. IL20R2-vermittelte Signale in B6-Mäusen vermindern die DTH gegen Ova nach DNA-Immunisierung mit pCI/Ova

Der Einfluss der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die T-Zell-gesteuerte DTH gegen Ova wurde durch ein Vergleich von IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen analysiert. Wie unter Punkt 3.3.1 etabliert, wurden beide Gruppen mit pCI/Ova immunisiert und die Effektorphase der DTH am Tag 12 durch Injektion von Ova ins Ohr ausgelöst. Die Δ Ohrschwellung wurde 24, 48 und 72 Stunden nach der Antigeninjektion ermittelt. IL20R2$^{-/-}$-Mäuse bildeten nach der Immunisierung mit pCI/Ova und dem Auslösen der Effektorphase mit Ova eine signifikant höhere Ohrschwellung aus im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen. In beiden Gruppen wurde die maximale Ausprägung 48 Stunden nach der Antigeninjektion ins Ohr gemessen (Abb. 10).

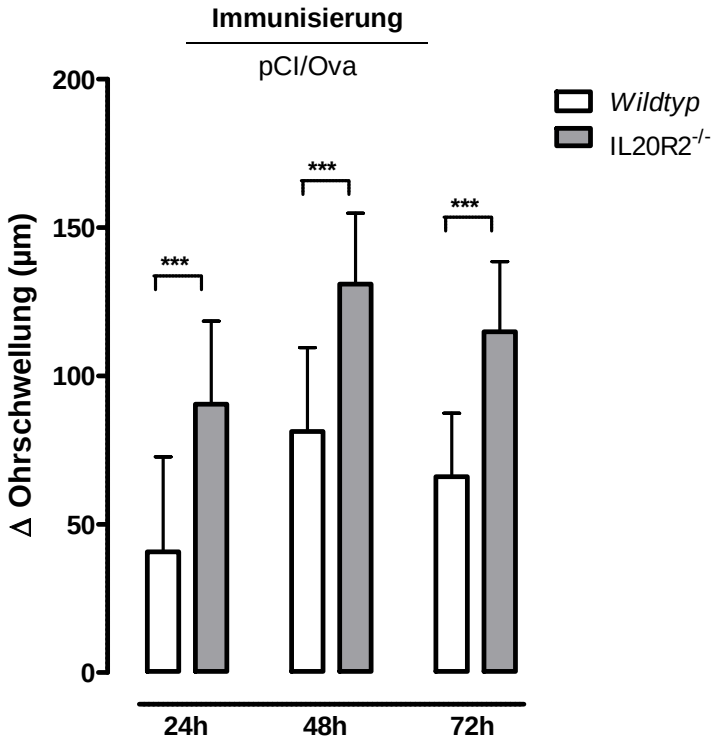
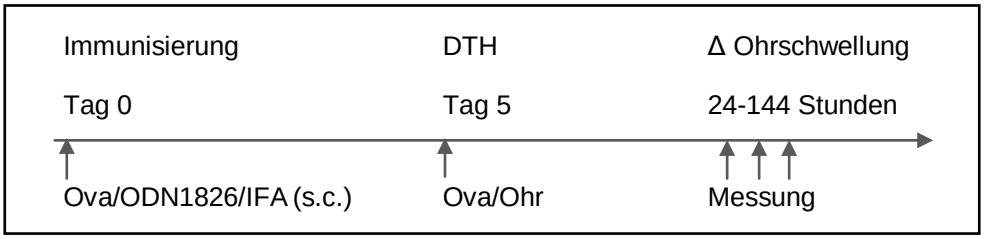


Abb. 10: **DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach pCI/Ova-Immunisierung.** IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit je 50 µg pCI/Ova in PBS pro *Musculus tibialis anterior* immunisiert. Die DTH wurde 12 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr derselben Maus injiziert. Die Ohrschwellung wurde 24, 48 und 72 Stunden nach der Antigeninjektion gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte (±SD) eines repräsentativen Experiments aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant.

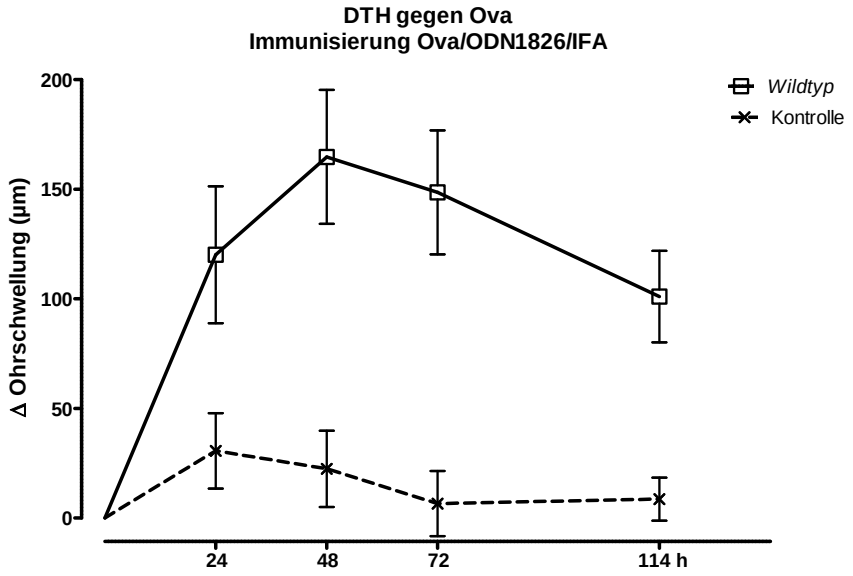
Mithin reagierten IL20R2-defiziente Mäuse in der DTH gegen Ova wesentlich sensitiver als *Wildtyp*-Mäuse. Dieses funktionelle Modell der DTH korreliert mit der erhöhten Ova-spezifischen CD8-T-Zell-Antwort in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen (Punkt 3.2). Dies zeigt, dass in B6-Mäusen die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 über den IL20R2-Signalweg *in vivo* antigenspezifische T-Zell-Antworten supprimieren.

3.3.3. Etablierung des DTH-Mausmodells gegen Ova nach Protein-Immunisierung

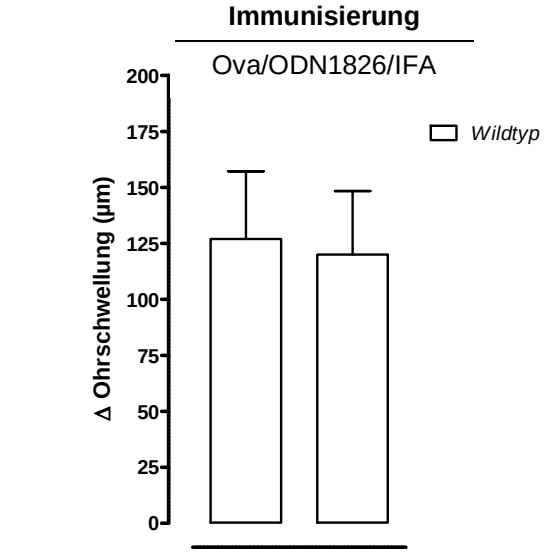
Im weiteren Schritt wurde die DTH der Haut auf das Allergen Ova nach Protein-Immunisierung der Mäuse charakterisiert. Dazu wurden *Wildtyp*-Mäuse mit Ova/ODN1826/IFA s.c. seitlich der Schwanzbasis immunisiert. Den Kontrolltieren wurde das gleiche Volumen PBS bzw. IFA/PBS injiziert. Die Effektorphase der DTH wurde durch i.d. Injektion des Antigens Ova in das Ohr ausgelöst und die Δ Ohrschwellung ermittelt (Punkt 3.2.1). Wie in der Literatur beschrieben, konnte 5 Tage nach der Protein-Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA die Effektorphase der DTH durch i.d. Injektion von Ova in das Ohr der Maus ausgelöst werden. Die Entzündungsreaktion erreichte ihr Maximum 48 Stunden nach der Antigeninjektion ins Ohr und die Schwellung bildete sich anschließend vollständig zurück (Abb. 11A). Die Kontrollmäuse wiesen durch die Injektion von Ova in das Ohr lediglich eine temporäre reversible Ohrschwellung auf. Zudem konnte die Effektorphase der DTH durch i.d. Ova-Injektion am Tag 30 nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA ausgelöst werden (Abb. 11B). Dies lässt vermuten, dass Gedächtniszellen (*memory response*) gebildet wurden.



A



B

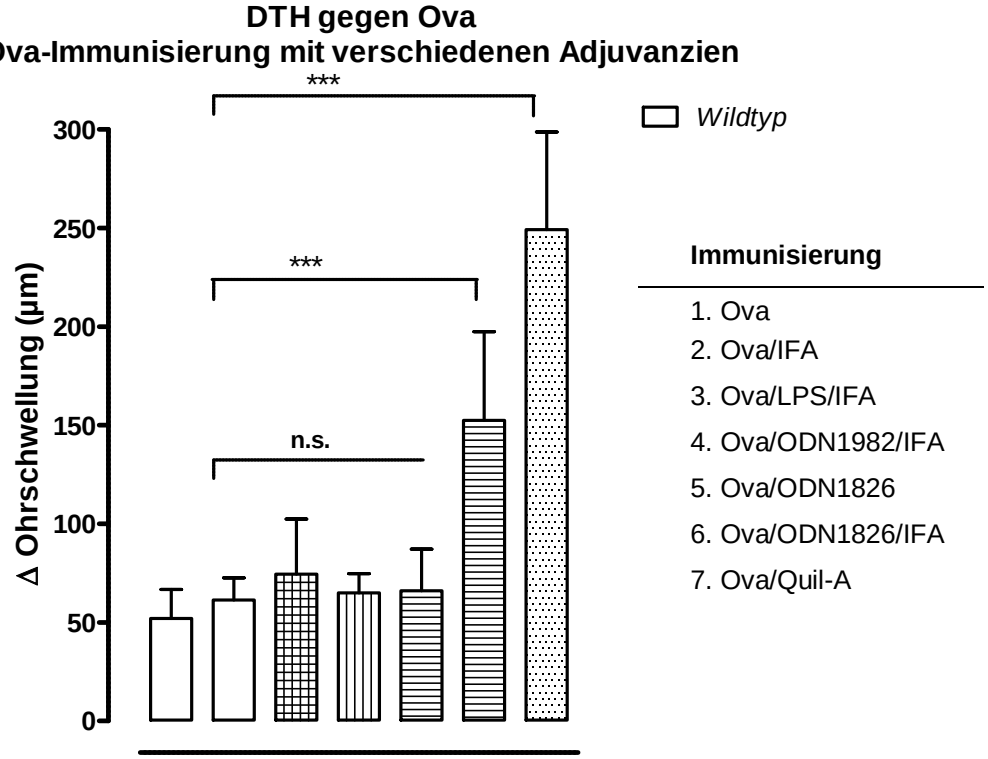


#	#1	#2
Immunisierung (Tag)	0	0
Effektorphase DTH (Tag)	5	30

Abb. 11: **DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung.** A) *Wildtyp*-Mäuse wurden s.c. mit 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA oder mit IFA/PBS (Kontrolltiere) immunisiert. Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Δ Ohrschwellung wurde 24, 48, 72 und 144 Stunden nach Induktion der DTH berechnet. B) Die Immunisierung der Mäuse erfolgte wie unter A angegeben. Die DTH wurde an den angegebenen Tagen nach der Immunisierung ausgelöst. Gezeigt ist die Ohrschwellung 48 Stunden nach Auslösen der DTH. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen. Mittelwerte (±SD).

3.3.3.1. Einfluss der Adjuvanzien auf die DTH gegen Ova nach Protein-Immunisierung

Im folgenden Punkt wurde nach weiteren Adjuvanzien gesucht, die geeignet sind eine effektive T-Zell-Antwort zu induzieren und somit eine DTH auszulösen. Dazu wurden *Wildtyp*-Mäuse mit Ova (Gruppe 1), Ova/IFA (Gruppe 2), Ova/LPS/IFA (Lipopolysaccharid, Gruppe 3), Ova/ODN1982/IFA (unmethyliertes Oligonukleotid ohne CpG-Motiv, Gruppe 4), Ova/ODN1826 (unmethyliertes CpG-Oligonukleotid, Gruppe 5), Ova/ODN1826/IFA (Gruppe 6) und Ova/Quil-A (Saponin, Gruppe 7) s.c. immunisiert (Punkt 2.5.1). Die Effektorphase der DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von Ova ins Ohr ausgelöst und die Δ Ohrschwellung ermittelt (Punkt 3.3.3).



#	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Ova	+	+	+	+	+	+	+
LPS	-	-	+	-	-	-	-
ODN1982	-	-	-	+	-	-	-
ODN1826	-	-	-	-	+	+	-
Quil-A	-	-	-	-	-	-	+
IFA	-	+	+	+	-	+	-

Abb. 12: **Einfluss der Adjuvanzien auf die Entwicklung der DTH.** *Wildtyp-Mäus*en wurde s.c. je 100 µl der Immunisierungslösung injiziert, die aus 50 µg Ova und Zugabe der folgenden Adjuvanzien besteht: ohne Adjuvans (Gruppe 1), IFA (Gruppe 2), 50 µg LPS und IFA (Gruppe 3),

50 µg ODN1982 und IFA (Gruppe 4), 50 µg ODN1826 (Gruppe 5), 50 µg ODN1826 und IFA (Gruppe 6), 30 µg Quil-A (Gruppe 7). Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Gezeigt ist die ∆ Ohrschwellung 48 Stunden nach der Ova-Injektion ins Ohr. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die Versuche der Gruppe 1 und Gruppe 5 wurde einmal durchgeführt, dabei wurde eine Anzahl von 5 Tieren (n=5) verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant, Mittelwerte (±SD). LPS: Lipopolysaccharid, ODN: unmethyliertes Oligonukleotid.

Dargestellt in Abb. 12 ist der Wert der 48 Stunden nach der Ova-Injektion ins Ohr gemessen wurde. Je nach verwendetem Adjuvans in der Immunisierungslösung wurde eine unterschiedlich starke Effektorphase der DTH (Ohrschwellung) gegen Ova induziert. Wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben, zeigten Ova/ODN1826/IFA-immunisierte *Wildtyp*-Mäuse nach der Ova-Injektion in das Ohr wiederum eine effektive Ohrschwellung (Abb. 12, Gruppe 6). Auch die Immunisierung der Mäuse mit Ova/Quil-A und anschließender Injektion von Ova ins Ohr löste eine starke lokale Immunreaktion in der Haut aus (Abb. 12, Gruppe 7). Dagegen konnte durch die i.d. Ova-Injektion keine effiziente Immunantwort in der Haut (Ohrschwellung) bei der Immunisierung der Mäuse mit Ova/PBS (Abb. 12, Gruppe 1), Ova/IFA (Abb. 12, Gruppe 2), Ova/LPS/IFA (Abb. 12, Gruppe 3), Ova/ODN1982/IFA (Abb. 12, Gruppe 4), Ova/ODN1826 (ohne IFA) (Abb. 12, Gruppe 5) induziert werden.

3.3.3.2. Rolle der CD8-T-Zellen in der Entwicklung der DTH gegen Ova nach Protein-Immunisierung

Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass die DTH eine T-Zell-abhängige Reaktion ist. Dennoch werden je nach verwendetem Antigen oder Applikationsweg unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen aktiviert. Bisher ist unklar, welche Immunzellen die DTH gegen das Antigen Ova induzieren. Im Folgenden wurde daher überprüft, ob T-Zellen, insbesondere CD8-T-Zellen, durch die Protein-Immunisierung der Mäuse mit Ova/ODN1826/IFA induziert werden und somit an der DTH gegen Ova beteiligt sind.

Zunächst wurde die DTH in RAG1$^{-/-}$-Mäusen ausgelöst. In RAG1-defizienten Mäusen ist das *V(D)*J rekombinationsaktivierende Gen RAG1 inaktiviert, sodass das Rearrangement von Antigen-Rezeptor-Gensegmenten der T- und B-Zell-

Reihe unterbleibt. Somit ist die Entwicklung reifer funktionstüchtiger T- und B-Lymphozyten verhindert. In Abb. 13A ist ein Vergleich des T- und B-Zell-Kompartiments von *Wildtyp*- und RAG1$^{-/-}$-Mäusen dargestellt. RAG1$^{-/-}$-Mäuse zeigten nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA und Auslösen der Effektorphase der DTH durch Injektion von Ova in das Ohr keine Reaktion (Abb. 13B). Dies zeigt, dass Zellen des adaptiven Immunsystems die DTH gegen Ova induzieren.

