

### 3. Einleitung

#### 3.1 Das Immunsystem im Allgemeinen

Im Laufe der Evolution wurde es für mehrzellige Lebewesen notwendig, komplexe und effektive Abwehrmechanismen zu entwickeln, die es ihnen ermöglichen, sich gegen die ständige Bedrohung durch schädliche Einflüsse, wie Viren, pathogenen Mikroorganismen, Parasiten und andere Krankheitserreger zu verteidigen. Diese Abwehrmechanismen werden in ihrer Gesamtheit als Immunsystem bezeichnet. Das menschliche Immunsystem lässt sich prinzipiell in zwei große Bereiche unterteilen: das angeborene (natürliche) und das erworbene (adaptive) Immunsystem.

Das **angeborene Immunsystem** bildet die erste Abwehrlinie zur Bekämpfung pathogener Organismen und Parasiten. Diese Abwehr wird von phagozytierenden Zellen, natürlichen Killerzellen und anderen Mechanismen vermittelt. Die natürlichen Killerzellen sind, unter anderem für die Kontrolle entarteter Körperzellen verantwortlich und können so die Entstehung von bösartigen Tumoren verhindern. Die phagozytierenden Zellen, zu denen unter anderem Granulozyten und Makrophagen gehören, können infektiöse Pathogene aufnehmen und vernichten.

Nachdem es einem Krankheitserreger gelungen ist, die äußere Barriere der Haut bzw. der Schleimhäute zu durchdringen, wird dieser von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und eliminiert. Die Erkennung beruht auf Rezeptoren, den sogenannten PAMPs "pathogen associated molecular pattern". PAMPs binden Teile von Mikroorganismen, wodurch die Freisetzung chemischer Botenstoffe, sogenannter Zytokine und Chemokine, erfolgt. Die freigesetzten Mediatoren haben verschiedene Effekte, die in ihrer Gesamtheit als Entzündung bezeichnet werden. Das Ziel der angeborenen Immunität ist es, den Erreger zu eliminieren.

Die **erworbene Immunität** wird von spezialisierten Zellen, den sogenannten T- und B-Lymphozyten vermittelt. Die Besonderheit dieser Lymphozyten besteht in ihren speziellen Rezeptoren, mit denen sie in der Lage sind körperfremde Moleküle (Antigene) zu erkennen. Diese Art der Antigenerkennung beruht darauf, dass jede Zelle über einen Rezeptor verfügt der für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist. Die Spezifität des Rezeptors entsteht, durch die zufällige Zusammenlagerung unterschiedlicher

Gensegmente, während der Entwicklung der Lymphozyten. Dadurch entsteht eine enorme Vielfalt an Rezeptor-Spezifitäten (ca.  $10^{12}$  spezifische Antigenrezeptoren), wodurch eine große Anzahl von Antigenen erkannt wird.

Die Lymphozyten unterteilen sich in zwei große Bereiche: die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten.

Die **B-Lymphozyten** entstehen im Knochenmark. Sie tragen den B-Zellrezeptor (BCR) und sind damit in der Lage, Antigen-Strukturen innerhalb von Proteinen zu erkennen und dadurch Antigene, die zur Spezifität des Rezeptors passen, aufzunehmen. Der BCR ist ein membranständiges Immunglobulin (Ig). Nach Aktivierung, mit dem für sie spezifischem Antigen, vollziehen sie einen Antikörperklassenwechsel und differenzieren in Antikörper produzierende Plasmazellen. Diese Antikörper, oder auch Immunglobuline genannt, sind vereinfacht eine lösliche Form des B-Zellrezeptors und besitzen daher die gleiche Spezifität. Sie binden an pathogene Organismen bzw. Bestandteile und vermitteln dadurch die Lyse oder Neutralisierung.

