

**Modulation der Immunantwort durch *in vitro* und *in vivo*  
Manipulation antigenpräsentierender Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gabriele Karsten

März 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Hamann

Disputation am: 27. Juni 2007

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ABKÜRZUNGEN.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>3. EINLEITUNG.....</b>  | <b>11</b> |
| 3.1 DAS IMMUNSYSTEM IM ALLGEMEINEN .....   | 11        |
| 3.2 DIE T-LYMPHOZYTEN.....   | 12        |
| 3.2.1 Aktivierung und Gedächtnis der T-Lymphozyten .....   | 14        |
| 3.2.2 T-Helferzell-Subpopulationen .....   | 15        |
| 3.2.3 Einfluss Antigen-präsentierender Zellen auf die Differenzierung von T-Helferzellen.....                                | 17        |
| 3.2.4 Toleranz und Autoimmunität .....   | 18        |
| 3.2.4.1 Rolle der Th-Subpopulationen bei Autoimmunerkrankungen .....   | 19        |
| 3.2.4.2 Behandlung von Autoimmunkrankheiten.....   | 20        |
| 3.3. DNA IMMUNISIERUNG.....  | 22        |
| 3.3.1 Beeinflussung der Immunantwort durch DNA Immunisierung .....   | 24        |
| 3.3.1.1 Modulation durch Verwendung von siRNA.....   | 25        |
| 3.3.1.2 Beeinflussung der Immunantwort durch gezielte Antigenexpression.....   | 26        |
| 3.4 ANALYSE DER SPEZIFISCHEN TH-ZELLANTWORT.....   | 28        |
| 3.6 ZIELE DER ARBEIT .....   | 30        |
| <b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1 PUFFER UND MEDIEN.....   | 31        |
| 4.2 ANTIKÖRPER.....  | 31        |
| 4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN.....   | 32        |
| 4.4 TEST DER IMMUNISIERUNGSVEKTOREN IN VITRO.....  | 34        |
| 4.5 MÄUSE UND ZELLEN.....  | 35        |
| 4.5.1 Verwendete Mausstämmе .....  | 35        |
| 4.5.2 Isolation von Lymphozyten.....   | 36        |
| 4.5.3 Magnetische Zellsortierung und Markierung der Zellen mit CFDA-SE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-succinimidylester)..... | 36        |
| 4.5.4 Transfersystem.....  | 37        |
| 4.5.5 Isolierung von Dendritischen Zellen aus Lymphknoten .....  | 37        |
| 4.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE/FACS .....  | 38        |
| 4.6.1 In vivo Proliferationsassay.....   | 39        |
| 4.6.2 Färbungen von Zellen.....  | 39        |
| 4.6.3 Restimulation mit PMA/Ionomycin und Fixierung.....   | 40        |
| 4.6.4 Liposomenfärbung.....  | 40        |
| 4.7 DNA IMMUNISIERUNG.....   | 42        |
| 4.8 SERUMANTI-KÖRPERBESTIMMUNG.....  | 42        |
| 4.9 DTH-REAKTION .....   | 43        |
| 4.10 ASSAY ZUR BESTIMMUNG ANTIGENSPEZIFISCHER CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> GEDÄCHTNISZELLEN .....                     | 44        |
| 4.11 SIGNIFIKANZTEST .....   | 44        |
| <b>5. ERGEBNISSE.....</b>  | <b>45</b> |
| 5.1 AUFBAU DER VERWENDETEN ANTIGENVEKTOREN .....   | 45        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1.1 Expression des Ovalbumins <i>in vitro</i> .....   | 46        |
| 5.1.2 pli80-OVA führt zur Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle <i>in vitro</i> .....  | 47        |
| 5.1.3 Analyse der antigenspezifischen Th Zellantwort <i>in vivo</i> .....   | 49        |
| 5.1.3.1 Analyse antigenspezifischer Zellen mit Hilfe des Transfersystems.....   | 49        |
| 5.1.3.2 pli80-OVA und pOVA führen zu Proliferation <i>in vivo</i> .....   | 51        |
| 5.1.3.3 Die Antikörperproduktion ist abhängig von der Lokalisation des Ovalbumins .....   | 52        |
| 5.2 MODULATION DER IMMUNANTWORT MITTELS DNA KOIMMUNISIERUNG .....   | 53        |
| 5.2.1 IL-4 Koimmunisierung mit pli80-OVA hat keinen Effekt auf die Th-Polarisierung.....  | 54        |
| 5.3 ANALYSE UND CHARAKTERISIERUNG DER TH1-POLARISIERUNG NACH IMMUNISIERUNG MIT DEM LI-FUSIONSKONSTRUKT .....                        | 56        |
| 5.3.1 Genegun Immunisierung mit pli80-OVA induziert starke Th1 Polarisation.....  | 56        |
| 5.3.2 Untersuchung der Rolle von CpG Motiven bei der Th1-Polarisierung .....  | 58        |
| 5.3.2.1 Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung ist nicht auf einen Signalweg über MyD88 zurückzuführen .....                | 58        |
| 5.3.3 Untersuchung der Rolle von B-Zellen bei der Th1 Polarisierung .....   | 60        |
| 5.3.3.1 B-Zellen als APCs haben keinen Einfluss auf Th-Zellaktivierung und -differenzierung nach Genegun Immunisierung.....         | 60        |
| 5.3.4 Ist die Antigenpräsentation ausschließlich durch direkt transfizierte DCs verantwortlich für die Th1-Polarisierung? .....     | 62        |
| 5.3.5 Nachweis und Untersuchung der Ova-Peptid präsentierenden Zellen.....  | 65        |
| 5.3.5.1 Detektion der Antigenpräsentation mittels Liposomenfärbung .....  | 65        |
| 5.4 UNTERSUCHUNG DER CD4 <sup>+</sup> GEDÄCHTNISZELLEN NACH GENEGUN IMMUNISIERUNG.....  | 68        |
| 5.4.1 Identifikation und Untersuchung endogener, antigenspezifischer CD4-Lymphozyten mit Hilfe des Markers CD154 (CD40 Ligand)..... | 68        |
| 5.4.3.1 Beschränkte Antigenpräsentation induziert CD154 exprimierende Gedächtniszellen .....  | 69        |
| 5.5 DIE DTH-REAKTION ALS KRANKHEITSMODELL EINER TH1-VERMITTELTEN ENTZÜNDUNGSREAKTION.....   | 72        |
| 5.5.1 Untersuchung der Th1-Reaktion nach pli80-OVA Immunisierung anhand der Fußsohlenschwellung.....                                | 73        |
| 5.6 KOIMMUNISIERUNG MIT siRNAs GEGEN DIE UNTEREINHEITEN DES IL-12.....  | 74        |
| 5.6.1 siRNA gegen die Untereinheiten von IL-12, p35 und p40 sind funktionell <i>in vitro</i> .....                                  | 75        |
| 5.6.2 Koimmunisierung mit siRNA-Vektoren gegen IL-12 Untereinheiten und ihr Einfluss auf die Polarisierung der Th-Zellen.....       | 76        |
| 5.6.3 Wiederholung der Koimmunisierung mit siRNA-Vektor gegen IL-12 Untereinheit p35.....   | 78        |
| 5.7 ANWENDUNG DES PLI80-ANTIGENPLASMIDS IN EINEM KRANKHEITSMODELL FÜR ALLERGISCHES ASTHMA.....                                      | 80        |
| 5.7.1 Versuchsdurchführung .....  | 80        |
| 5.7.2 Effekt der Immunisierung mit dem pli80-Vektor auf die allergische Entzündungsreaktion.....                                    | 81        |
| <b>6. DISKUSSION .....</b>  | <b>83</b> |
| 6.1 GEZIELTE ANTIGENEXPRESSION ZUR MODULATION DER IMMUNANTWORT .....  | 83        |
| 6.1.1 li-Ovalbumin intrazellulär lokalisiert und über MHC-II-positive Zellen präsentiert .....                                      | 84        |
| 6.2 KEINE VERBESSERTE WIRKUNG DER KOIMMUNISIERUNG MIT PLI80-OVA .....   | 86        |
| 6.2.1 Koimmunisierung mit pIL-4 hat keine Wirkung auf die Th-Zelldifferenzierung .....  | 86        |