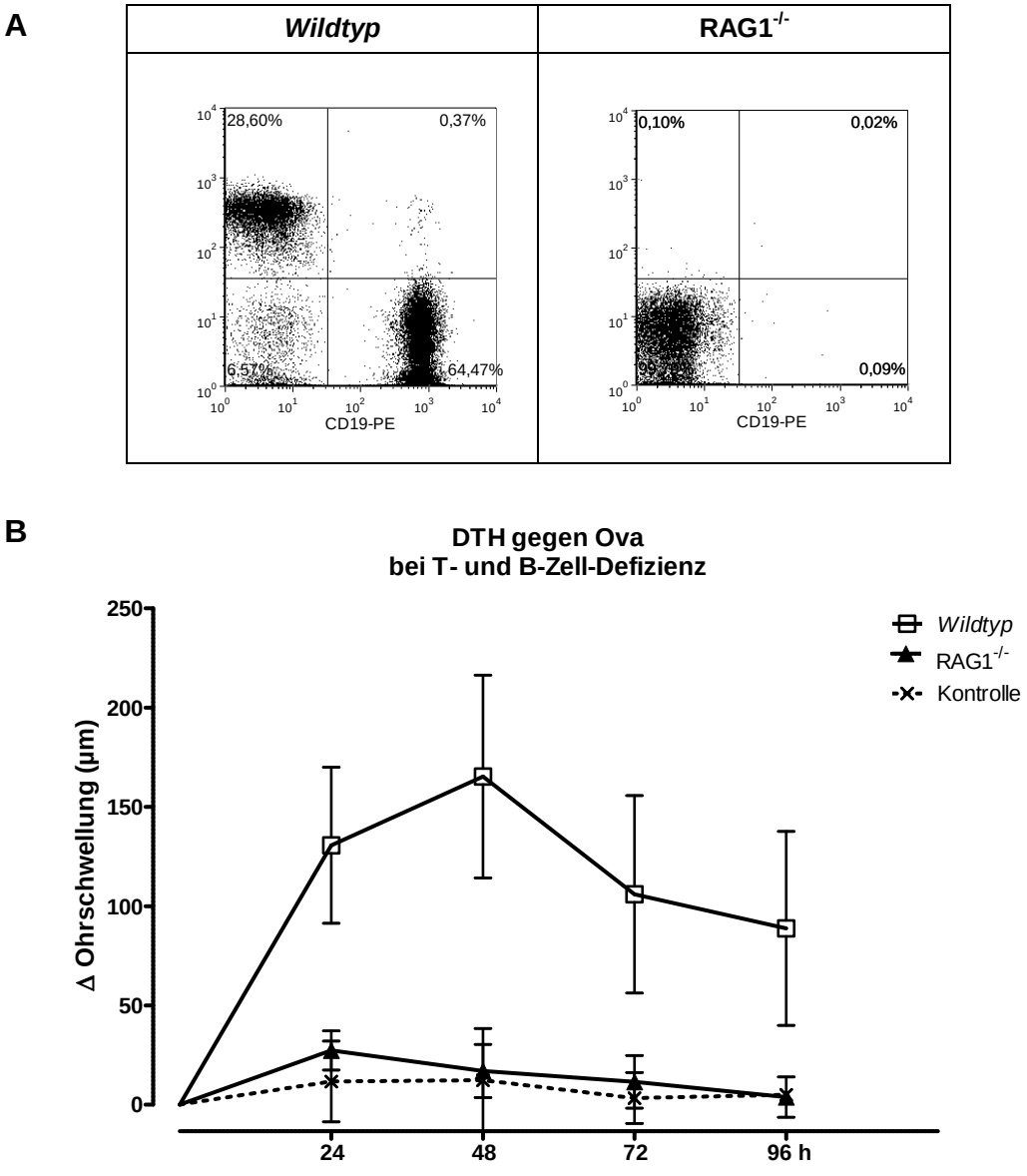
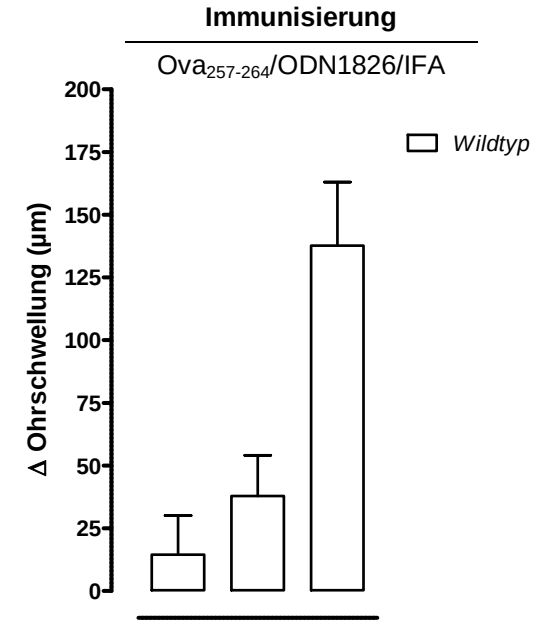


Abb. 13: **DTH gegen Ova in RAG1$^{-/-}$-Mäusen.** A) Von RAG1$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen wurden 50 µL Blut aus der *Vena caudalis mediana* entnommen (Tag 0). Zur Detektion der T-Zellen und B-Zellen wurden die isolierten Leukozyten mit anti-CD3- und anti-CD19-Antikörper angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten wurden mit FCS Express ausgewertet und auf lebende Lymphozyten *gegated*. B) RAG1$^{-/-}$-Mäuse und *Wildtyp*-Mäuse wurden s.c. mit 50 µg Ova und 50 µg

ODN1826 in IFA oder IFA/PBS (Kontrollmäuse) immunisiert. Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Ohrschwellung wurde 24-96 Stunden nach der Antigeninjektion gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen; Mittelwerte (±SD).

Mit dem Peptid $K^b/Ova_{257-264}$ können spezifisch CD8-T-Zellen aktiviert werden. Deshalb wurde zusätzlich die Ausbildung der DTH gegen Ova 5 Tage nach der Immunisierung der *Wildtyp*-Mäuse mit $K^b/Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA untersucht. Dabei zeigte sich eine verminderte Ohrschwellung gegenüber den mit Ova/ODN1826/IFA-immunisierten Mäusen (Abb. 14). Die Höhe der Ohrschwellung unterschied sich nicht bei der Injektion von Ova oder $K^b/Ova_{257-264}$ in das Ohr $K^b/Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA-immunisierter Mäuse. Die Immunisierung mit $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA konnte keine effektive CD8-T-Zell-Antwort induzieren.

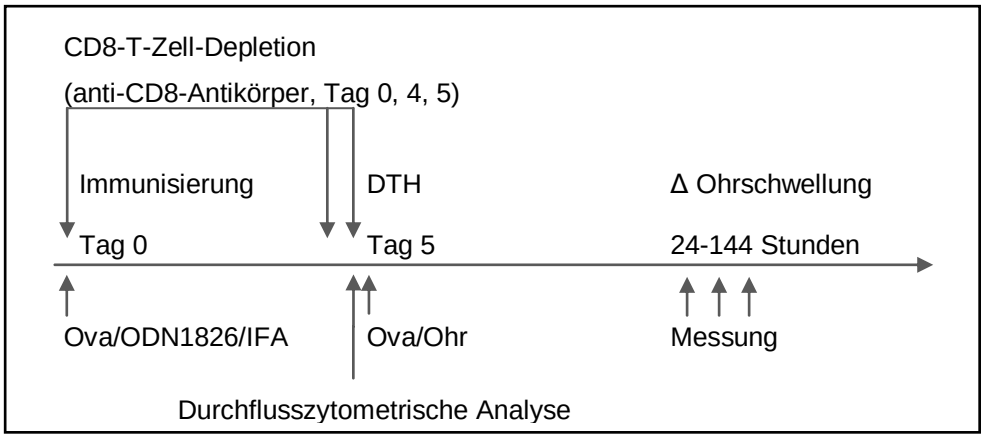


#	#1	#2	#3
$K^b/Ova_{257-264}$	-	+	-
Ova	-	-	+
ODN1826	-	+	+
IFA	+	+	+

Abb. 14: **DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung mit $K^b/Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA.** *Wildtyp*-Mäusen wurde s.c. je 100 µl der Immunisierungslösung injiziert, die aus 50 µg $K^b/Ova_{257-264}$ und 50 µg ODN1826 in IFA (Gruppe 2) oder 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA (Gruppe 3) besteht. Kontrolltieren wurde IFA/PBS injiziert (Gruppe 1). Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Gezeigt ist die Ohrschwellung 48 Stunden

nach Auslösen der DTH. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen; Mittelwerte (±SD).

Zur Überprüfung, ob die CD8-T-Zellen an der DTH gegen Ova beteiligt sind, d.h. die Effektorzellen dieser Reaktion darstellen, wurden die CD8-T-Zellen von *Wildtyp*-Mäusen depletiert. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Ova/ODN1826/IFA immunisiert (Tag 0). Zur Depletion der CD8-T-Zellen wurde einer Gruppe 300 µg des anti-CD8-Antikörpers (Klon YTS-169) i.p. an Tag 0, Tag 4 und Tag 5 nach der Immunisierung injiziert (Punkt 2.5.2). Die andere Gruppe wurde nicht mit dem Antikörper behandelt. Die DTH wurde am Tag 5 durch i.d. Injektion von Ova ins Ohr ausgelöst und die Δ Ohrschwellung gemessen. Die vollständige Depletion der CD8-T-Zellen in den Mäusen wurde unmittelbar vor Auslösen der DTH im Durchflusszytometer überprüft (Abb. 15A). Die Gruppe, deren CD8-T-Zellen depletiert waren, bildete eine verminderte DTH gegen Ova aus im Vergleich zu Mäusen mit CD8-T-Zellen (Abb. 15B). Dies zeigt, dass Ova-spezifische CD8-T-Effektorzellen die DTH gegen Ova induzieren.



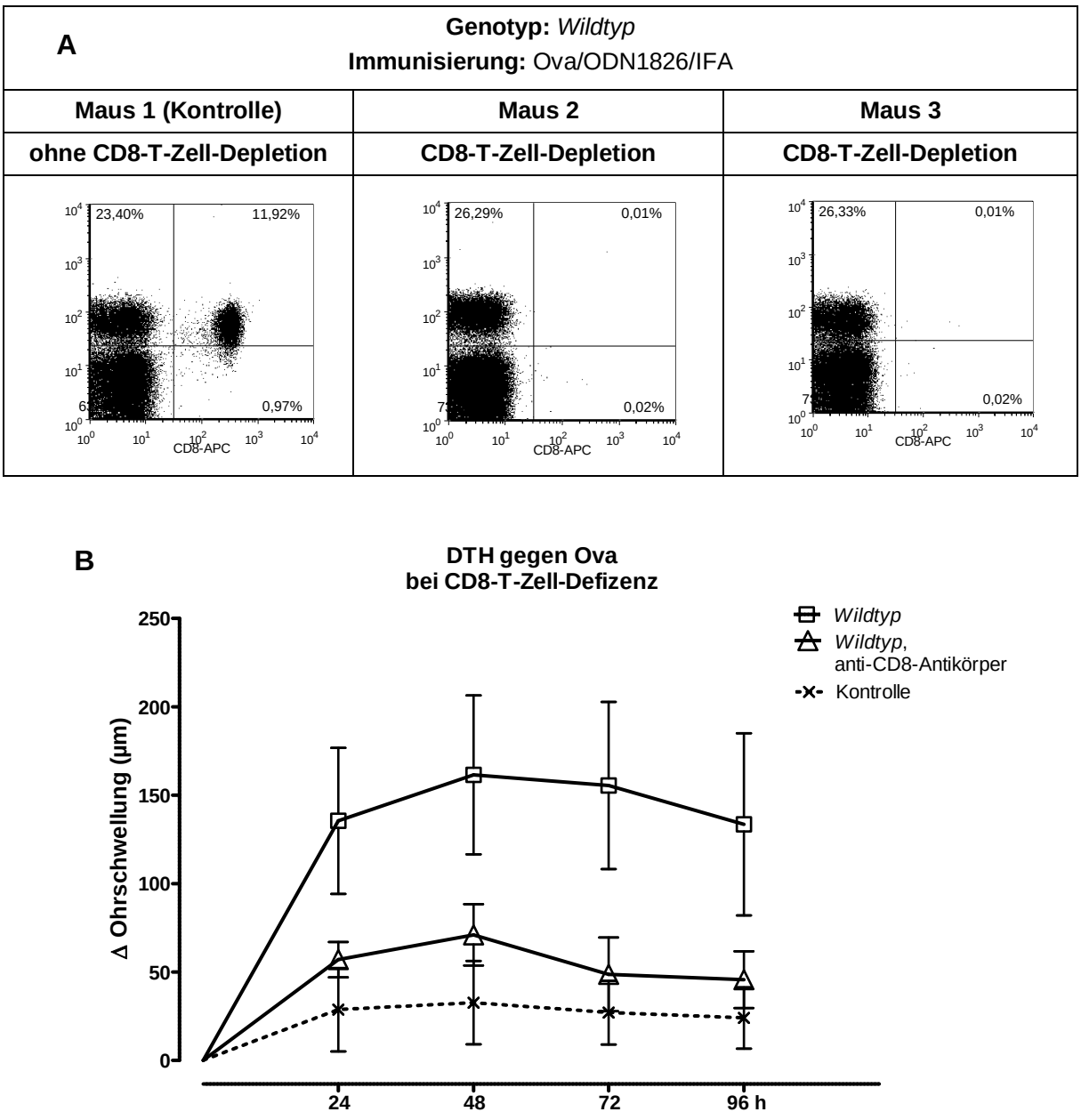


Abb. 15: **DTH gegen Ova nach CD8-T-Zell-Depletion.** *Wildtyp*-Mäuse (n=7) wurden s.c. mit 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA oder mit IFA/PBS (Kontrollmäuse) immunisiert (Tag 0). Zur Depletion der CD8-T-Zellen wurde einer Gruppe (n=2) 300 µg des anti-CD8-Antikörpers i.p. an Tag 0, Tag 4 und Tag 5 nach der Immunisierung injiziert. A) Am Tag 5 (vor Auslösen der DTH) wurden pro Maus 50 µL Blut aus der *Vena caudalis mediana* entnommen. Zur Detektion der CD8-T-Zellen wurden die isolierten Leukozyten mit anti-CD3- und anti-CD8-Antikörper angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten wurden mit FCS Express ausgewertet und auf lebende Lymphozyten *gegated*. B) Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Ohrschwellung wurde 24-96 Stunden nach Antigeninjektion gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt; Mittelwerte (±SD).

3.3.4. IL20R2-vermittelte Signale in B6-Mäusen vermindern die DTH gegen Ova nach Protein-Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA

Im nächsten Punkt sollte geklärt werden, ob IL20R2-vermittelte Signale einen Einfluss auf die CD8-T-Zell-induzierte Entwicklung einer DTH der Haut nach Protein-Immunisierung der Mäuse haben.

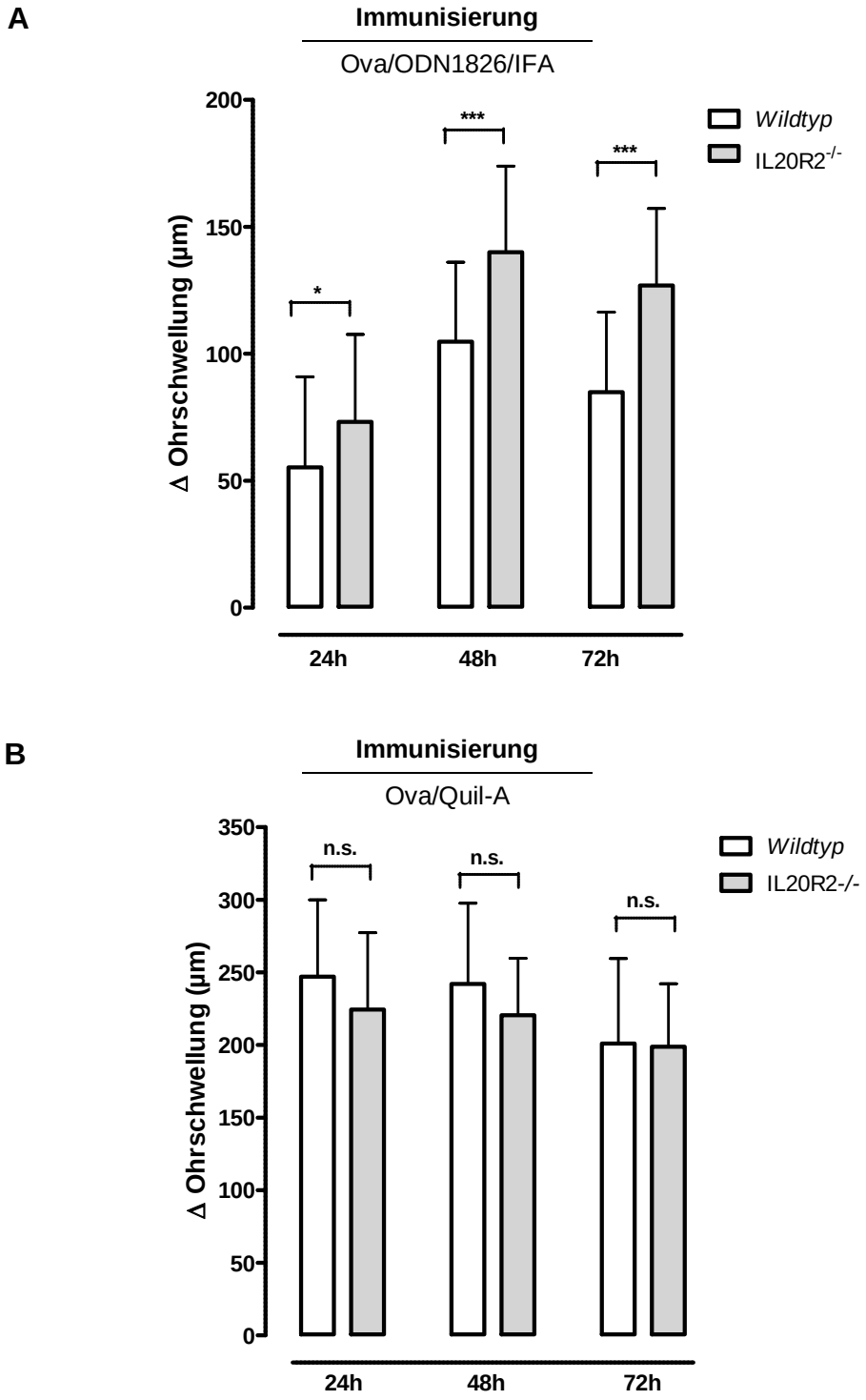


Abb. 16: **DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen nach Protein-Immunisierung.** IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden s.c. mit A) 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA und B) 50

µg Ova und 30 µg Quil-A immunisiert. Die DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Ohrschwellung wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Antigeninjektion gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte (±SD) eines repräsentativen Experiments aus A) vier und B) zwei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant.