Die Entwicklung der **T-Lymphozyten** findet im Thymus statt, wobei sie, wie alle hämatopoetischen Zellen, aus dem Knochenmark stammen. Sie tragen den T-Zellrezeptor (TCR) und erkennen damit, im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, Antigenfragment (Peptide), die von **Antigen-präsentierenden Zellen** (APC) präsentiert werden. Nach der Aktivierung mit dem für sie spezifischem Antigen teilen sich die T-Zellen im Verlauf mehrerer Tage vielfach. Diese Teilung wird als Proliferation bezeichnet. Folglich entsteht eine sehr hohe Anzahl an Lymphozyten mit derselben Spezifität, die nun in ausreichender Zahl in der Lage sind, den Erreger zu bekämpfen. Darüber hinaus exprimieren sie lösliche Mediatoren, die so genannten Zytokine und eine Reihe von Oberflächenmolekülen. Die Aufgaben von T-Zellen sind vielfältig, daher existieren verschiedene Subpopulationen, auf die im Einzelnen noch eingegangen werden soll.

### 3.2 Die T-Lymphozyten

Den T-Zellen wird ihr Antigen in Form von Peptidfragmenten präsentiert. Diese Aufgabe übernehmen spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen (APC). Diese Zellen exprimieren so genannte Histokompatibilitätsantigene (MHC) auf ihrer Oberfläche. Auf diesen Molekülen sind Peptide gebunden, die von abgebauten Krankheitserregern stammen, oder

durch intrazelluläre Pathogene in die Zelle gelangt sind. Genauer betrachtet erkennt der TCR das Peptid und einen Teil des MHC-Moleküls in Kombination. Die Präsentation des Peptids kann durch zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen erfolgen, entweder über MHC-I oder über MHC-II.

Die Moleküle der MHC-Klasse-I werden durch sogenannte **CD8<sup>+</sup> T-Zellen** erkannt. Die vom MHC-I präsentierten Antigene stammen von Proteinen, die in der Wirtszelle selbst produziert werden, in Peptidfragmente zerlegt werden und auf das MHC-I-Molekül geladen werden. Im Falle eines Befalls mit intrazellulären Erregern, wie z. B. Viren, erkennt die CD8<sup>+</sup> Zelle das fremde Peptid und wird aktiviert. Aktivierte CD8-Zellen können, durch die Sekretion so genannter zytotoxischer Moleküle, die infizierte Zelle töten und werden daher auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Die Ausbreitung des Erregers und die Infektion weiterer Zellen im Körper kann somit verhindert werden. Da ein Befall mit derartigen Erregern jede Körperzelle treffen kann, wird das MHC-I von fast jeder Zelle exprimiert und nicht ausschließlich von APCs.

Die Moleküle der MHC-Klasse-II werden von den so genannten **CD4<sup>+</sup> T-Zellen** erkannt. Die vom MHC-II präsentierten Antigene stammen von extrazellulär vorhandenen Pathogenen oder Proteinen, die phagozytiert und in der Zelle verdaut wurden. Mit den entstandenen Peptidfragmenten werden die MHC-II Moleküle beladen. Diese werden, im Gegensatz zum MHC-I, nur von spezialisierten, den professionellen APCs exprimiert. Zu ihnen gehören Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. In besonderen Fällen, können auch Endothelzellen MHC-II-Moleküle exprimieren. Die CD4-Zellen erkennen spezifisch mit ihrem TCR ebenfalls eine Kombination des Peptid/MHC-II-Moleküls. Die auch als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichneten CD4-Zellen übernehmen nach Aktivierung wichtige Helferfunktionen. So aktivieren sie, unter anderem B-Zellen und induzieren die Differenzierung in Plasmazellen sowie den Antikörperklassenwechsel, sie helfen die keimtötenden Eigenschaften von Makrophagen zu mobilisieren oder regulieren die Aktivierung von CD8-Zellen. Damit sind sie maßgeblich dafür verantwortlich, in welchem Maße eine zelluläre oder humorale Immunantwort ausgebildet wird. Die Helferfunktion der CD4 T-Zellen spielt somit eine zentrale Rolle bei der erfolgreichen Bekämpfung einer Infektion. Ihre Bedeutung für das Immunsystem wird deutlich, wenn diese Zellen durch eine Krankheit, wie z. B. AIDS zerstört werden. Wie die Th-Zellen Bereiche der angeborenen und der erworbenen Immunität steuern wird genauer in den nächsten Abschnitten beschrieben.