## Inhaltsverzeichnis

---

|   |            |
|---|------------|
| 6.2.2 Vorteile für den Einsatz der siRNA-Technologie bei DNA Immunisierungen....  | 87         |
| 6.2.2.1 Einfluss der Koimmunisierung mit siRNA gegen IL-12 auf die Th-Zelldifferenzierung .....   | 88         |
| 6.3 MÖGLICHE URSACHEN FÜR DIE TH1-POLARISIERUNG .....   | 90         |
| 6.3.1 CpG Motive führen nicht zur Th1-Differenzierung nach pli80-OVA Immunisierung .....  | 91         |
| 6.3.2 Beteiligung antigenspezifischer B-Zellen an der Immunantwort hat keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung .....                     | 93         |
| 6.3.3 Wird die Th-Zelldifferenzierung beeinflusst wenn die Antigenpräsentation ausschließlich über direkt transfizierte APCs stattfindet? ..... | 94         |
| 6.3.4 Kein Nachweis der Peptid-präsentierenden Zellen möglich .....   | 95         |
| 6.4 IMMUNISIERUNG MIT PLI80-OVA INDUZIERT CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ -PRODUZIERENDE MEMORYZELLEN .....                                       | 96         |
| 6.6 DTH-REAKTION ALS TH1 VERMITTELTE ENTZÜNDUNGSREAKTION .....  | 98         |
| 6.8 AUSBLICK .....  | 100        |
| <b>7. LITERATUR .....</b>   | <b>101</b> |
| <b>8. ANHANG .....</b>  | <b>111</b> |