IL20R2-defiziente und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit den unter Punkt 3.3.3.1 getesteten Immunisierungslösungen Ova/ODN1826/IFA oder Ova/Quil-A immunisiert. Die Effektorphase der DTH wurde 5 Tage nach der Immunisierung durch Injektion von Ova in das Ohr ausgelöst und die Δ Ohrschwellung ermittelt. IL20R2$^{-/-}$-Mäuse wiesen nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA und anschließendem Auslösen der Effektorphase der DTH mit Ova eine signifikant höhere Ohrschwellung im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen auf. In beiden Gruppen (IL20R2$^{-/-}$ und *Wildtyp*) wurde die maximale Ausprägung 48 Stunden nach der Injektion von Ova ins Ohr erreicht und bildete sich danach zurück (Abb. 16A). Dagegen konnte kein Unterschied in der Ausbildung der DTH gegen Ova zwischen IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen festgestellt werden, wenn die Immunisierung der Mäuse mit Ova/Quil-A erfolgte. Die Kinetik der DTH verlief in beiden Gruppen übereinstimmend (Abb. 16B). Wie auch aus Abb. 12 ersichtlich, löste die Immunisierung mit Ova/Quil-A eine starke Entzündungsreaktion im Ohr aus.

Somit war gezeigt, dass bei pCI/Ova-DNA- und Ova/ODN1826/IFA-immunisierten Mäusen im funktionellen Modell der DTH eine signifikant höhere Entzündungsreaktion (Ohrschwellung nach i.d. Ova-Injektion) in IL20R2$^{-/-}$- Mäusen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen auftrat.

3.3.5. Genexpression der Zytokine der IL-20-Familie während der lokalen Entzündungsreaktion der Haut im Mausmodell der DTH

Die Zytokine der IL-20-Familie werden bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen vermehrt exprimiert. Mittels des DTH-Modells wurde die Genexpression der IL20R2-interagierenden Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 sowie des Zytokins IL-22 (Mitglied der IL-10-Familie) während der lokalen Inflammation der Haut untersucht.

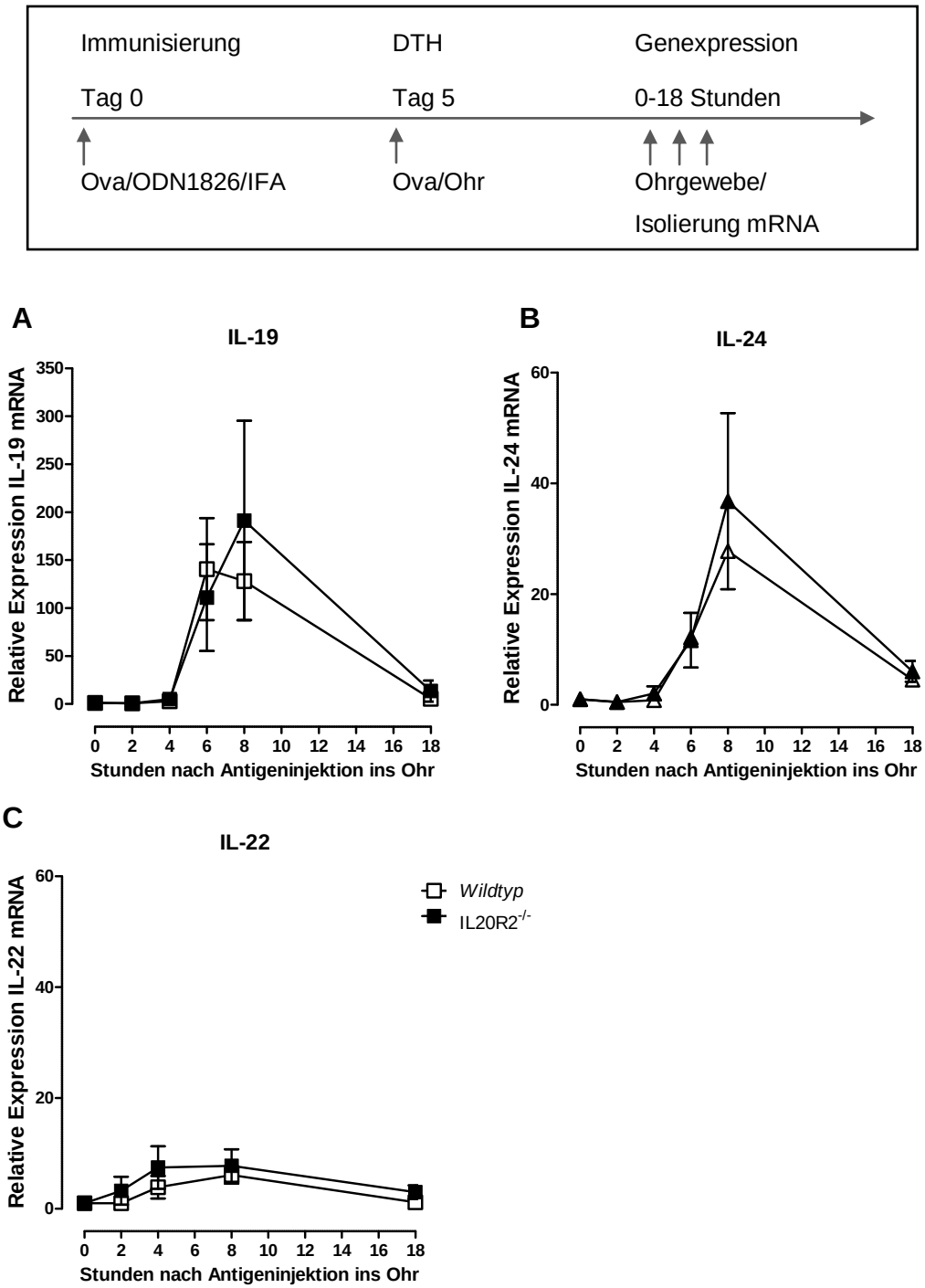


Abb. 17: **Genexpression der Zytokine der IL-10-Familie während der DTH.** IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden s.c. mit 50 µg Ova und 50 µg ODN1826 in IFA immunisiert. Am Tag 5 erfolgte die i.d. Injektion von 10 µg Ova ins Ohr. Die Gewebeproben (Ohren) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Ova-Injektion entnommen und anschließend die mRNA isoliert. Die relative Expression der A) IL-19-, B) IL-24- und C) IL-22-Transkripte wurde mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte (±SD) eines repräsentativen Experiments aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant.

Wildtyp- und IL20R2$^{-/-}$-Mäuse wurden mit Ova/ODN1826/IFA immunisiert und 5 Tage später Ova ins Ohr injiziert. Die Genexpression der Zytokine in der Haut (Ohrgewebe) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der lokalen Inflammation bestimmt (Punkt 2.10). Die höchste Expression der IL-19- und IL-24-Transkripte wurde 6-8 Stunden nach der Induktion der DTH gegen Ova nachgewiesen (Abb. 17A-B). Die Genexpression des Zytokins IL-20 war unterhalb der Nachweisgrenze. Die IL-22-Transkripte wurden nur in geringen Mengen während der Entzündungsreaktion exprimiert (Abb. 17C). Die relative Expression der IL-19-, IL-20-, IL-22- und IL-24-mRNA war in *Wildtyp*- und IL20R2$^{-/-}$-Mäusen gleich (Abb. 17A-C). Die Injektion von PBS in das Ohr immunisierter Mäuse löste keine Expression der Zytokine in der Haut aus.

3.3.6. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die Effektorphase der DTH im OT-I-basierten Mausmodell und im adoptiven Transfermodell der DTH

Eine immunregulatorische Funktion der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf das *Priming* der CD8-T-Zellen wurde bereits gezeigt. Dabei wurde eine unterschiedliche Anzahl an antigenspezifischen CD8-T-Zelen in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen induziert (Abb. 6, Abb. 7), die in einer veränderten Effektorfunktion der CD8-T-Zellen im DTH-Modell gegen Ova resultierte (Abb. 10, Abb. 16). Um den Effekt der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die CD8-T-Zellen weiter zu analysieren, wurde die Effektorfunktion der CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen im DTH-Modell untersucht. OT-I-Mäuse exprimieren selektiv einen tg CD8-TCR, der ganz spezifisch mit Ova$_{257-264}$-beladene K^b-Moleküle erkennt. Vorteil des OT-I-basierten Mausmodells ist, dass aufgrund des Ova$_{257-264}$-spezifischen tg CD8-TCR die Effektorphase der DTH in den Mäusen durch die Ova-Injektion in die Haut (Ohr) direkt ausgelöst werden kann. Ova stellt in dieser Reaktion ein exogenes Antigen dar, das vermutlich über Kreuzpräsentation CD8-T-Zellen aktivieren kann. Die CD8-T-Zellen liegen in diesem Modell im naiven Zustand vor. Zudem sind in IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen eine gleiche Anzahl antigenspezifischer tg CD8-T-Zellen vorhanden. Die Injektion von Ova in das Ohr von IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen verursachte eine Entzündungsreaktion im Ohr (Schwellung). Die DTH gegen Ova wird somit durch die Aktivierung der naiven Ova$_{257-264}$-TCR-tg CD8-T-Zellen induziert. Interessanterweise bildeten IL20R2$^{-/-}$/OT-I-Mäuse eine signifikant höhere DTH

gegen das i.d. injizierte Ova aus als OT-I-Mäuse. Die Entzündungsreaktion erreichte ihr Maximum 48-72 Stunden nach der Antigeninjektion ins Ohr und bildete sich anschließend in beiden Gruppen zurück (Abb. 18).

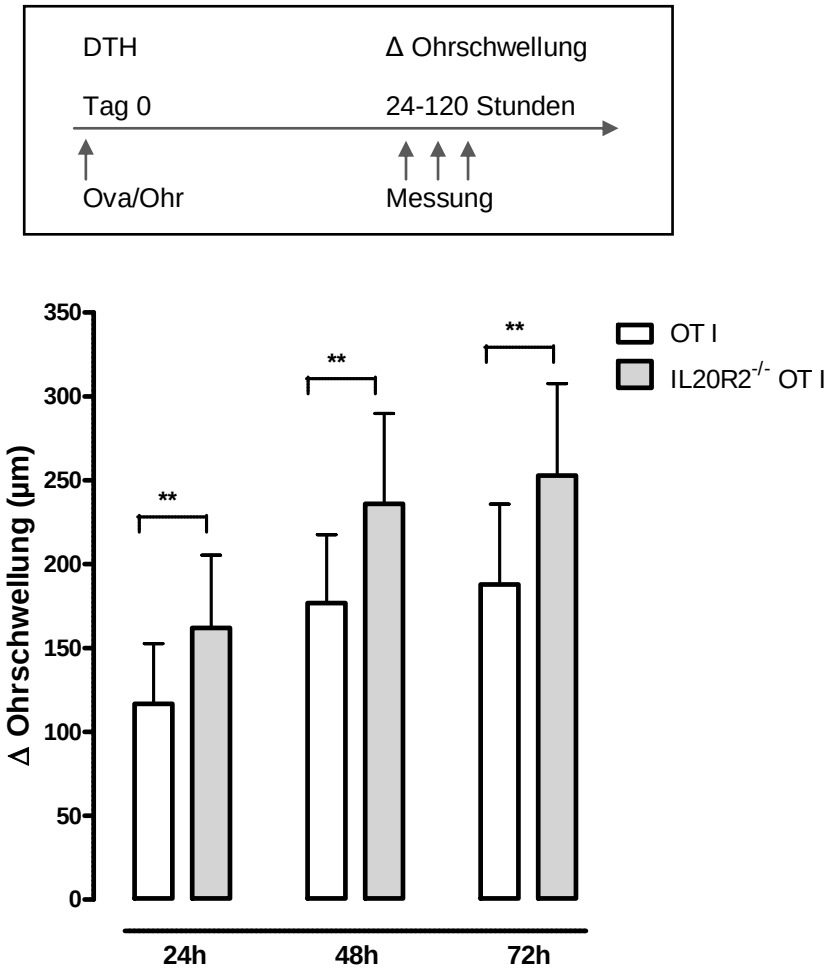
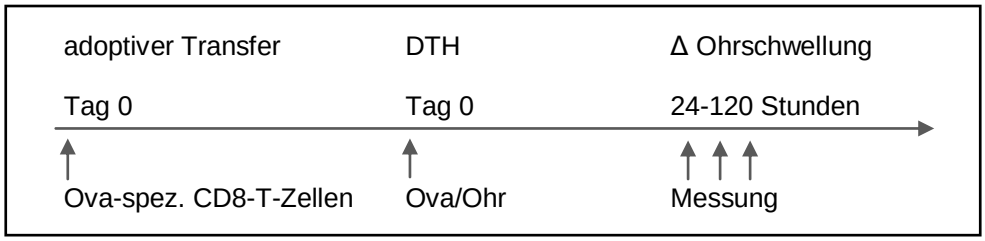


Abb. 18: **DTH gegen Ova in IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-transgenen Mäusen.** Die DTH in IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen wurde am Tag 0 (ohne vorherige Immunisierung) durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Ohrschwellung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Antigeninjektion gemessen und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Dargestellt wurde je ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant, Mittelwerte (±SD).

Die Unterschiede in der DTH von IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen sind vermutlich nicht durch die CD8-T-Effektorzellen direkt verursacht. Die beiden Mausgruppen unterscheiden sich durch eine IL20R2-Defizienz der APC oder Haut-Epithelzellen. Demnach könnte in der IL20R2-defizienten OT-I-Maus die gesteigerte Effektorfunktion der CD8-T-Zellen durch die fehlenden Signale von IL-

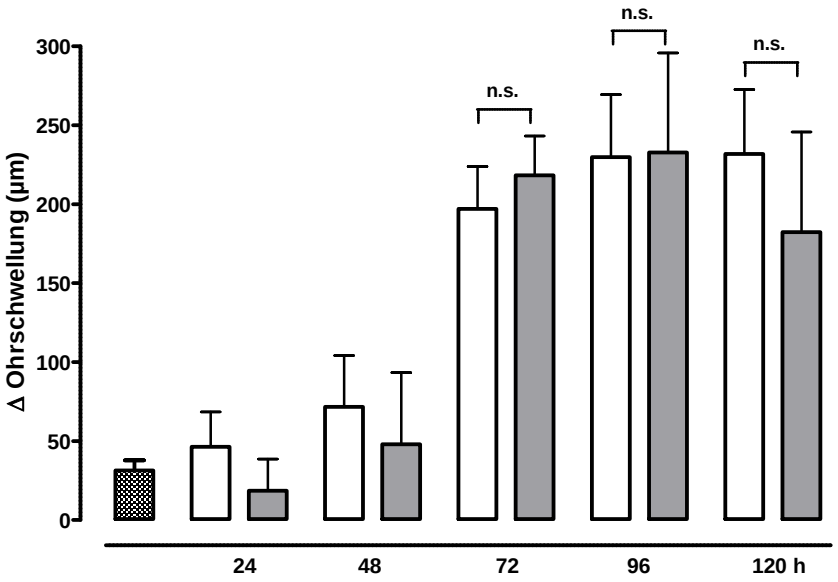
19, IL-20 und/oder IL-24 in den APC oder den Haut-Epithelzellen verursacht werden. Im nächsten Punkt wurde überprüft, wie die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 die Aktivierung der Ova-spezifischen (OT-I) CD8-T-Zellen beeinflussen. Dazu wurden IL20R2-defiziente ($IL20R2^{-/-}$) und IL20R2-kompetente ($IL20R2^{+/+}$) CD8-T-Zellen aus $IL20R2^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen verwendet und im adoptiven Transfermodell der DTH (Effektorphase) untersucht. Die Milzzellen dieser Tiere wurden isoliert und mit 3 µg/ml des Peptids $K^b/Ova_{257-264}$ für 72 Stunden *in vitro*-stimuliert (Punkt 2.8.4). Dadurch wurde eine gleiche Anzahl aktivierter $IL20R2^{-/-}$- und $IL20R2^{+/+}$- (OT-I) CD8-T-Zellen induziert. Die *in vitro*-aktivierten CD8-T-Zellen wurden mittels MACS-Aufreinigung isoliert. $3x10^6$ Zellen wurden i.v. in die *Vena caudalis mediana* der *Wildtyp* (B6)-Rezipienten adoptiv transferiert (Punkt 2.8.3). Die DTH wurde unmittelbar nach dem adoptiven Transfer (Tag 0) durch Injektion von Ova in das Ohr der Rezipienten ausgelöst und die Δ Ohrschwellung ermittelt. Endogene Ova-spezifische T-Zellen des Rezipienten lagen zu diesem Zeitpunkt (Tag 0) nicht vor. Zudem stimmen die APC und Haut-Epithelzellen im Rezipienten in Bezug auf die IL20R2-Kompetenz überein. Bei dem adoptiven Transfer *in vitro*-aktivierter Ova-spezifischer (OT-I) $IL20R2^{-/-}$- oder $IL20R2^{+/+}$-CD8-T-Zellen in *Wildtyp*-Rezipienten wurde in den Rezipienten nach der Ova-Injektion in das Ohr kein Unterschied in der Ausbildung der Effektorphase der DTH (Höhe der Ohrschwellung) festgestellt (Abb. 19). Die maximale Ohrschwellung wurde 72-96 Stunden nach der Ova-Injektion ins Ohr gemessen. Da bei einer gleichen Anzahl aktivierter $IL20R2^{-/-}$- oder $IL20R2^{+/+}$- (OT-I) CD8-T-Zellen in den *Wildtyp*-Rezipienten keine Unterschiede in der DTH auftraten, zeigte dies, dass aktivierte IL20R2-defiziente und IL20R2-kompetente CD8-T-Zellen eine sehr ähnliche Effektorfunktion in der DTH ausüben.