### 3.2.1 Aktivierung und Gedächtnis der T-Lymphozyten

Für die **Aktivierung** von CD4-Zellen reicht normalerweise das Signal, das durch die Interaktion des TCR mit dem MHC/Peptid Komplex vermittelt wird nicht aus. Dazu wird ein zweites Signal benötigt, das durch die Interaktion so genannter kostimulatorischer Moleküle vonstattengeht. Bei dem Aktivierungsprozess haben die T-Zellen mit den APCs sehr engen Kontakt und bilden eine immunologische Synapse. Dadurch ist die räumliche Nähe zur direkten Interaktion beider Zellen gegeben. Eine der wichtigsten kostimulatorischen Interaktionen ist die Bindung zwischen CD28 der T-Zelle und den von APCs exprimierten B7.1 und B7.2 Molekülen (CD80/CD86). Durch diese Interaktion erhält die T-Zelle ein Signal, das diese dazu veranlasst, IL-2 zu produzieren. Der sowohl autokrin als auch parakrin wirkende Wachstumsfaktor IL-2 bewirkt u.a. die verstärkte Expression des IL-2-Rezeptors auf den T-Zellen. Die Moleküle CD80/CD86 werden nur von aktivierten APCs exprimiert, die zuvor Kontakt mit einem Pathogen hatten. Eine weitere wichtige Interaktion findet zwischen den Molekülen CD40Ligand (CD40L), auf den Th-Zellen, und CD40, auf den APCs, statt. Das Signal nach CD40/CD40L Bindung führt zu einer erhöhten Expression der CD80/CD86 Moleküle auf den APCs, was wiederum zur verstärkten Aktivierung der T-Zellen beiträgt. Diverse andere kostimulatorische Interaktionen zwischen den T-Zellen und den APCs tragen u. a. zur strukturellen Integrität der Synapse bei, sollen aber hier unerwähnt bleiben. Durch diese Interaktion wird die T-Zelle aktiviert und beginnt zu proliferieren und zu expandieren. Durch die starke Proliferation entstehen viele T-Zellen mit derselben Spezifität, wodurch es zu einer sehr starken spezifischen Abwehrreaktion kommt. Zusätzlich erlernt die T-Zelle lösliche Botenstoffe, so genannte **Effektor-Zytokine** zu exprimieren.

Eine vorliegende Infektion muss also vorerst von den Zellen des angeborenen Immunsystems in Schach gehalten werden, bis die T-Zellen durch klonale Expansion der Vorläuferzellen zu Effektorzellen differenziert sind, um die Mikroorganismen erfolgreich bekämpfen zu können. Dabei kommt es zur Ausbildung des **immunologischen Gedächtnis**, einem einzigartigen Phänomen des erworbenen Immunsystems der Vertebraten. Die meisten Lymphozyten begehen nach der Primärantwort Apoptose. Jedoch bleibt eine kleine Population an Zellen übrig, die im Organismus verweilen, die so genannten Gedächtniszellen. Sie haben die Eigenschaft bei einer wiederholten Infektion mit demselben Erreger, wieder zu proliferieren und dieselben Effektor-Zytokine zu produzieren, wodurch sie viel schneller und effektiver reagieren. Die Gedächtniszellen

bieten einen lebenslangen Schutz und sind die Basis für eine erfolgreich schützende Impfung.

### 3.2.2 T-Helferzell-Subpopulationen

Die naiven Th-Zellen sind in der Regel antigenunerfahrene Zellen, die in die T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und Lymphknoten einwandern können. Nach circa 2 Tagen wandern sie wieder aus und in ein anderes lymphatisches Organ ein. Somit zirkulieren die naiven Th-Zellen ständig im Körper, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sie bald auf das zu ihrer Rezeptorspezifität passende Antigen treffen.

Auf Grund der vielfältigen Eigenschaften der CD4-Zellen werden diese in Subpopulationen unterteilt. Danach unterscheiden sich diese hauptsächlich nach der differentiellen Expression löslicher, sekretierter Zytokine. Zwei wichtige Typen sind die sogenannten Th1- und Th2-Zellen, die zum ersten Mal 1986 von *Moosmann et. al.* beschrieben wurden. Hiernach werden die **Th1-Zellen** als Interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  und  $\beta$  (TNF $\alpha$ ,  $\beta$ ) sowie Interleukin 3 (IL-3) Produzenten charakterisiert, während die Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 exprimieren. Th1-Zellen induzieren eine zelluläre Immunantwort und werden anhand von IFN $\gamma$  identifiziert. Das IFN $\gamma$  ist für die Aktivierung von Makrophagen zuständig und unterstützt, in Kombination mit IL-2, die Reifung von zytotoxischen T-Zellen und somit die Bekämpfung von intrazellulären Erregern<sup>1</sup>. B-Zellen werden durch IFN $\gamma$  dazu angeregt den Klassenwechsel zu IgG2a zu vollziehen. Die **Th2-Zellen** induzieren eine humorale Immunantwort und somit die B-Zellaktivierung. IL-4, welches das Th2-Zytokin ist, anhand dessen sie identifiziert werden, stimuliert, in Kombination mit CD40L, die B-Zellproliferation und aktiviert deren Differenzierung zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle<sup>2,3</sup>. Die Zytokine der Th-Subpopulationen können die Ausbildung des jeweiligen anderen Th-Zelltyps hemmen. So wurde z. B. erkannt, dass IL-4 die Differenzierung von Th1-Zellen unterbinden kann, bzw. IFN $\gamma$  in der Lage ist, der Th2-Zellentwicklung entgegenzuwirken<sup>4-6</sup>.

Die Richtung, in die die naiven Zellen differenzieren ist nicht vorherbestimmt und wird zu Beginn der Aktivierung der Th-Zellen determiniert und auch allgemein als "Priming" bezeichnet.

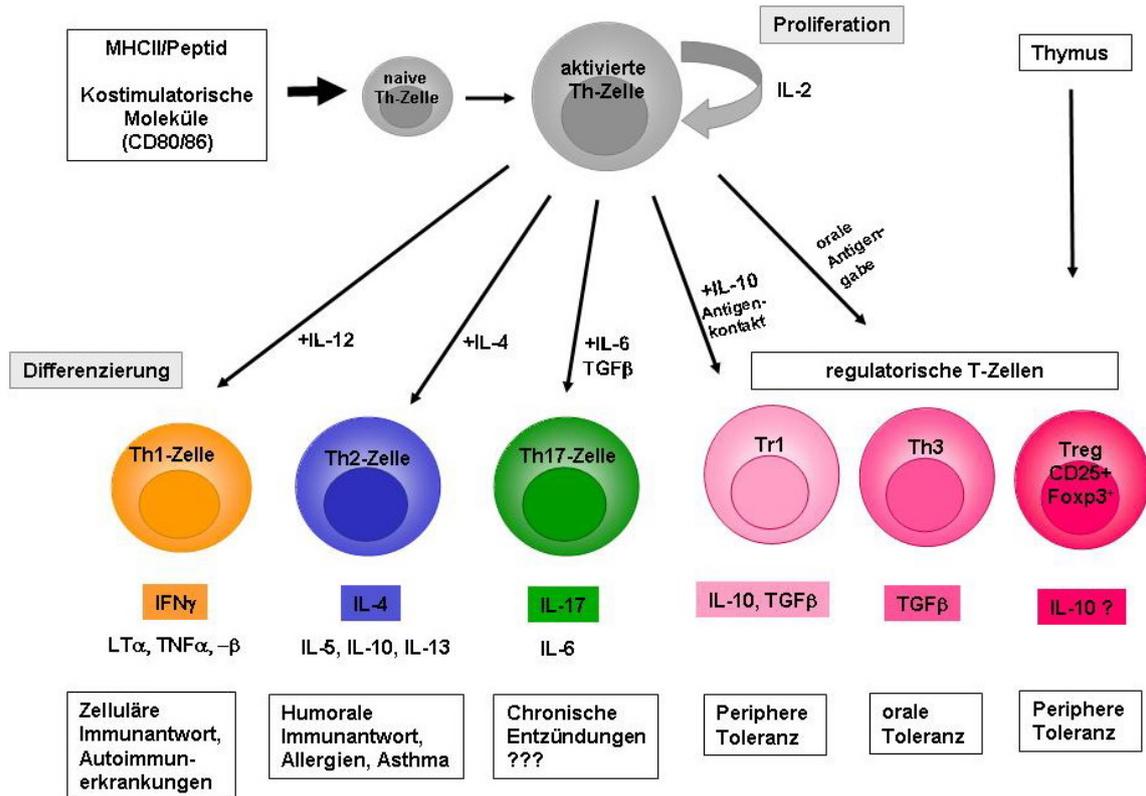
Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die klassische Differenzierung in die Effektorpopulationen Th1 und Th2 modifiziert werden muss. Naive Th-Zellen können