A

Rezipient: *Wildtyp* (B6)

Donor: $K^b/Ova_{257-264}$-aktivierte CD8-T-Zellen von
□ OT-I, □ IL20R2$^{-/-}$/OT-I, ▒ Kontrolle (ohne Transfer)



B

Rezipient: *Wildtyp* (B6)

Donor: naive Ova-spezifische CD8-T-Zellen von
□ OT-I, ▒ Kontrolle (ohne Transfer)

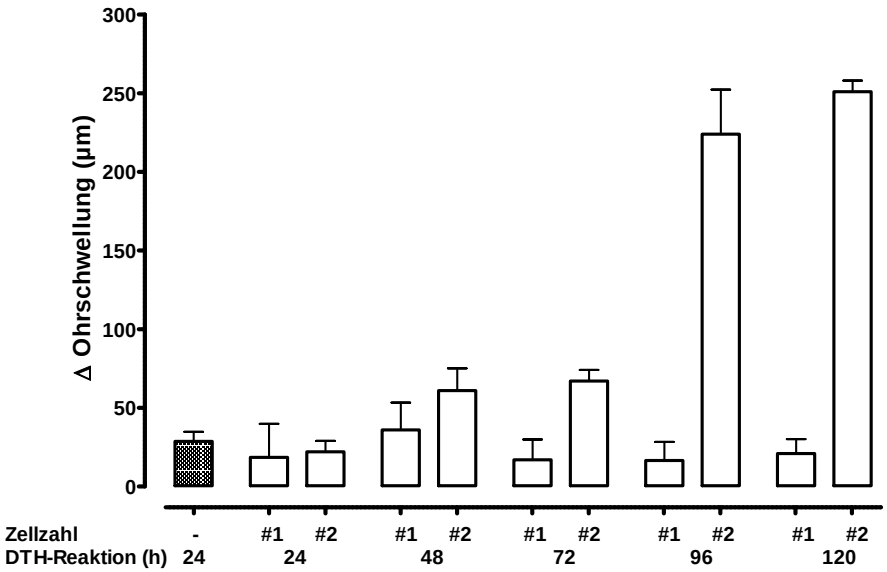


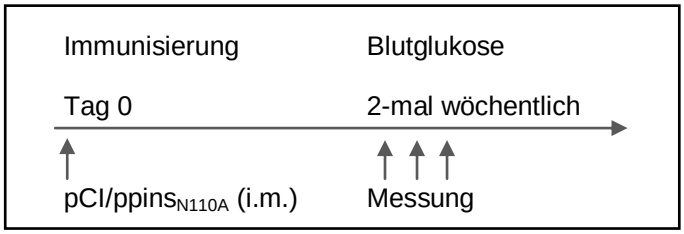
Abb. 19: **DTH gegen Ova in *Wildtyp*-Mäusen nach adoptiven Transfer *in vitro*-stimulierter oder naiver Ova-spezifischer CD8-T-Zellen aus IL20R2$^{-/-}$/OT-I- oder OT-I-transgenen Mäusen.** A) Die Milzzellen aus IL20R2$^{-/-}$/OT-I- oder OT-I-Mäusen wurden isoliert und *in vitro* mit 3 µg/ml des Peptids $K^b/Ova_{257-264}$ für 72 Stunden bei 37 °C/ 5 % CO_2 stimuliert. Die CD8-T-Zellen wurden isoliert (MACS-Aufreinigung) und 3x10^6 Ova-spezifische IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen adoptiv in *Wildtyp-Mäus*e transferiert (*Vena caudalis mediana*). Die DTH der *Wildtyp-Mäus*e wurde unmittelbar nach dem Transfer der Zellen (Tag 0) durch i.d. Injektion von 10 µg Ova in das rechte Ohr ausgelöst und PBS in das linke Ohr injiziert. Die Ohrschwellung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Antigeninjektion gemessen und die ∆ Ohrschwellung ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant, Mittelwerte (±SD). B) Ova-spezifische CD8-T-Zellen wurden aus den Milzzellen von OT-I-Mäusen (MACS-Aufreinigung) isoliert. 3x10^6 (Gruppe 1) oder 1x10^7 (Gruppe 2) CD8-T-Zellen wurden adoptiv in *Wildtyp-Mäus*e transferiert (*Vena caudalis mediana*). Die DTH wurde wie unter A beschrieben ausgelöst und die ∆ Ohrschwellung berechnet.

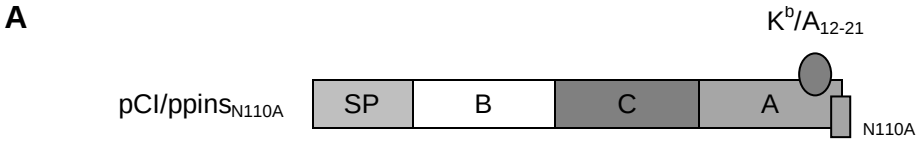
Zudem wurde die Effektorphase der DTH gegen Ova im Rezipienten untersucht, die durch die Aktivierung adoptiv transferierter naiver CD8-T-Zellen entsteht. Dazu wurden naive Ova-spezifische CD8-T-Zellen von OT-I-Donormäusen verwendet. Die Milz der OT-I-Mäuse wurde entnommen und die Ova-spezifischen CD8-T-Zellen mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die angegebene Zellzahl wurde i.v. in die *Wildtyp*-Rezipienten adoptiv transferiert (Punkt 2.8.3). Die DTH wurde unmittelbar nach dem adoptiven Transfer (Tag 0) durch Injektion von Ova in das Ohr ausgelöst und die ∆ Ohrschwellung ermittelt. Bei dem adoptiven Transfer naiver Ova-spezifischer CD8-T-Zellen (Zellzahl 1x10^7) aus OT-I-Donormäusen bildete sich die Entzündungsreaktion der Haut (Anstieg der Ohrschwellung) in den *Wildtyp*-Rezipienten 96 Stunden nach der i.d. Ova-Injektion aus. Bei einer transferierten Zellzahl von 3x10^6 Zellen konnte nach der i.d. Ova-Injektion ins Ohr der Rezipienten keine Ohrschwellung gemessen werden. Ein Vergleich von adoptiv transferierten IL20R2$^{-/-}$- und IL20R2$^{+/+}$-Ova-spezifischen CD8-T-Zellen wurde daher nicht durchgeführt.

3.4. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die T-Zell-gesteuerte Immunreaktion im Mausmodell des Diabetes mellitus Typ I

3.4.1. Einfluss der IL20R2-vermittelten Signale auf die Induktion und Aktivierung autoreaktiver CD8-T-Zellen im Mausmodell des EAD

Ergänzend zur DTH wurde als weiteres funktionelles Modell zur Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale auf CD8-T-Zell-Antworten das Modell des experimentellen Autoimmundiabetes (EAD) gewählt. Der EAD, ein *in vivo* Mausmodell für Diabetes mellitus Typ I, ist charakterisiert durch autoreaktive CD8-T-Zellen, die zur Zerstörung der insulinproduzierenden pankreatischen β-Zellen führt. In Folge kommt es zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration (Hyperglykämie).





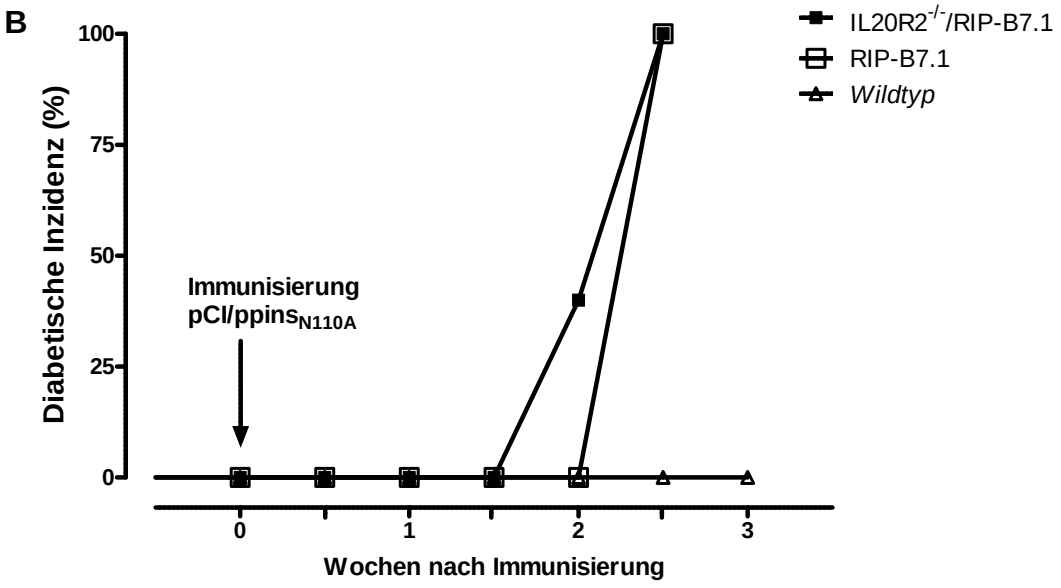


Abb. 20: **Diabetes-Induktion in IL20R2$^{-/-}$/RIP-B7.1- und RIP-B7.1-Mäusen nach Immunisierung mit pCI/ppins$_{N110A}$** A) Dargestellt ist das ppins-kodierende DNA-Konstrukt pCI/ppins$_{N110A}$ mit dem K^b-spezifischen Epitop K^b/A$_{12-21}$. pCI/ppins$_{N110A}$ enthält die Sequenz des Präproinsulins mit Signalpeptid (SP), der B-, C- und A-Kette. Am N-Terminus der A-Kette wurde die Aminosäure 21 Asparagin (N) gegen Alanin (A) substituiert. B) IL20R2$^{-/-}$/RIP-B.7.1 oder RIP-B7.1-Mäuse wurden mit 50 µg pCI/ppins$_{N110A}$ in PBS pro *Musculus tibialis anterior* immunisiert (Tag 0) (Punkt 2.5.1). Die Blutglukosekonzentration wurde 2-mal pro Woche gemessen und die diabetische Inzidenz berechnet. Die diabetische Inzidenz bezeichnet das Verhältnis diabetischer zu nicht-diabetischen Tieren (Punkt 2.7). Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Zuerst wurden Immunisierungsstudien in RIP-B7.1-Mäusen durchgeführt. RIP-B7.1-Mäuse exprimieren das kostimulatorische Molekül B7.1 (CD80) unter Kontrolle des RIP auf den β-Zellen des Pankreas. Zur Induktion des EAD wurden IL20R2$^{-/-}$/RIP-B.1 und RIP-B7.1-Mäuse mit dem DNA-Konstrukt pCI/ppins$_{N110A}$ (kodiert für Präproinsulin) immunisiert (Punkt 2.5.1). Die Blutglukosekonzentration der Mäuse wurde 2-mal pro Woche gemessen und anschließend die diabetische Inzidenz berechnet (Punkt 2.7). 2-3 Wochen nach der Immunisierung mit pCI/ppins$_{N110A}$ entwickelten 100 % der RIP-B7.1- und IL20R2$^{-/-}$/RIP-B7.1-Mäuse einen voll ausgeprägten EAD. *Wildtyp*-B6-Mäuse dagegen entwickelten keinen EAD, da ihnen das kostimulatorische Signal B7.1 auf den β-Zellen des Pankreas fehlt (Abb. 20). Der IL20R2-Signalweiterleitung konnte im EAD-Modell, keine eindeutige Rolle in der Regulierung der CD8-T-Zellen zugeschrieben werden.

3.4.2. Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf CD8-T-Zellen im adoptiven Transfermodell des EAD

Im DTH-Modell konnte kein direkter Einfluss der Zytokine der IL-20-Familie auf die CD8-T-Effektorfunktion festgestellt werden (Abb. 19). Um dies zu charakterisieren wurde ein adoptives Transfersystem im EAD-Modell etabliert.

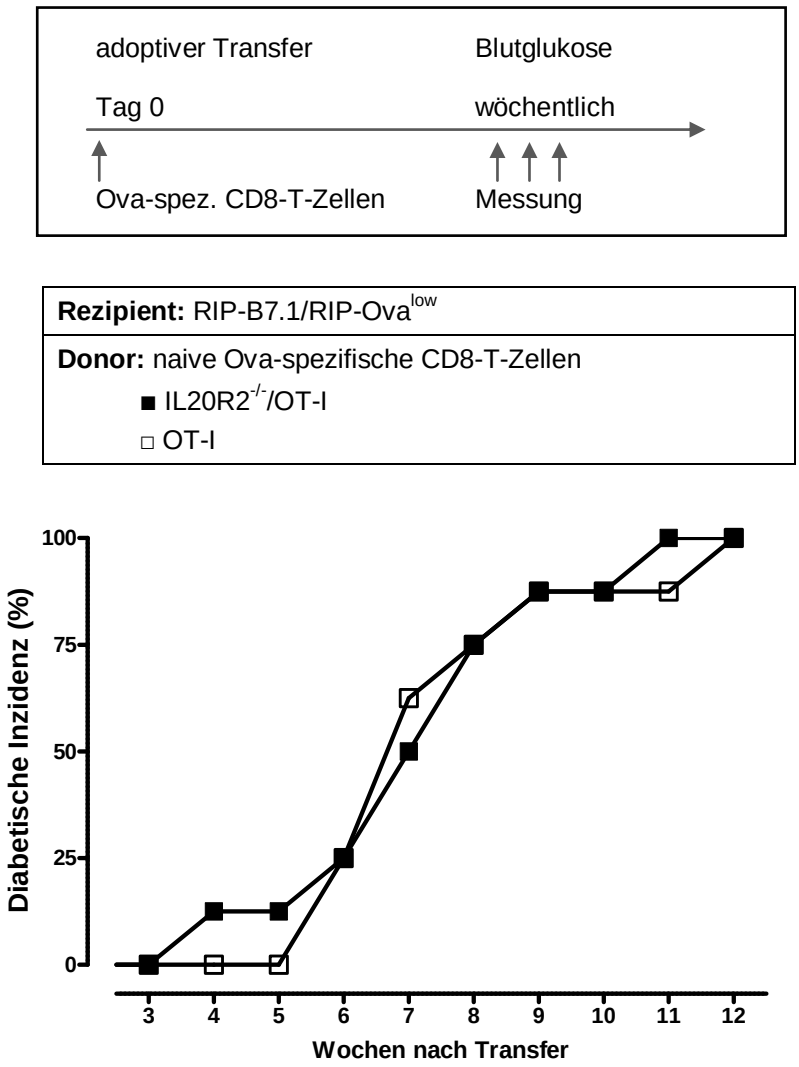


Abb. 21: **Einfluss der IL20R2-Signale auf das OT-I-basierte adoptive Transfermodell naiver CD8-T-Zellen in RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Mäusen.** Aus Milzzellen von IL20R2$^{-/-}$/OT-I- bzw. OT-I-Mäusen wurden die CD8-T-Zellen mit MACS-Aufreinigung isoliert. 3x10^6 OT-I-spezifische CD8-T-Zellen wurden i.v. in RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Mäuse adoptiv transferiert. Die Blutglukosekonzentration der Rezipienten wurde wöchentlich gemessen und die diabetische Inzidenz ermittelt. Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Milz von IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen wurde entnommen und die tg CD8-T-Zellen mittels MACS-Aufreinigung isoliert. 3x10^6 naive Zellen (gleiche Anzahl) wurden adoptiv in RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Rezipienten transferiert. RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Mäuse exprimieren das kostimulatorische Molekül B7.1 und das Protein Ova unter der Kontrolle des RIP in den β-Zellen des Pankreas. Durch den adoptiven Transfer der naiven Ova-spezifischen CD8-T-Zellen aus IL20R2$^{-/-}$/OT-I- oder OT-I-Mäusen (CD8-T-Zellen, deren TCR spezifisch K^b/Ova$_{257-264}$ auf MHC-

Klasse-I-Molekülen erkennt) werden die pankreatischen β-Zellen zerstört und die Rezipienten entwickeln einen EAD.