weiterhin in Th17 Zellen differenzieren und zeichnen sich durch Produktion der Zytokine IL-17, IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  aus<sup>7</sup>. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Th17 Zellen in Anwesenheit von  $\text{TGF}\beta$  und IL-6 entwickeln<sup>8,9</sup>. Dabei ist das, von APC produzierte Zytokin, IL-23 wichtig für die Expansion und das Überleben dieser Zellen<sup>10</sup>. Die Anwesenheit von IL-4 und  $\text{IFN}\gamma$  inhibiert die Differenzierung in Th17.

Neben den sich aus naiven Th-Zellen differenzierenden Populationen, existieren weitere  $\text{CD4}^+$  Subpopulationen. So wurden auch Th0 Zellen beschrieben, die Zytokine beider Muster produzieren<sup>11,12</sup>. Eine weitere wichtige Subpopulation der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg), die in der Lage sind, Immunantworten zu inhibieren anstatt, sie zu induzieren<sup>13,14</sup>. Es werden unterschiedliche Populationen als regulatorisch bezeichnet, die am besten charakterisierten unter ihnen sind wohl die  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-Zellen. Diese Zellen zeichnen sich phänotypisch durch die konstitutive Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) und des Transkriptionsfaktors Foxp3 aus<sup>15,16</sup>. Sie sind hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz verantwortlich<sup>17</sup> und haben die Aufgabe, unerwünschte Autoimmunreaktionen zu unterdrücken. Ihre Aktivität wird durch Ausschüttung suppressorischer Zytokine, wie IL-10 oder  $\text{TGF}\beta$  sowie durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (z. B. GITR, CTLA-4) vermittelt<sup>18,19</sup>. Die Treg produzieren keine der typischen Effektorzytokine, sind jedoch in der Lage, die Proliferation und Zytokinproduktion anderer T-Zellen zu hemmen.

Eine andere  $\text{CD4}^+$  Zellpopulation mit suppressorischer bzw. regulatorischer Kapazität, sind die Tr1-Zellen, die durch Stimulation mit IL-10 und Antigenkontakt *in vivo* generiert werden können<sup>20</sup>.

Die Abbildung 1 stellt noch einmal anschaulich die unterschiedlichen Differenzierungswege dar, die eine naive Th-Zelle einschlagen kann.