Die naiven Ova-spezifischen (OT-I) IL20R2$^{-/-}$- und IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen konnten in RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Rezipienten einen CD8-T-Zell-vermittelten EAD induzieren. Der EAD entwickelte sich nach dem adoptiven Transfer der Ova-spezifischen (OT-I) IL20R2$^{-/-}$- und IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen in den Rezipienten übereinstimmend (Abb. 21). Wie bereits für das DTH-Modell gezeigt, induzierte auch im EAD-Modell eine gleiche Anzahl naiver Ova-spezifischen (OT-I) IL20R2$^{-/-}$- und IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen in den RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Rezipienten eine ähnliche Effektorfunktion. Somit ist ein direkter Einfluss der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die Aktivierung der CD8-T-Zellen nicht gegeben.

Im DTH-Modell wurde ein Einfluss der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf das *Priming* der CD8-T-Zellen festgestellt. Daher wurde der adoptiv transferierte EAD untersucht, der durch den Transfer von *in vivo*-aktivierten (*geprimte*) CD8-T-Zellen entsteht. Dazu wurden IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse mit pCI/ppins$_{N110A}$ am Tag 0 und Tag 21 immunisiert (Punkt 2.5.1). Durch Immunisierung werden die CD8-T-Zellen auf Präproinsulin *geprimt*. D.h., dass das *Priming* der CD8-T-Zellen durch Antigenpräsentation von Epitopen des ppins auf den APC erfolgt. Diese Tiere entwickelten, wie erwartet, keinen EAD, da ihnen das kostimulierende Molekül wie B7.1 auf den β-Zellen des Pankreas fehlt (Abb. 22A). Um die Effektorfunktion dieser CD8-T-Zellen in einem funktionellen Mausmodell zu untersuchen, wurden die ppins-*geprimten* CD8-T-Zellen (ppins-spezifische autoreaktive CD8-T-Zellen erkennen ppins auf den β-Zellen des Pankreas) dieser Mäuse entnommen (Tag 33) und in RIP-B7.1-Mäuse (kostimulierende Molekül B7.1 auf den β-Zellen des Pankreas) adoptiv transferiert. Die CD8-T-Zellen wurden vor dem adoptiven Transfer mit MACS-Isolation aufgereinigt und eine Zellzahl von 3x10^6 CD8-T-Zellen in RIP-B7.1-Mäuse adoptiv transferiert (Punkt 2.8.3). Die Blutglukosekonzentration in den Rezipienten wurde wöchentlich gemessen und die diabetische Inzidenz (Punkt 2.7) berechnet.

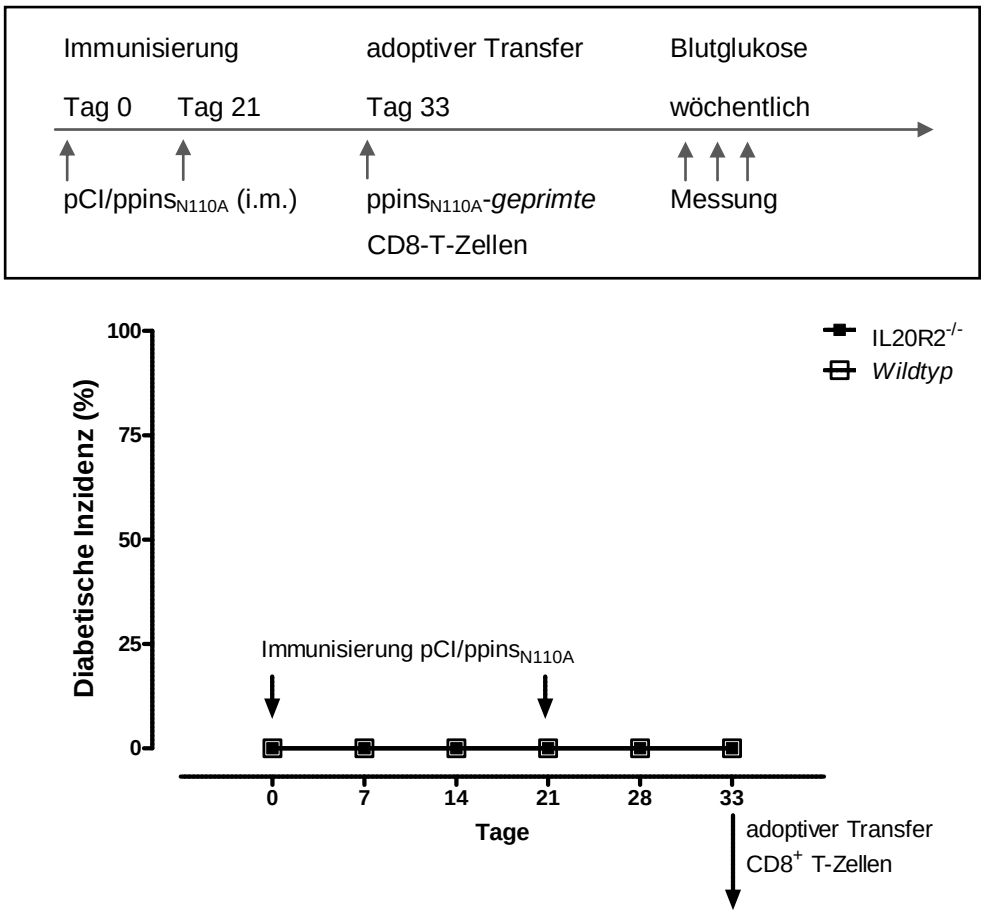


Abb. 22: **Einfluss der IL20R2-Signale auf das adoptive Transfermodell ppins-*geprimter* CD8-T-Zellen in RIP-B7.1-Mäusen.** A) IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit 50 µg

pCI/ppins$_{N110A}$ in PBS pro *Musculus tibialis anterior* an Tag 0 und Tag 21 immunisiert und die Blutglukosekonzentration wöchentlich gemessen. B) Am Tag 33 wurde die Milz, der unter A beschriebenen Mäuse, entnommen und die CD8-T-Zellen (MACS-Isolation) isoliert. $3x10^6$ IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen wurden adoptiv in RIP-B7.1-Mäuse transferiert (i.v.). Die Blutglukosekonzentration wurde wöchentlich gemessen und die diabetische Inzidenz ermittelt. Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Durch den adoptiven Transfer der *geprimten* ppins-spezifischen CD8-T-Zellen lässt sich ein EAD in RIP-B7.1-Mäusen induzieren. RIP-B7.1-Mäuse, denen ppins-spezifische IL20R2$^{-/-}$-CD8-T-Zellen adoptiv transferiert wurde, entwickelten zu ~70 % einen EAD. Nach adoptiven Transfer ppins-spezifischer IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen wurden nur ~40 % der Rezipienten diabetisch. Zudem entwickelten RIP-B7.1-Mäuse, die ppins-*geprimte* IL20R2$^{-/-}$-CD8-T-Zellen erhielten, früher einen Diabetes im Vergleich zu Mäusen, denen ppins-*geprimte* IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen transferiert wurden (Abb. 22). Dies lässt vermuten, dass (wie schon in Abb. 6 gezeigt) in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen mehr antigenspezifische CD8-T-Zellen durch die DNA-basierte Immunisierung induziert wurden, die nach adoptiven Transfer effektiver einen EAD auslösen. Die adoptiven Transferexperimente im EAD-Modell bestätigten daher einen IL-20R2-vermittelten hemmenden Effekt auf das *Priming* der CD8-T-Zellen.

4. Diskussion

Bisher wird kontrovers diskutiert, ob Immunzellen Zielzellen der Zytokine der IL-20-Familie sind und/oder diese in ihrer Funktion regulieren. Gegen eine direkte Aktivierung der Immunzellen durch die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 spricht, dass bisher kein funktionsfähiger Rezeptorkomplex (IL20R1/IL20R2 oder IL22R1/IL20R2) auf Immunzellen identifiziert wurde. Zudem konnte *in vitro* keine STAT3-Aktivierung in PBMC nach Stimulation mit den Zytokinen IL-19, IL-20 und IL-24 nachgewiesen werden [66, 92, 143, 144]. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Immunzellen (T-Zellen, Monozyten) mit den Zytokinen der IL-20-Familie zur Aktivierung dieser führt [5, 37, 54, 72, 74, 75, 98, 137, 141]. Ein Kritikpunkt ist, dass einige dieser Studien eine hohe Zytokinkonzentration oder lange Stimulationszeiten verwendeten. Der Mechanismus der T-Zell-Aktivierung durch die Zytokine der IL-20-Familie ist noch unklar. Zudem ist über die physiologische Rolle der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 in der Regulation von Immunreaktionen wenig bekannt. Zur Aufklärung der immunregulatorischen Mechanismen der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 wurde in dieser Arbeit die IL20R2$^{-/-}$- [137] und die *Wildtyp*-Maus verwendet.

4.1. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale auf die Induktion von antigenspezifischen CD8-T-Zellen nach Ova-Vakzinierung

Die Immunisierung mit pCI/Ova-DNA oder Ova/ODN1826/IFA induzierte in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen eine höhere Anzahl K^{b}/Ova$_{257-264}$-Tetramer^{+} CD8-T-Zellen als in *Wildtyp*-Mäusen (Abb. 6, Abb. 7). Die Immunisierungsstudien zeigten daher, dass IL20R2-vermittelte Signale in *Wildtyp*-Mäusen *in vivo* die Induktion der CD8-T-Zellen während des *Primings* hemmen. Zudem wurde bei IL20R2-Defizienz der Mäuse durch die Immunisierung eine höhere Frequenz an IFN-γ^{+} CD8-T-Zellen und eine höhere IFN-γ-Sekretion bei antigenspezifischer Aktivierung (*ex vivo* mit K^{b}/Ova$_{257-264}$) der CD8-T-Zellen festgestellt (Abb. 6, Abb. 7). Der höheren Anzahl antigenspezifischer CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen kann somit auch eine stärkere Effektorfunktion der CD8-T-Zellen zugewiesen werden. Die IL20R2-vermittelten Effekte sind unabhängig von der Antigenformulierung (DNA-

Immunisierung, Protein-Immunisierung) und der Vakzinierungsroute (i.m., s.c.). Ergänzt wurde dies durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, bei der zur Immunisierung der Mäuse pCI/HBsAg (kodiert für Hepatitis S-Antigen) i.m. oder i.d. (Genegun) injiziert wurde [137].

4.2. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale im funktionellen Mausmodell der DTH und des EAD

4.2.1. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale im DTH-Modell

Als funktionelles Modell zur Untersuchung der IL20R2-Signale in T-Zell-vermittelten Reaktionen, wurde in der vorliegenden Arbeit das DTH-Modell gegen Ova verwendet (Abb. 9, Abb. 11). Die T-Zell-vermittelte Immunreaktion findet bei diesem Modell in der Haut statt, wo zudem die Zytokine der IL-20-Familie und ihre korrespondierenden Rezeptoren exprimiert werden. IL20R2$^{-/-}$-Mäuse bildeten nach der Immunisierung mit pCI/Ova-DNA oder Ova/ODN1826/IFA eine signifikant höhere DTH (Ohrschwellung) gegen das i.d. injizierte Ova aus als *Wildtyp*-Mäuse (Abb. 10, Abb. 16A). Somit konnte der fehlenden IL20R2-Signaltransduktion in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen auch *in vivo* eine Funktionalität zugewiesen werden. Die maximale Ohrschwellung wurde in beiden Gruppen (IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen) 48 Stunden nach der Antigeninjektion ins Ohr gemessen und bildete sich anschließend vollständig zurück (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 16). Dies entspricht dem typischen Verlauf einer DTH. In einem weiteren Modell der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ, der Kontaktallergie, konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte CHS auf das Kontaktallergen TNCB in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen gegenüber *Wildtyp*-Mäusen nachgewiesen werden [137]. In dieser Arbeit wurde zur Aufklärung der immunregulatorischen Funktionen der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 die IL20R2$^{-/-}$-Maus verwendet. Da die IL20R2$^{-/-}$-Maus die Signaltransduktion von allen drei Zytokinen über die IL20R2-Rezeptorfamilie inhibiert, kann nicht geklärt werden, welches der Zytokine den Effekt auf die CD8-T-Zell-Antwort hat und ob diese redundante oder gegensätzliche Funktionen haben.

Der Vergleich von IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen in diesem *In-vivo*-Modell zeigt, dass die IL20R2-vermittelten Signale in *Wildtyp*-Mäusen bzw. die IL20R2-interagierenden Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24, *in vivo* einen

immunsuppressiven Effekt auf adaptive CD8-T-Zell-Antworten haben und daher die T-Zell-gesteuerten entzündlichen Prozesse in der Haut hemmen (Abb. 10, Abb. 16A). Somit konnte den Zytokinen der IL-20-Familie in dieser Arbeit eine antiinflammatorische Funktion im entzündlichen Prozess der DTH zugewiesen werden (Hemmung der CD8-T-Zell-Antwort). Ein weiteres *In-vivo*-Modell, die DSS-induzierte akute Kolitis, konnte eine hemmende Wirkung des Zytokins IL-19 in einem entzündlichen Prozess bestätigen. Hier reagierten IL-19$^{-/-}$-Mäuse sensitiver als *Wildtyp*-Mäuse [5]. Hingegen beschreibt eine aktuelle Studie, eine proinflammatorische Funktion der IL20R2-Signalweiterleitung in der Haut nach einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* (der Haupterreger für Hautinfektionen). IL20R2$^{-/-}$-Mäuse wiesen eine erhöhte *Clearance* (kleinere Läsionen) als *Wildtyp*-Mäuse auf [91]. Zudem wird bei den meisten inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis oder Asthma eine erhöhte Expression der Zytokine der IL-20-Familie und/oder ihrer Rezeptoren mit der Initiation oder Progression des Krankheitsverlaufs assoziiert [13, 44, 66, 72, 74, 112, 141]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der Zytokine und Rezeptoren und der Implikation der Erkrankung steht aber noch aus. Zudem ist noch unbekannt, welche Funktionen die Zytokine während des Krankheitsgeschehens haben und in welcher Phase sie aktiv sind. *In-vitro*-Versuche zeigten, dass IL-19 oder IL-20 die Expression des KGF in CD8-T-Zellen induziert. KGF hat eine proliferative Wirkung auf Keratinozyten [72, 141]. Widersprüche in der Immunregulation ergeben sich auch in der Induktion von anti- und proinflammatorischen Zytokinen. IL-19 induziert in Monozyten aus humanen PBMC eine erhöhte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [54]. Makrophagen von *Wildtyp*-Mäusen bilden nach Stimulation mit LPS signifikant weniger TNF-α, IL-12, IL-6 und IL-1β im Vergleich zu IL-19$^{-/-}$-Mäusen [5]. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie, dass IL-19 in Monozyten aus murinen Milzzellen eine erhöhte Expression der Zytokine IL-6 und TNF-α induziert [75]. IL-24 induziert in PBMC die Sekretion von IL-6, TNF-α und IFN-γ [17, 139]. IL-19 und IL-20 stimulieren die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in humaner fötalen Membran [88]. Da sich entgegengesetzte Ergebnisse in der Immunregulation und in inflammatorischen Prozessen ergeben, muss eventuell zwischen einer Überexpression, der physiologischen Konzentration und der mangelnden oder fehlenden Expression bzw. Signalweiterleitung der Zytokine

unterschieden werden. Zudem sind organ- und zellspezifische Unterschiede möglich. Da alle Experimente dieser Arbeit an der Maus durchgeführt wurden, muss zudem auf mögliche bestehende Unterschiede zwischen Maus und Mensch hingewiesen werden.

4.2.2. Genexpression der Zytokine der IL-20-Familie während der lokalen Inflammation der Haut

Die Expression der Zytokine der IL-10-Familie während inflammatorischer Prozesse in der Haut (*in vivo*) ist noch weitgehend unbekannt. IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wiesen die gleiche Genexpression und Kinetik von IL-19, IL-20 und IL-24 während der lokalen Inflammation (Injektion von Ova ins Ohr nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA) auf (Abb. 17A-B). Eine fehlende Signalweiterleitung der Zytokine der IL-20-Familie äußert sich also nicht in einer erhöhten Expression. Die Genexpression der IL-19- und IL-24-Transkripte konnte während der DTH gegen Ova zu einer frühen Phase der Entzündungsreaktion (6-8 Stunden nach Ova-Injektion) ermittelt werden (Abb. 17A-B). Die Expression der IL-19- und IL-24-mRNA während einer lokalen Entzündungsreaktion konnte im Modell der Kontaktallergie gegen DNFB bestätigt werden. Allerdings zeigte sich hier eine andere Kinetik. Die stärkste Genexpression der Zytokine war 24-48 Stunden nach Induktion der lokalen Inflammation [66]. Eine Beteiligung des Zytokins IL-20 konnte bei der DTH gegen Ova nicht nachgewiesen werden. Die IL-20-mRNA enthält mehrere Instabilitätsmotive [116], sodass eine schnelle Degradation der mRNA während der Versuchsbedingungen wahrscheinlich ist. Während einer Gewebsinflammation können sowohl Immunzellen als auch Hautzellen die Produzenten der Zytokine der IL-20-Familie sein [114]. Kunz et al., 2006 nahm bei dem CHS-Modell eine Beteiligung beider Populationen an [66]. Unklar ist die Funktion der Zytokine der IL-20-Familie in der Ausbildung und Regulierung der Effektorphase der DTH. Die Genexpression des IL-22 war während der DTH gegen Ova gering und scheint daher eine untergeordnete Rolle während der lokalen Inflammation der Haut zu spielen (Abb. 17C). In der Akute-Phase-Reaktion der Leber ist IL-22 und IL-19 (nicht IL-24) ein entscheidender Faktor [30, 140]. Somit werden die Zytokine der IL-20-Familie während einer Inflammation in verschiedenen Organen unterschiedlich reguliert. Eventuell muss auch zwischen einer lokalen Wirkung wie bei der DTH und der systemischen

Wirkung wie bei der Akute-Phase-Reaktion unterschieden werden. Des Weiteren könnte die Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IFN-γ während der lokalen Entzündungsreaktion der DTH untersucht werden. Es gibt erste Hinweise, dass die Genexpression von IFN-γ in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen gegenüber *Wildtyp*-Mäusen erhöht ist (Daten nicht gezeigt). Die Immunregulation zwischen den Zytokinen der IL-20-Familie und des IFN-γ ist nicht geklärt.