**Abb1 Aktivierung von Th-Zellen und ihre Differenzierung**

Naive Th-Zellen werden durch APCs, die kostimulatorische Moleküle und Peptide über MHC-II-Moleküle präsentieren aktiviert. Dadurch werden sie dazu angeregt, das Zytokin IL-2 zu produzieren und beginnen zu proliferieren. Die Anwesenheit bestimmter Zytokine während der Aktivierung beeinflusst die Differenzierung der Th-Zellen. Dabei induziert IL-12 die Th1-Differenzierung, IL-4 die Bildung von Th2-Zellen und die Anwesenheit von IL-6 und TGF $\beta$  die der TH17 Zellen. Die für die verschiedenen Th-Zelldifferenzierungen typischen Zytokine, sind farbig unterlegt. Zwei T-Zelltypen mit regulatorischem Charakter sind die Tr1- und Th3-Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen entstehen können. Die FoXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen werden im Thymus gebildet und sind eine weitere wichtige Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.2.3 Einfluss Antigen-präsentierender Zellen auf die Differenzierung von T-Helferzellen

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Differenzierung der Th-Zellen. Derartige Faktoren sind z. B. die Stärke und die Art der Kostimulation, die Anwesenheit bestimmter Zytokine zum Zeitpunkt der Aktivierung, sowie die Stärke der Bindung zwischen TCR und MHC-II-Peptidkomplex.

Zu Beginn einer Immunantwort werden die APCs durch Aufnahme von Antigen aktiviert, wodurch es zur stärkeren Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 sowie

der MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche kommt, was eine Aktivierung der T-Zellen zur Folge hat<sup>21-23</sup>. Die reifen APCs produzieren, in Folge ihrer Aktivierung bestimmte Zytokine, die wiederum einen Einfluss auf die Th-Zellpolarisation haben. Die Sekretion des Zytokins IL-12, während der Aktivierungsphase der Th-Zellen induziert die Differenzierung zu Th1-Zellen<sup>24,25</sup>. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von IL-4 zu einer Th2-Polarisierung<sup>26,27</sup>. Des Weiteren können unreife APCs, die nur schwach kostimulatorische Moleküle exprimieren und das Zytokin IL-10 produzieren, die Bildung aneurer bzw. regulatorischer Tr1-Zellen fördern<sup>28-31</sup>. Weitere Faktoren, die die Polarisation von Th-Zellen beeinflussen, sind z. B. die Sequenz des antigenen Peptids, das über das MHC-II-Molekül präsentiert wird<sup>32</sup>, sowie die Bindungsstärke des TCR mit dem MHCII/Peptid-Komplex<sup>33,34</sup>. Auch kann eine unterschiedliche Anzahl von MHCII/Peptid Komplexen, die auf der Oberfläche von APCs präsentiert werden, zu unterschiedlichen Th-Zellantworten führen<sup>35-38</sup>. So führt beispielsweise eine hohe Dichte an diesen Komplexen eher zu einer Th1-Antwort, eine geringe Dichte vorwiegend zu einer Th2-Antwort.

### 3.2.4 Toleranz und Autoimmunität

Während der Entwicklung der T-Lymphozyten findet die zufällige Zusammenlagerung der Gensegmente der Lymphozytenrezeptoren statt, wodurch eine große Anzahl an Rezeptorspezifitäten entsteht. Dabei werden nicht nur Spezifitäten gebildet, die Fremd-Antigen erkennen, sondern auch Rezeptoren, die Auto-Antigene binden können. Der größte Teil solcher selbst- oder autoreaktiven Zellen (circa 95%) werden während die so genannte negative Selektion durch programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Es gibt wenige Zellen, die diesem **zentralen Toleranzmechanismus** im Thymus entgehen und in die peripheren lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten) einwandern. Diese potentiell selbstreaktiven Zellen werden durch **periphere Toleranzmechanismen** in Schach gehalten, um eine Schädigung durch derartige Zellen zu verhindern. Die periphere Toleranz beruht auf einer modifizierten Aktivierung der T-Zellen. Autoreaktive Lymphozyten, die körpereigene Peptide erkennen, gehen in einen nichtreaktiven, **anergen Zustand** über. Das geschieht bei der Interaktion der selbstreaktiven T-Zelle mit der APC, die ein Selbst-Peptid auf dem MHC Molekül gebunden hat. Solche APCs sind nicht aktivierte Zellen, die somit keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren. Durch das Fehlen des zur Aktivierung benötigten zweiten Signals wird die Expansion und

Zytokinproduktion der T-Zelle verhindert. Sie geht in die Anergie über. Auf diese Weise z. B. können Autoimmunreaktionen des Körpers verhindert werden. Des Weiteren können autoreaktive T-Zellen in der Peripherie durch Apoptose eliminiert werden.