4.2.3. Charakterisierung IL20R2-vermittelter Signale im EAD-Modell

Wie bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben, sind die Zytokine der IL-20-Familie mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. In einer genomweiten Assoziationsstudie des Diabetes mellitus Typ I und Untersuchungen von Metaanalysen wurden die Gene für IL-10, IL-19 und IL-20 als neue Kandidaten für Diabetes mellitus Typ I identifiziert [8]. Zudem sind zahlreiche Zytokine im Plasma von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I erhöht, darunter auch die Zytokine der Klasse II wie IL-20, IL-10 und IL-28A [148]. In der vorliegenden Arbeit wurde als weiteres funktionelles Modell zur Untersuchung der IL20R2-Signale in T-Zell-vermittelten Reaktionen das Modell des EAD verwendet, ein Modell für Diabetes mellitus Typ I. Die Immunisierung mit dem DNA-Konstrukt pCI/ppins (kodiert für Präproinsulin) aktiviert autoreaktive (ppins-spezifische) CD8-T-Zellen in RIP-B7.1-Mäusen, die den EAD induzieren. Die β-Zellen der Pankreas weisen vermehrt CD8-T-Zell-Infiltrate auf [125]. Dieses Modell eignet sich daher besonders um CD8-T-Zell-vermittelte Reaktionen zu untersuchen. IL20R2$^{-/-}$/RIP-B7.1- und RIP-B7.1-Mäuse entwickelten 2-3 Wochen nach der Immunisierung mit pCI/ppins$_{N110A}$ einen manifesten EAD (Abb. 20). Aufgrund der kurzen Induktionszeit des EAD ist die Immunisierung mit pCI/ppins$_{N110A}$ nicht geeignet, um einen Unterschied im CD8-T-Zell-abhängigen Prozess des EAD zwischen IL20R2$^{-/-}$/RIP.B7.1- und RIP-B7.1-Mäusen festzustellen. Daher konnte das EAD-Modell die Ergebnisse des DTH-Modells nicht ergänzen.

4.3. Korrelation zwischen antigenspezifischer CD8-T-Zell-Antwort und der funktionellen Antwort im DTH-Modell

Die verschiedenen Immunisierungsstudien (Punkt 3.2) zeigten, dass in den Mäusen eine unterschiedlich starke CD8-T-Zell-Antwort induziert wurde und dies

mit der Ausbildung der DTH (Punkt 3.3.2 und 3.3.4) korreliert. So konnte die Immunisierung mit Ova/PBS oder Ova/IFA nur eine geringe Anzahl $K^b/Ova_{257-264}$-Tetramer$^+$ CD8-T-Zellen *primen* (Daten nicht gezeigt) und auch in der Effektorphase der DTH konnte nur eine geringe Ohrschwellung gemessen werden (Abb. 12). Durch Zugabe eines Adjuvans zur Immunisierungslösung, wie ODN1826, wurde sowohl eine höhere Anzahl an *de-novo*-induzierten antigenspezifischen CD8-T-Zellen in der Milz bzw. Leber nachgewiesen (Abb. 7) als auch die durch Antigeninjektion induzierte T-Zell-abhängige Entzündungsreaktion in der Haut (DTH) erhöht (Abb. 12). Eine Immunisierung der Mäuse mit Ova/Quil-A verursachte nach der Ova-Injektion ins Ohr die stärkste Schwellung in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen (Abb. 12) und auch hier konnte ein Anstieg in der antigenspezifischen CD8-T-Zell-Antwort (höher als bei Ova/ODN1826/IFA) verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Immunisierung mit der Plasmid-DNA pCI/Ova erzeugte die höchsten Frequenzen antigenspezifischer CD8-T-Zellen (Abb. 6). Hier konnte eine Ohrschwellung ähnlich der von Ova/ODN1826/IFA-immunisierten Mäusen induziert werden (Abb. 9).

4.3.1. Induktion der CD8-T-Zellen nach *Priming* mit DNA-Vakzinen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die i.d. Ova-Injektion in die Haut eine DTH 12 Tage nach der DNA-Immunisierung mit pCI/Ova in B6-Mäusen ausgelöst werden kann (Abb. 9). Zeitgleich zu meinen Ergebnissen wurde eine Studie publiziert, die eine DTH gegen rHBsAg (*recombinant hepatitis B surface antigen*) nach zweimaliger Immunisierung (Tag 0, Tag 14) mit pCD-S2 (HBV-DNA-Vakzin) in B6-Mäusen induzieren konnte. Depletionsversuche von CD8- oder CD4-T-Zellen zeigten, dass die DTH nach der DNA-Immunisierung der Mäuse auf der Aktivierung von CD8-T-Zellen beruht [152]. Die rekombinanten Plasmide aktivieren CD8-T-Zellen vermutlich über Kreuzpräsentation der Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen [24, 80].

Interessanterweise konnte die Effektorphase der DTH gegen Ova nach der Immunisierung mit pCI/Ova nicht am Tag 5 induziert werden (Abb. 9). Zu diesem Zeitpunkt werden nur eine geringe Anzahl antigenspezifischer CD8-T-Zellen in der Maus ausgebildet [137], sodass vermutlich aufgrund dieser geringen Anzahl keine effiziente Immunantwort induziert werden konnte. Die höchsten Frequenzen

antigenspezifischer CD8-T-Zellen wurden nach der DNA-Immunisierung mit pCI/HBsAg zwischen Tag 12-14 ermittelt [137]. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung könnte in der Antigenaufnahme und Antigenpräsentation der DNA-Konstrukte liegen.

4.3.2. Induktion der CD8-T-Zellen nach *Priming* mit Protein-Vakzinen

Über die Effektorzellen der DTH ist bisher wenig bekannt. Hinzu kommt, dass je nach verwendetem Antigen unterschiedliche Subpopulationen der T-Zellen aktiviert werden [70]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der T–Zellen in der Ausbildung der DTH gegen Ova untersucht. Die Untersuchungen an RAG1$^{-/-}$-Mäusen (fehlende Ausbildung von funktionellen T- und B-Zellen) zeigten, dass Zellen des adaptiven Immunsystems an der Ausbildung der DTH gegen Ova beteiligt sind (Abb. 13). Zudem konnten durch Depletionsversuche die CD8-T-Zellen als Effektorzellen der DTH gegen Ova identifiziert werden (Abb. 15). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch ein Vergleich der DTH gegen Ova in OT-I-Mäusen (K^b/$Ova_{257-264}$-tg TCR auf CD8-T-Zellen), die eine normale DTH ausbildeten (Abb. 18) und OT-II-Mäusen (A^b/$Ova_{323-339}$-tg TCR auf CD4-T-Zellen), die eine verminderte DTH zeigten (Daten nicht gezeigt). Wie aus diesem Versuch und der Depletion der CD8-T-Zellen (CD4 T-Zellen sind vorhanden) hervorgeht, spielen die CD4-T-Zellen vermutlich keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Ausbildung der DTH gegen Ova. Die CHS dagegen ist besser aufgeklärt. Hier zeigten Depletionsversuche mit CD8- und CD4-T-Zellen als auch Versuche mit MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen, dass die Effektorzellen dieser Reaktion CD8-T-Zellen sind und CD4-T-Zellen sogar eine suppressive Funktion auf die Entzündungsreaktion der Haut haben [15, 18, 38, 43, 117, 146]. Obwohl allgemeiner Konsens darüber besteht, dass Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ IV einem T-Zell-abhängigen Mechanismus unterliegen, zeigten RAG2$^{-/-}$- oder SCID-Mäuse (fehlende Ausbildung von funktionellen T- und B-Zellen) eine Ohrschwellung nach Applikation des Kontaktallergens DNFB [97]. Es wird vermutet das auch NK-Zellen [97], B-1-Zellen [4] und/oder das Komplementsystem [90] an der Ausbildung einer CHS beteiligt sind. Wie aus den Untersuchungen der RAG1$^{-/-}$- oder der OT-I-Mäuse (hier liegen bei Induktion der DTH nur die TCR-tg CD8-T-Zellen vor, Zellen des adaptiven Immunsystems

anderer Spezifität sind zu diesem Zeitpunkt nicht vorhanden) hervorgeht, konnte dies in der DTH gegen Ova nicht bestätigt werden (Abb. 13, Abb. 18).

4.3.3. Einfluss der Antigenformulierung auf die Induktion der CD8-T-Zellen

Im Gegensatz zur Immunisierung der Mäuse mit dem Protein Ova/ODN1826/IFA wurde nach der Immunisierung mit dem Peptid $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA eine verminderte DTH nach Injektion von Ova in die Haut (Tag 5) ausgebildet (Abb. 14). Eine Studie die B6-Mäuse mit $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA immunisierte, konnte ebenfalls keine DTH am Tag 14 gegen das Peptid $Ova_{257-264}$ induzieren [132]. Eine veränderte Prozessierung oder Präsentation des Antigens könnte den Unterschied in der Effektorfunktion der CD8-T-Zellen erklären oder das Ova-Peptid ist von zu geringer Größe um als Antigen erkannt zu werden. Letzterem widerspricht, dass durch die Immunisierung der Mäuse mit $Ova_{257-264}$/CFA eine DTH gegen $Ova_{257-264}$ in B6-Mäusen induziert werden konnte. Zelluläre Infiltrate im Ohr wurden durch die Antigeninjektion nur bei $Ova_{257-264}$/CFA-immunisierten und nicht bei $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA-immunisierten Mäusen nachgewiesen. Zudem produzierten die CD8-T-Zellen nach der Immunisierung mit $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA im Vergleich zu $Ova_{257-264}$/CFA weniger IFN-γ, IL-2 und IL-17. Die Immunisierung mit Ova/CFA regt eher die Proliferation und Zytokinsekretion an, während die Immunisierung mit $Ova_{257-264}$/ODN1826/IFA zytotoxische Funktionen hat [132]. Die Art des Antigens sowie die Wahl des Adjuvans beeinflussen die Induktion der CD8-T-Zellen und somit die Stärke und die Art der Immunantwort (DTH).

4.3.4. Einfluss der Adjuvanzien auf die Induktion der CD8-T-Zellen

Um eine effektive Immunantwort zu induzieren, wird das Antigen meist zusammen mit einem Adjuvans verabreicht. Die Adjuvanzien haben Einfluss auf die Induktion der T-Zellen, sodass je nach verwendetem Adjuvans in der Immunisierungslösung unterschiedlich hohe Ohrschwellungen in der Effektorphase der DTH gemessen wurden (Abb. 12). Adjuvanzien nehmen Einfluss auf die Expression von Zytokinen, können spezifische T-Zell-Subpopulationen aktivieren und bewirken eine Veränderung des Antikörperisotyps. Bisher ist bekannt, dass Antigen/CFA oder

Antigen/ODN1826/IFA eine Th1-Antwort induzieren, während Antigen/IFA eine Th2-Antwort induziert [21, 34]. Das Adjuvans Quil-A stimuliert sowohl Th1-Immunantworten als auch die Produktion cytotoxischer T-Lymphozyten (CD8-T-Zellen) [129]. Aus Abb. 7. geht hervor, dass durch die Immunisierung der Mäuse mit Ova/ODN1826/IFA auch eine effektive CD8-T-Zell-Antwort induziert wird.

Die Signalweiterleitung von IL-19, IL-20 und/oder IL-24 über den IL20R2 verminderte die DTH gegen Ova bei Immunisierung der Mäuse mit Ova/ODN1826/IFA (Abb. 16A) oder Ova/LPS/IFA (Daten nicht gezeigt). So verstärkten die Adjuvanzien ODN1826 und LPS in der Immunisierungslösung bei IL20R2-Defizienz der Mäuse die Ova-induzierte Entzündungsreaktion der Haut. Beide Adjuvanzien aktivieren TLR. Dagegen wurde kein Unterschied in der Ausbildung der DTH gegen Ova von IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen festgestellt, wenn keine Adjuvanzien bei der Immunisierung verwendet wurden (Daten nicht gezeigt) oder bei dem Adjuvans Quil-A (Abb. 16B). Nach der Immunisierung der Mäuse mit Ova/Quil-A wurde durch die Injektion von Ova ins Ohr eine starke Entzündungsreaktion in der Haut ausgelöst, sodass vermutlich aufgrund der gesteigerten Ohrschwellung kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen war. Möglich ist aber auch, dass dieser Effekt auf das Adjuvans selbst zurückgeführt werden kann (Abb. 12, Abb. 16B).

TLR können das *Priming* von T-Zellen beeinflussen. TLR4/IL12Rβ2-defiziente Mäuse (bilden keine CHS aus) zeigten, dass TLR neben IL-12 eine Rolle im *Priming* von naiven T-Zellen haben. TLR4$^{-/-}$- oder IL12Rβ2$^{-/-}$-Mäuse dagegen bilden eine normale CHS aus [85]. Unmethylierte DNA-Sequenzen, wie das hier verwendete ODN1826, werden vom TLR9 erkannt. In der DTH gegen Ova entwickelten TLR9$^{-/-}$-Mäuse nach der Immunisierung mit Ova/ODN1826/IFA und anschließender Injektion von Ova ins Ohr eine gleich hohe Ohrschwellung wie *Wildtyp*-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Gleiches wurde auch bei der CHS beobachtet [58]. LPS, ein Bestandteil gramnegativer Bakterien, aktiviert den TLR4. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch TLR4$^{-/-}$-Mäuse keine veränderte CHS ausbildeten [58, 85]. Der TLR9 und TLR4 hat somit auf das *Priming* von T-Zellen keinen oder nur einen geringen Einfluss. Aufschluss über die Immunregulation der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 könnten TLR9$^{-/-}$/IL20R2$^{-/-}$-Mäuse oder TLR4$^{-/-}$/IL20R2$^{-/-}$-Mäuse geben. Die Zytokine der Klasse II können direkt Einfluss auf die Expression von TLR nehmen. Das Zytokin IL-29 erhöht die Expression des TLR2

und TLR3 in primären humanen Keratinozyten. Für IL-20 alleine konnte dies nicht gezeigt werden. Aber die stärkste Aktivierung des TLR2 und TLR3 wurde in Keratinozyten nachgewiesen, die mit beiden Zytokinen (IL-20 und IL-29) gleichzeitig stimuliert wurden [144]. Ungeklärt bleibt der Einfluss der Zytokine der IL-20-Familie auf weitere TLR und welche Zellen und Gewebe beteiligt sind. Ferner wurde in zwei Studien der Gallagher Gruppe gezeigt, dass LPS die Induktion von IL-19 in humanen Monozyten (isoliert aus PBMC) stimuliert [36, 37]. Die Genexpression von IL-19 wird nach der Bindung von LPS an den TLR4 über den MyD88-Signalweg induziert. IL-19 ist somit in der Feedback-Regulation der TLR zu Pathogenen involviert [6]. Noch steht aus, ob die TLR1-2 und 4-13, die ebenfalls den MyD88-Signalweg aktivieren, die gleichen Effekte haben. Die Wechselwirkungen zwischen den TLR und den Zytokinen IL-19, IL-20 und IL-24 bedarf noch weiterer Forschung. Unklar ist, auf welche Zellen die Zytokine Einfluss nehmen und welche Funktionen diese haben. Ebenso ist der genaue Mechanismus der Regulation zwischen Zytokin und TLR bzw. TLR und Zytokin noch nicht bestimmt.

4.4. IL20R2-vermittelte Immunmodulation der CD8-T-Zellen

Zytokine sind Botenstoffe, die vielfältige Funktionen in der Regulation von Immunreaktionen haben. Die komplexen Zusammenhänge in der Immunregulation sind noch nicht vollständig verstanden. Die Genloci, die Sekundärstruktur, die Rezeptorbindung und teilweise die Signalweiterleitung, die Produzenten und die Zielzellen der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 sind aufgeklärt. Unklar ist aber deren Regulation und Funktion innerhalb des Immunprozesses. In der vorliegenden Arbeit konnte ergänzend zu den *In-vitro*-Studien unserer Arbeitsgruppe [137], auch *in vivo* eine immunsuppressive Funktion auf adaptive CD8-T-Zell-Antworten durch die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 nachgewiesen werden. Die Immunisierung induzierte in IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäusen eine unterschiedliche Anzahl an antigenspezifischen CD8-T-Zellen (Abb. 6, Abb. 7) und zeigte somit einen IL20R2-vermittelten Effekt auf das *Priming* der CD8-T-Zellen. Interessanterweise bildeten IL20R2$^{-/-}$/OT-I-Mäuse eine signifikant erhöhte DTH (Ohrschwellung) durch die Injektion von Ova in das Ohr aus im Vergleich zu OT-I-Mäusen (Abb. 18). Die IL20R2-gesteuerte verminderte Aktivierbarkeit der CD8-T-

Zellen findet somit auch bei einer gleichen Anzahl antigenspezifischer naiver CD8-T-Zellen statt. Ein Mechanismus wie die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 die CD8-T-Zellen direkt aktivieren, ist bisher nicht bekannt [28, 66, 81, 92, 102, 143, 144]. Die unterschiedliche Effektorfunktion der CD8-T-Zellen in der DTH von IL20R2$^{-/-}$/OT-I- und OT-I-Mäusen wird vermutlich nicht durch die Zytokine der IL-20-Familie direkt beeinflusst. IL20R2$^{-/-}$/OT-I-Mäuse sind im Gegensatz zu OT-I-Mäusen auch durch eine IL20R2-Defizienz der APC oder Haut-Epithelzellen gekennzeichnet. Für Haut-Epithelzellen wie Keratinozyten ist ein funktioneller Rezeptor nachgewiesen [13, 66, 102]. Die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 könnten über die IL20R2-Rezeptorfamilie in den APC oder Haut-Epithelzellen Signale aussenden und somit die CD8-T-Zellen über einen indirekten Mechanismus hemmen.

Mittels adoptiver Transferexperimente von antigenspezifischen CD8-T-Zellen kann zwischen direkten und indirekten Mechanismen der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 auf die CD8-T-Zellen unterschieden werden. Zunächst wurde der Einfluss der Zytokine auf die CD8-T-Zell-Effektorfunktion ermittelt. Im DTH-Modell wurde eine gleiche Anzahl an Ova-spezifischen (OT-I) IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen (*in vitro*-aktiviert) in *Wildtyp* (B6)-Rezipienten adoptiv transferiert. In den Rezipienten wurde kein Unterschied in der Ausbildung der DTH nach Injektion von Ova ins Ohr festgestellt (Abb. 19). Da sich keine Unterschiede in der Effektorfunktion der CD8-T-Zellen ergaben, zeigt dies, dass ein direkter Einfluss der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die CD8-T-Zellen nicht erfolgt. Bestätigt wurde dieses Ergebnis im EAD-Modell. Durch den adoptiven Transfer einer gleichen Anzahl von naiven IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$ (OT-I)-CD8-T-Zellen wurde kein Unterschied in der Ausbildung der EAD im RIP-B7.1/RIP-Ova^{low}-Rezipienten festgestellt (Abb. 21). Um einen Einfluss der Zytokine auf das *Priming* der CD8-T-Zellen zu untersuchen bzw. einen indirekten Mechanismus der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die CD8-T-Zellen zu identifizieren wurden ppins$_{N110A}$-*geprimte* (*in vivo*) IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen (Immunisierung von IL20R2$^{-/-}$-und *Wildtyp*-Mäusen mit pCI/ppins$_{N110A}$) adoptiv in RIP-B7.1-Mäuse transferiert und im EAD-Modell analysiert. Dabei trat bei dem adoptiven Transfer der IL20R2$^{-/-}$-CD8-T-Zellen im Vergleich zu IL20R2$^{+/+}$-CD8-T-Zellen der EAD in den RIP-B7.1-Rezipienten häufiger und zu einem früheren Zeitpunkt auf (Abb. 22). Die signifikant effektivere Ausbildung des EAD in IL20R2$^{-/-}$

-CD8-T-Zell-transferierten Rezipienten ist vermutlich auf eine durch Immunisierung induzierte höhere Anzahl an antigenspezifischen CD8-T-Zellen verursacht. Dies bestätigt somit einen indirekten Mechanismus der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 über APC während des *Primings* der CD8-T-Zellen. Eine aktuelle Studie beschreibt einen solchen indirekten Mechanismus an γδ-T-Zellen. Die Koinjektion von rekombinanten IL-19 und IL-20 in *Wildtyp*-Mäuse inhibierte die Expression von IL-17A in γδ-T-Zellen. Auf diesen Zellen wurde bisher kein funktionsfähiger Rezeptor identifiziert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IL-19 und IL-20 die IL-1β-Expression in Keratinozyten nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* hemmen. Da IL-1β ein entscheidender Faktor in der Induktion der IL-17-Produktion in γδ-T-Zellen ist, gehen die Autoren von einer indirekten Aktivierung der γδ-T-Zellen über IL-1β aus [91]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Immunisierungsstudien und die adoptiven Transferexperimente im DTH-Modell und im EAD-Modell eine IL20R2-vermittelte Hemmung der CD8-T-Zellen während des *Primings*. Des Weiteren ist der Einfluss der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf die CD8-T-Zellen durch einen indirekten Mechanismus vermittelt wie über APC oder Haut-Epithelzellen.

Wenn die komplexen Zusammenhänge in der Immunregulation der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 besser verstanden sind, könnten diese Zytokine zu einer spezifischeren Therapie von inflammatorischen Erkrankungen beitragen, als die bisher verwendeten Zytokine TNF-α [124, 130] oder IL-10 [16, 73].

5. Zusammenfassung

Über die physiologische Funktion der Zytokine Interleukin (IL)-19, IL-20 und IL-24 (IL-20-Familie) ist bisher wenig bekannt. Derzeit wird die Rolle der Zytokine in der Regulation von Immunantworten diskutiert. Zudem sind die Zytokine der IL-20-Familie in inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis, Asthma, Diabetes oder entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben. Zur Aufklärung der immunregulatorischen Funktion der Zytokine der IL-20-Familie wurde die IL20R2-*Knockout*-Maus (IL20R2$^{-/-}$) verwendet. Die Signalweiterleitung der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 über den IL-20-Rezeptorkomplex Typ I (IL20R1/IL20R2) und IL-20-Rezeptorkomplex Typ II (IL22R1/IL20R2) (IL20R2-Rezeptorfamilie) wird durch die Inaktivierung des Zytokinrezeptorgens IL20R2 verhindert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen eine höhere Anzahl $K^b/Ova_{257-264}$-spezifischer CD8-T-Zellen durch die Immunisierung mit pCI/Ova-DNA oder Ova/ODN1826/IFA induziert wird als in *Wildtyp* (B6)-Mäusen. Dieses Ergebnis deutet daher auf einen IL20R2-vermittelten hemmenden Effekt der APC auf das *Priming* der CD8-T-Zellen in B6-Mäusen hin. *In vivo* haben die Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 einen immunsuppressiven Effekt auf adaptive CD8-T-Zell-Antworten.

Im Anschluss wurde die *In-vivo*-Funktionalität der Zytokine der IL-20-Familie auf die CD8-T-Zell-Antwort im Modell der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH) gegen Ovalbumin (Ova) überprüft. Diese CD8-T-Zell-vermittelte lokale Entzündungsreaktion findet in der Haut statt, die zudem eine hohe Genexpression der IL20R2-Rezeptorfamilie und der korrespondierenden Zytokine aufweist. IL20R2$^{-/-}$-Mäuse bildeten nach der Immunisierung mit pCI/Ova-DNA oder Ova/ODN1826/IFA und dem Auslösen der Effektorphase der DTH durch intradermale (i.d.) Injektion von Ova eine signifikant höhere Entzündungsreaktion (Ohrschwellung) im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen aus. Die in den Immunisierungsstudien gezeigte erhöhte Ova-spezifische CD8-T-Zell-Antwort in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen korrelierte somit mit der effizienteren Induktion einer DTH. Interessant war, dass bei der direkten Aktivierung von naiven Ova-spezifischen CD8-T-Zellen in IL20R2-defizienten OT-I- und *Wildtyp*-OT-I-Mäusen durch die i.d. Injektion von Ova in IL20R2$^{-/-}$/OT-I-Mäusen eine signifikant höhere DTH (Ohrschwellung) ausgelöst wurde. Dies deutet auf eine direkte IL20R2-vermittelte

Hemmung der Aktivierung von naiven CD8-T-Zellen durch Ova-präsentierende APC in der Haut hin. Um die CD8-T-Zell-Effektorfunktion zu charakterisieren wurde ein adoptives Transfersystem etabliert. Eine gleiche Anzahl *in vitro*-aktivierter $Ova_{257-264}$-spezifischer IL20R2$^{-/-}$- oder IL20R2$^{+/+}$-OT-I-T-Zellen wurde in *Wildtyp*-Rezipienten adoptiv transferiert und die DTH durch Injektion von Ova in das Ohr ausgelöst. Bei der Ausbildung der Effektorphase der DTH gegen Ova wurde kein Unterschied in den Rezipienten festgestellt. Ein direkter Einfluss des IL20R2-Rezeptors auf die CD8-T-Zellen war somit nicht gegeben. Die immunregulatorischen Effekte der Zytokine IL-19, IL-20 und/oder IL-24 auf CD8-T-Zellen werden vermutlich über APC vermittelt.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Einfluss IL20R2-vermittelter Signale auf die Induktion autoreaktiver CD8-T-Zellen in dem Modell des experimentellen Autoimmundiabetes (EAD) untersucht. IL20R2$^{-/-}$- und *Wildtyp*-Mäuse wurden mit Präproinsulin-DNA immunisiert und die *geprimten* CD8-T-Zellen in RIP-B7.1-Mäuse adoptiv transferiert. Die Diabetesentwicklung verlief in IL20R2$^{-/-}$-CD8-T-Zell-transferierten RIP-B7.1-Mäusen signifikant effizienter. Dies ließ vermuten, dass die Immunisierung eine höhere Anzahl präproinsulin-spezifischer CD8-T-Zellen in IL20R2$^{-/-}$-Mäusen induzierte und die T-Zellen in den Rezipienten einen effektiveren EAD auslösten. Dies bestätigt einen IL20R2-vermittelten hemmenden Effekt auf das *Priming* von CD8-T-Zellen.

Diese Ergebnisse bieten einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen bezüglich der immunregulatorischen Eigenschaften der Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 auf die Induktion und Effektorfunktion der CD8-T-Zellen.

Literaturverzeichnis

1. Adam J, Pichler WJ, Yerly D, *Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation.* Br J Clin Pharmacol, 2011. 71(5): p. 701-7.
2. Allen M, Pratscher B, Krepler C, Frei K, Schofer C, Pehamberger H, Muller M, Lucas T, *Alternative splicing of IL-24 in melanocytes by deletion of exons 3 and 5.* Int J Immunogenet, 2005. 32(6): p. 375-8.
3. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y, *Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease.* J Immunol, 2009. 183(1): p. 687-95.
4. Askenase PW, *Yes T cells, but three different T cells (alphabeta, gammadelta and NK T cells), and also B-1 cells mediate contact sensitivity.* Clin Exp Immunol, 2001. 125(3): p. 345-50.
5. Azuma YT, Matsuo Y, Kuwamura M, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Nakajima H, Karow M, Takeuchi T, *Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation.* Inflammatory bowel diseases, 2010. 16(6): p. 1017-28.
6. Azuma YT, Matsuo Y, Nakajima H, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Takeuchi T, *Interleukin-19 is a negative regulator of innate immunity and critical for colonic protection.* Journal of pharmacological sciences, 2011. 115(2): p. 105-11.
7. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR, *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.* Immunol Cell Biol, 1998. 76(1): p. 34-40.
8. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS, *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.* Nat Genet, 2009. 41(6): p. 703-7.
9. Bartlett NW, Dumoutier L, Renauld JC, Kotenko SV, McVey CE, Lee HJ, Smith GL, *A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus.* J Gen Virol, 2004. 85(Pt 6): p. 1401-12.

10. Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG, *B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties.* Immunol Lett, 2006. 104(1-2): p. 70-5.
11. Billiau A, Matthys P, *Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases.* J Leukoc Biol, 2001. 70(6): p. 849-60.
12. Blanas E, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Heath WR, *Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen.* Science, 1996. 274(5293): p. 1707-9.
13. Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K, Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggie K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekher YA, *Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function.* Cell, 2001. 104(1): p. 9-19.
14. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, Gershwin ME, *Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment.* J Autoimmun, 2012. 38(2-3): p. J156-69.
15. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF, *Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene.* Eur J Immunol, 1995. 25(11): p. 3006-10.
16. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW, *Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease.* Expert opinion on biological therapy, 2003. 3(5): p. 725-31.
17. Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar AM, Yang XH, Retter MW, Hill P, Chada S, Grimm EA, *The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24.* J Immunol, 2002. 168(12): p. 6041-6.
18. Cavani A, Albanesi C, Traidl C, Sebastiani S, Girolomoni G, *Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis.* Trends Immunol, 2001. 22(3): p. 118-20.

19. Chang C, Magracheva E, Kozlov S, Fong S, Tobin G, Kotenko S, Wlodawer A, Zdanov A, *Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines.* J Biol Chem, 2003. 278(5): p. 3308-13.
20. Chen WY, Cheng BC, Jiang MJ, Hsieh MY, Chang MS, *IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(9): p. 2090-5.
21. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV, *CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity.* J Exp Med, 1997. 186(10): p. 1623-31.
22. Clarke SR, Barnden M, Kurts C, Carbone FR, Miller JF, Heath WR, *Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection.* Immunol Cell Biol, 2000. 78(2): p. 110-7.
23. Coombs PR, Gell PG, *Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease.* Clinical Aspects of Immunology, 1968: p. 575-96.
24. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA, *Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation.* Immunol Rev, 2005. 207: p. 145-57.
25. Czarnobilska E, Obtulowicz K, Wsolek K, *[Type IV of hypersensitivity and its subtypes].* Przegl Lek, 2007. 64(7-8): p. 506-8.
26. Dash R, Bhutia SK, Azab B, Su ZZ, Quinn BA, Kegelmen TP, Das SK, Kim K, Lee SG, Park MA, Yacoub A, Rahmani M, Emdad L, Dmitriev IP, Wang XY, Sarkar D, Grant S, Dent P, Curiel DT, Fisher PB, *mda-7/IL-24: a unique member of the IL-10 gene family promoting cancer-targeted toxicity.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(5): p. 381-91.
27. Doria A, Zen M, Bettio S, Gatto M, Bassi N, Nalotto L, Ghirardello A, Iaccarino L, Punzi L, *Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide.* Autoimmunity reviews, 2012. 12(1): p. 22-30.
28. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC, *Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types.* J Immunol, 2001. 167(7): p. 3545-9.

29. Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9.* J Immunol, 2000. 164(4): p. 1814-9.
30. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC, *Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(18): p. 10144-9.
31. Federation ID, *http://www.idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf.* 26.02.2012.
32. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H, *The interleukin-10 family of cytokines.* Trends Immunol, 2002. 23(2): p. 89-96.
33. Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer AA, *A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus.* J Virol, 1997. 71(6): p. 4857-61.
34. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV, *Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice.* Science, 1996. 271(5256): p. 1728-30.
35. Gallagher G, *Interleukin-19: multiple roles in immune regulation and disease.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(5): p. 345-52.
36. Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Peat JD, Vazquez N, Pestka S, Donnelly RP, Kotenko SV, *Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10).* Genes Immun, 2000. 1(7): p. 442-50.
37. Gallagher G, Eskdale J, Jordan W, Peat J, Campbell J, Boniotto M, Lennon GP, Dickensheets H, Donnelly RP, *Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses.* Int Immunopharmacol, 2004. 4(5): p. 615-26.
38. Gocinski BL, Tigelaar RE, *Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion.* J Immunol, 1990. 144(11): p. 4121-8.
39. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH, *The B7 family revisited.* Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 515-48.

40. Griesemer AD, Sorenson EC, Hardy MA, *The role of the thymus in tolerance.* Transplantation, 2010. 90(5): p. 465-74.
41. Harlan DM, Hengartner H, Huang ML, Kang YH, Abe R, Moreadith RW, Pircher H, Gray GS, Ohashi PS, Freeman GJ, et al., *Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(8): p. 3137-41.
42. Hayter SM, Cook MC, *Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease.* Autoimmunity reviews, 2012. 11(10): p. 754-65.
43. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H, *IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses.* J Immunol, 2009. 183(2): p. 1463-70.
44. He M, Liang P, *IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis.* J Immunol, 2010. 184(4): p. 1793-8.
45. Hober D, Sauter P, *Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host.* Nat Rev Endocrinol, 2010. 6(5): p. 279-89.
46. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR, *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection.* Cell, 1994. 76(1): p. 17-27.
47. Hsing CH, Ho CL, Chang LY, Lee YL, Chuang SS, Chang MS, *Tissue microarray analysis of interleukin-20 expression.* Cytokine, 2006. 35(1-2): p. 44-52.
48. Hsing CH, Hsu CC, Chen WY, Chang LY, Hwang JC, Chang MS, *Expression of IL-19 correlates with Th2 cytokines in uraemic patients.* Nephrol Dial Transplant, 2007. 22(8): p. 2230-8.
49. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW, *Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1.* Science, 1990. 250(4982): p. 830-2.
50. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, Chen PC, Cheng HH, Chang MS, *Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in*

rheumatoid and experimental arthritis. Arthritis Rheum, 2006. 54(9): p. 2722-33.