Wie bereits erwähnt, spielen die  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine sehr wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass es zum Ausbruch von Autoimmunerkrankheiten kommt, wenn diese Th-Zellpopulation fehlt<sup>39</sup>. Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob die Wirkung dieser Zellen antigenspezifisch oder -unspezifisch ist.

### 3.2.4.1 Rolle der Th-Subpopulationen bei Autoimmunerkrankungen

Die Reaktion auf nicht pathogene Antigene verursacht im Wesentlichen drei Arten von medizinischen Problemen: immunologisch vermittelte Hypersensitivitätsreaktionen (Allergien, Asthma), Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung. In diesem Abschnitt soll vor allem auf Autoimmunerkrankheiten und Allergien eingegangen werden sowie auf die Rolle, die Th-Zellen bei der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen.

Die Gewebszerstörung, die bei Autoimmunität auftritt, beruht auf der Wirkung proinflammatorischer Zytokine, wie z. B.  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  und  $IL-1$ <sup>40</sup>. Auf Grund der Rolle der Th1-Zellen, bei der Produktion dieser entzündungsfördernden Zytokine, hat man die Vorstellung entwickelt, dass Th1-Zellen eine Autoimmunerkrankheit eher fördern. Th2-Zellen, die die Bildung von Th1-Zellen hemmen können, gehen im Gegensatz dazu mit einer Verbesserung der Entzündung einher. So konnte es in einem Mausmodell der TypI-Diabetes (NOD) sowie auch in einem Mausmodell für Multiple Sklerose (EAE) gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von Th1-Zellen die Krankheit verstärkt aber der Th2-Zelltransfer eine eher protektive Wirkung ausübt<sup>41-44</sup>. In weiteren Autoimmunmodellen, wie z. B. in einem Arthritismodell<sup>45,46</sup> oder einem Modell für Thyroiditis<sup>47</sup>, wirkt sich der Transfer von Th2-Zellen krankheitsmildernd aus.

Des Weiteren können nicht nur Th1-Zellen verantwortlich für eine schädigende Wirkung aufgrund "harmloser" Antigene sein. Für das Auftreten allergischer TypI-Reaktionen z. B. sind IgE Antikörper verantwortlich, die im Blut zirkulieren und an IgE-spezifische Rezeptoren auf Mastzellen binden können. Durch spezifische Antigene kann IgE diese Rezeptoren quervernetzen und die Mastzellen dadurch aktivieren. Es kommt zur Freisetzung von in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Effektormolekülen<sup>48</sup>. Für die

Bildung von IgE Antikörpern sind IL-4-produzierende Th2-Zellen verantwortlich. Th2-Zellen interagieren mit den B-Zellen über CD40L-CD40 Interaktion und gleichzeitiger Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor auf B-Zellen<sup>49</sup>. Dadurch kommt es zum Antikörperklassenwechsel zu IgE, der wiederum durch IFN $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen gehemmt werden kann. Somit würde eine Th1-Verschiebung, durch die Inhibition der Th2-Zellen und damit induzierter IgE Antikörperproduktion, zur Verbesserung der allergischen Symptome führen<sup>50</sup>.