51. Institut RK, *Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 24, Diabetes mellitus.* 2005.
52. Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB, *Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression.* Oncogene, 1995. 11(12): p. 2477-86.
53. Jones BC, Logsdon NJ, Josephson K, Cook J, Barry PA, Walter MR, *Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(14): p. 9404-9.
54. Jordan WJ, Eskdale J, Boniotto M, Lennon GP, Peat J, Campbell JD, Gallagher G, *Human IL-19 regulates immunity through auto-induction of IL-19 and production of IL-10.* Eur J Immunol, 2005. 35(5): p. 1576-82.
55. Kalish RS, Askenase PW, *Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity.* J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(2 Pt 1): p. 192-9.
56. Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA, *Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis.* Nat Rev Immunol, 2012. 12(2): p. 114-24.
57. Karges W, Rajasalu T, Spyrantis A, Wieland A, Boehm B, Schirmbeck R, *The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune diabetes model in RIP-B7.1 mice.* Eur J Immunol, 2007. 37(8): p. 2097-103.
58. Klekotka PA, Yang L, Yokoyama WM, *Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity.* The Journal of investigative dermatology, 2010. 130(1): p. 184-91.
59. Knappe A, Hor S, Wittmann S, Fickenscher H, *Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri.* J Virol, 2000. 74(8): p. 3881-7.
60. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T, *Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity.* Microsc Res Tech, 2001. 53(4): p. 241-5.
61. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S, *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both*

the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2725-32.

62. Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S, *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex.* EMBO J, 1997. 16(19): p. 5894-903.
63. Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S, *Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(4): p. 1695-700.
64. Kragstrup TW, Otkjaer K, Holm C, Jorgensen A, Hokland M, Iversen L, Deleuran B, *The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy.* Cytokine, 2008. 41(1): p. 16-23.
65. Krebs DL, Hilton DJ, *SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling.* J Cell Sci, 2000. 113 (Pt 16): p. 2813-9.
66. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R, *Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs.* Exp Dermatol, 2006. 15(12): p. 991-1004.
67. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H, *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo.* J Exp Med, 1996. 184(3): p. 923-30.
68. Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR, *Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction.* J Exp Med, 1998. 188(2): p. 409-14.
69. Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, Carbone FR, Miller JF, Heath WR, *CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(22): p. 12703-7.
70. Ladel CH, Daugelat S, Kaufmann SH, *Immune response to Mycobacterium bovis bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance.* Eur J Immunol, 1995. 25(2): p. 377-84.

71. Lehuen A, Diana J, Zaccone P, Cooke A, *Immune cell crosstalk in type 1 diabetes.* Nat Rev Immunol, 2010. 10(7): p. 501-13.
72. Li HH, Lin YC, Chen PJ, Hsiao CH, Lee JY, Chen WC, Tzung TY, Wu JC, Chang MS, *Interleukin-19 upregulates keratinocyte growth factor and is associated with psoriasis.* Br J Dermatol, 2005. 153(3): p. 591-5.
73. Li MC, He SH, *IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease.* World journal of gastroenterology : WJG, 2004. 10(5): p. 620-5.
74. Liao SC, Cheng YC, Wang YC, Wang CW, Yang SM, Yu CK, Shieh CC, Cheng KC, Lee MF, Chiang SR, Shieh JM, Chang MS, *IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients.* J Immunol, 2004. 173(11): p. 6712-8.
75. Liao YC, Liang WG, Chen FW, Hsu JH, Yang JJ, Chang MS, *IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha.* J Immunol, 2002. 169(8): p. 4288-97.
76. Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P, *Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention.* Immunity, 2002. 17(1): p. 1-6.
77. Lieberman LS, *Dietary, evolutionary, and modernizing influences on the prevalence of type 2 diabetes.* Annu Rev Nutr, 2003. 23: p. 345-77.
78. Lieberman SM, DiLorenzo TP, *A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes.* Tissue Antigens, 2003. 62(5): p. 359-77.
79. Liu L, Ding C, Zeng W, Heuer JG, Tetreault JW, Noblitt TW, Hangoc G, Cooper S, Brune KA, Sharma G, Fox N, Rowlinson SW, Rogers DP, Witcher DR, Lambooy PK, Wroblewski VJ, Miller JR, Broxmeyer HE, *Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20.* Blood, 2003. 102(9): p. 3206-9.
80. Liu MA, *DNA vaccines: a review.* J Intern Med, 2003. 253(4): p. 402-10.
81. Logsdon NJ, Deshpande A, Harris BD, Rajashankar KR, Walter MR, *Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(31): p. 12704-9.
82. Longsdorf AS, Enk AH, *Immunologie des allergischen Kontaktekzems.* Hautarzt, 2009. 60: p. 32-41.

83. Loppnow H, *[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action].* Der Internist, 2001. 42(1): p. 13-4, 17-27.
84. Madireddi MT, Dent P, Fisher PB, *Regulation of mda-7 gene expression during human melanoma differentiation.* Oncogene, 2000. 19(10): p. 1362-8.
85. Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Durr C, Heimesaat MM, Bereswill S, Fejer G, Vassileva R, Jakob T, Freudenberg N, Termeer CC, Johner C, Galanos C, Freudenberg MA, *Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity.* J Exp Med, 2008. 205(9): p. 2151-62.
86. McInturff JE, Modlin RL, Kim J, *The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease.* The Journal of investigative dermatology, 2005. 125(1): p. 1-8.
87. Medarova Z, Tsai S, Evgenov N, Santamaria P, Moore A, *In vivo imaging of a diabetogenic CD8+ T cell response during type 1 diabetes progression.* Magn Reson Med, 2008. 59(4): p. 712-20.
88. Menon R, Ismail L, Ismail D, Merialdi M, Lombardi SJ, Fortunato SJ, *Human fetal membrane expression of IL-19 and IL-20 and its differential effect on inflammatory cytokine production.* J Matern Fetal Neonatal Med, 2006. 19(4): p. 209-14.
89. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
90. Murphy E, Travers P, Walport M, *Janeway Immunulogie.* 2009. 7. Auflage.
91. Myles IA, Fontecilla NM, Valdez PA, Vithayathil PJ, Naik S, Belkaid Y, Ouyang W, Datta SK, *Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1beta and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Nat Immunol, 2013. 14(8): p. 804-11.
92. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R, *Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization.* Int Immunopharmacol, 2004. 4(5): p. 577-92.
93. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ, *Skin immune sentinels in health and disease.* Nat Rev Immunol, 2009. 9(10): p. 679-91.
94. Nickoloff BJ, *The immunologic and genetic basis of psoriasis.* Arch Dermatol, 1999. 135(9): p. 1104-10.

95. Nickoloff BJ, Nestle FO, *Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities.* J Clin Invest, 2004. 113(12): p. 1664-75.
96. O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL, *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways.* EMBO J, 1998. 17(4): p. 1006-18.
97. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH, *T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells.* Nat Immunol, 2006. 7(5): p. 507-16.
98. Oral HB, Kotenko SV, Yilmaz M, Mani O, Zumkehr J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M, *Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26.* Eur J Immunol, 2006. 36(2): p. 380-8.
99. Ospelt C, Gay S, *TLRs and chronic inflammation.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. 42(4): p. 495-505.
100. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG, *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.* Annu Rev Immunol, 2011. 29: p. 71-109.
101. Pancer Z, Cooper MD, *The evolution of adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 497-518.
102. Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA, *Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions.* J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47517-23.
103. Pestka S, Kotenko SV, Muthukumaran G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G, *The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. 8(3): p. 189-206.
104. Pestka S, Krause CD, Walter MR, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.* Immunol Rev, 2004. 202: p. 8-32.
105. Pletnev S, Magracheva E, Kozlov S, Tobin G, Kotenko SV, Wlodawer A, Zdanov A, *Characterization of the recombinant extracellular domains of human interleukin-20 receptors and their complexes with interleukin-19 and interleukin-20.* Biochemistry, 2003. 42(43): p. 12617-24.

106. Rajasalu T, Barth C, Spyrantis A, Durinovic-Bello I, Uibo R, Schirmbeck R, Boehm BO, Karges W, *Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity.* Ann N Y Acad Sci, 2004. 1037: p. 208-15.
107. Renauld JC, *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(8): p. 667-76.
108. Riewald M, Ruf W, *Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis.* Crit Care, 2003. 7(2): p. 123-9.
109. Rigopoulou EI, Smyk DS, Matthews CE, Billinis C, Burroughs AK, Lenzi M, Bogdanos DP, *Epstein-barr virus as a trigger of autoimmune liver diseases.* Advances in virology, 2012. 2012: p. 987471.
110. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD, *DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope.* J Immunol, 2000. 164(9): p. 4706-12.
111. Rode HJ, Janssen W, Rosen-Wolff A, Bugert JJ, Thein P, Becker Y, Darai G, *The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene.* Virus Genes, 1993. 7(1): p. 111-6.
112. Romer J, Hasselager E, Norby PL, Steiniche T, Thorn Clausen J, Kragballe K, *Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol.* The Journal of investigative dermatology, 2003. 121(6): p. 1306-11.
113. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, Kasman I, Winer J, Modrusan Z, Danilenko DM, Ouyang W, *The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis.* J Immunol, 2007. 178(4): p. 2229-40.
114. Sabat R, *IL-10 family of cytokines.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(5): p. 315-24.
115. Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, *Immunopathogenesis of psoriasis.* Exp Dermatol, 2007. 16(10): p. 779-98.
116. Sabat R, Wallace E, Endesfelder S, Wolk K, *IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases.* Expert Opin Ther Targets, 2007. 11(5): p. 601-12.

117. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF, *The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis.* Eur J Dermatol, 2004. 14(3): p. 131-8.
118. Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y, *Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation.* Rheumatology (Oxford), 2008. 47(6): p. 815-20.
119. Sambrook J, Russell D, *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2000. 3: p. 187-236.
120. Saveanu L, van Endert P, *Preparing antigens suitable for cross-presentation assays in vitro and in vivo.* Methods Mol Biol, 2013. 960: p. 389-400.
121. Savina A, Amigorena S, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells.* Immunol Rev, 2007. 219: p. 143-56.
122. Schaefer G, Venkataraman C, Schindler U, *Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells.* J Immunol, 2001. 166(10): p. 5859-63.
123. Schon MP, Boehncke WH, *Psoriasis.* N Engl J Med, 2005. 352(18): p. 1899-912.
124. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK, 3rd, *Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis.* Exp Dermatol, 2004. 13(4): p. 193-222.
125. Schuster C, *Regulation of CD8 T cell-mediated diabetes induction by co-inhibitory and co-stimulatory signals delivered by pancreatic ß cells.* Dissertation, Uniklinikum Ulm, 2012.
126. Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shah NK, Smirnov SV, Anantha S, Dickensheets H, Dumoutier L, Renauld JC, Zdanov A, Donnelly RP, Kotenko SV, *Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2.* J Immunol, 2004. 172(4): p. 2006-10.
127. Stills HF, Jr., *Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants.* ILAR J, 2005. 46(3): p. 280-93.
128. Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ, Young CS, Kitada S, Reed JC, Goldstein NI, Fisher PB, *The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces*

apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(24): p. 14400-5.

129. Sun HX, Xie Y, Ye YP, *Advances in saponin-based adjuvants.* Vaccine, 2009. 27(12): p. 1787-96.
130. Suryaprasad AG, Prindiville T, *The biology of TNF blockade.* Autoimmunity reviews, 2003. 2(6): p. 346-57.
131. Tian Y, Sommerville LJ, Cuneo A, Kelemen SE, Autieri MV, *Expression and suppressive effects of interleukin-19 on vascular smooth muscle cell pathophysiology and development of intimal hyperplasia.* Am J Pathol, 2008. 173(3): p. 901-9.
132. Tigno-Aranjuez JT, Lehmann PV, Tary-Lehmann M, *Dissociated induction of cytotoxicity and DTH by CFA and CpG.* J Immunother, 2009. 32(4): p. 389-98.
133. Tobon GJ, Pers JO, Canas CA, Rojas-Villarraga A, Youinou P, Anaya JM, *Are autoimmune diseases predictable?* Autoimmunity reviews, 2012. 11(4): p. 259-66.
134. Tritsaris K, Myren M, Ditlev SB, Hubschmann MV, van der Blom I, Hansen AJ, Olsen UB, Cao R, Zhang J, Jia T, Wahlberg E, Dissing S, Cao Y, *IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(39): p. 15364-9.
135. Tsai S, Clemente-Casares X, Santamaria P, *CD8(+) Tregs in autoimmunity: learning "self"-control from experience.* Cell Mol Life Sci, 2011. 68(23): p. 3781-95.
136. Tsai S, Shameli A, Santamaria P, *CD8+ T cells in type 1 diabetes.* Adv Immunol, 2008. 100: p. 79-124.
137. Wahl C, Muller W, Leithauser F, Adler G, Oswald F, Reimann J, Schirmbeck R, Seier A, Weiss JM, Prochnow B, Wegenka UM, *IL-20 receptor 2 signaling down-regulates antigen-specific T cell responses.* J Immunol, 2009. 182(2): p. 802-10.
138. Walter U, Santamaria P, *CD8+ T cells in autoimmunity.* Curr Opin Immunol, 2005. 17(6): p. 624-31.

139. Wang M, Tan Z, Zhang R, Kotenko SV, Liang P, *Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2.* J Biol Chem, 2002. 277(9): p. 7341-7.
140. Wegenka UM, Dikopoulos N, Reimann J, Adler G, Wahl C, *The murine liver is a potential target organ for IL-19, IL-20 and IL-24: Type I Interferons and LPS regulate the expression of IL-20R2.* J Hepatol, 2007. 46(2): p. 257-65.
141. Wei CC, Chen WY, Wang YC, Chen PJ, Lee JY, Wong TW, Chen WC, Wu JC, Chen GY, Chang MS, Lin YC, *Detection of IL-20 and its receptors on psoriatic skin.* Clin Immunol, 2005. 117(1): p. 65-72.
142. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R, *IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not.* J Mol Med (Berl), 2009. 87(5): p. 523-36.
143. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R, *Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?* J Immunol, 2002. 168(11): p. 5397-402.
144. Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, Thilo J, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Sabat R, *Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes.* J Leukoc Biol, 2008. 83(5): p. 1181-93.
145. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL, *Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R.* J Biol Chem, 2000. 275(40): p. 31335-9.
146. Xu H, DiIulio NA, Fairchild RL, *T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells.* J Exp Med, 1996. 183(3): p. 1001-12.
147. Yang Y, Santamaria P, *Lessons on autoimmune diabetes from animal models.* Clin Sci (Lond), 2006. 110(6): p. 627-39.
148. Yeung WC, Al-Shabeeb A, Pang CN, Wilkins MR, Catteau J, Howard NJ, Rawlinson WD, Craig ME, *Children with islet autoimmunity and enterovirus*

infection demonstrate a distinct cytokine profile. Diabetes, 2012. 61(6): p. 1500-8.

149. Zdanov A, *Structural features of the interleukin-10 family of cytokines.* Current pharmaceutical design, 2004. 10(31): p. 3873-84.
150. Zdanov A, *Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(5): p. 325-30.
151. Zhong H, Wu Y, Belardinelli L, Zeng D, *A2B adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(5): p. 587-92.
152. Zou Q, Yao X, Feng J, Yin Z, Flavell R, Hu Y, Zheng G, Jin J, Kang Y, Wu B, Liang X, Feng C, Liu H, Li W, Wang X, Wen Y, Wang B, *Praziquantel facilitates IFN-gamma-producing CD8+ T cells (Tc1) and IL-17-producing CD8+ T cells (Tc17) responses to DNA vaccination in mice.* PLoS One, 2011. 6(10): p. e25525.

A. Anhang

A.a Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Agarose	Lonza	50004
Aqua (steril)	Braun	2351744
β-Mercaptoethanol	BioRad	161-0710
Brefeldin A	Alexis	ALX-350-019-M010
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth	8076.2
DMSO	Sigma	D2650
EDTA	Fluka	3677
Eisessig	Applichem	A0820
Ethidiumbromid	Sigma	E1510
Heparin	Serva	24590.01
Na_2HPO_4 x $2H_2O$ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat)	Merck	106345
Natriumazid	Sigma	S-2002
NH_4Cl (Ammoniumchlorid)	Fluka	09700
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	104005
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
PBS (Dulbecco)	Biochrom	L 182-50
PBS (für Injektion in Mäuse)	Gibco	10010
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
Proteinase K	Qiagen	19131
RPMI 1640	Gibco	21875-091
Saponin	Sigma	S-7900
Tris	USB	75825
Trypanblau	Fluka	93595
Tween 20	Roth	9127.1

A.b Puffer und Medien

Puffer, Medium	Zusammensetzung
ELISA-Blockierungspuffer	PBS/3 % (w/v) BSA
ELISA-Puffer	0,1 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$, pH 9
ELISA-Waschpuffer	PBS/0,05 % Tween20
FACS A	PBS mit 0,5 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) Natriumazid (NaN_3)
FACS B	PBS mit 0,5 % (w/v) BSA, 0,5 % (w/v) Saponin, 0,05 % (w/v) Natriumazid (NaN_3)
Lysepuffer	0,16 M NH_4Cl, 0,17 M Tris, pH 7,2
PFA	1 % PFA in FACS A
RPMI-Medium	RPMI 1640 mit 5 % FCS, 1 % Natriumazid
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Eisessig

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.