Eine dritte Th-Zellpopulation, die eine Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen, wie die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) oder Collagen induzierter Arthritis (CIA) hat, ist die Th17-Population. Bisher waren EAE und CIA eher als Th1-Zell vermittelte Erkrankungen bekannt, jedoch wurde ein Ausbruch dieser Krankheiten auch in IFN $\gamma$ -defizienten Mäusen beobachtet<sup>51,52</sup>. Dies deutete darauf hin, dass die Induktion IFN $\gamma$  produzierender Th1-Zellen durch IL-12 nicht ausschließlich verantwortlich ist. Es wurde erkannt, dass sich die Zytokine IL-12 und IL-23 eine Untereinheit teilen<sup>53</sup>. Beide sind Heterodimere, wobei sich IL-12 aus den Untereinheiten p35 und p40 zusammensetzt und IL-23 aus p19 und p40. Aus Untersuchungen mit IL-12 bzw. IL-23 defizienten Mäusen ging hervor, dass Tiere, die kein p19 bzw. p40 exprimieren, auch nicht an EAE oder CIA erkrankten, wohingegen Tiere ohne p35 krank wurden<sup>54,55</sup>. Die Differenzierung in Th17-Zellen kann durch Anwesenheit des Th2-Zytokins IL-4 bzw. des Th1-Zytokins IFN $\gamma$  gehemmt werden. Die Depletion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 z. B. milderte den Krankheitsverlauf der CIA<sup>56</sup>, wobei eine Überexpression des Zytokins im Gelenk zu einer Verschlimmerung führte<sup>57</sup>.

Die Wechselwirkungen der hier erwähnten Th-Zellpopulationen und ihre Rolle in Autoimmunerkrankungen, veranschaulicht wie schwierig die Behandlung derartiger Erkrankungen und wie wichtig die Aufklärung der Mechanismen, die diesen Erkrankungen zu Grunde liegen, ist.

### **3.2.4.2 Behandlung von Autoimmunkrankheiten**

Derzeitige Behandlungsmöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen basieren meist auf unspezifisch wirkenden, immunsuppressorischen Medikamenten, die nicht gezielt wirken, sondern das Immunsystem in seiner Gesamtheit beeinflussen. Solche Medikamente

bringen oft teils gravierende Nebenwirkungen mit sich. Auch neuere Therapiemöglichkeiten wie der Einsatz von Antikörpern gegen pro-inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise anti-TNF $\alpha$  Antikörper, zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, bewirken zwar eine Rückbildung der Symptome und möglicherweise auch der Krankheitsprogression, können die Erkrankung selbst jedoch nicht heilen.

Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach neuen Therapieansätzen, durch die vor allem die ursächlichen Mechanismen von Autoimmunerkrankungen behandelt werden. Idealerweise ist das Ziel dabei die Toleranz gegenüber einem bestimmten Autoantigen wiederherzustellen. Da viele Autoimmunerkrankungen durch einen bestimmten Th-Zelltyp vermittelt werden (vergl. 3.2.4.1), sind somit die Th-Zellen, insbesondere deren Differenzierung in verschiedene Subpopulationen, ein möglicher Ansatzpunkt für Therapien. Um auf die Th-Zelldifferenzierung Einfluss zu nehmen macht man sich beispielsweise die Wirkung von Zytokinen zunutze, durch die die Differenzierung des jeweils anderen Th-Zelltyps inhibiert, bzw. eines bestimmten Th-Zelltyps induziert werden kann.

Zusätzlich versucht man auch, nicht nur die Th-Zelldifferenzierung der autoreaktiven T-Zellen umzulenken und somit deren entzündungsfördernde Wirkung zu hemmen, sondern auch die Bildung einer zusätzlichen, "therapeutisch" wirksamen Th-Zellpopulation zu induzieren. Hierbei wäre die Induktion von regulatorischen T-Zellen, die in der Lage sind die pathogenen Th-Zellen zu unterdrücken, das Ziel.

Um zu gewährleisten, dass dieser gezielten Differenzierung bzw. Toleranzinduktion nur die Th-Zellen beeinflusst werden, die bei der autoimmunen Entzündung eine Rolle spielen, muss dies in einer antigen-spezifischen Art und Weise geschehen. Andererseits bestünde die Gefahr, dass es zu einer generellen Beeinflussung des Immunsystems kommt, was ähnliche Nachteile, wie die derzeitigen Therapiestrategien hätte.

Daher wurde in dieser Doktorarbeit die DNA Immunisierung als eine Methode benutzt, mit der es möglich ist, die antigen-spezifische Stimulation von Th-Zellen mit einer lokalen, gezielten Expression von Modulatoren, wie Zytokinen zu verbinden und dadurch eine optimale Modulation der Th-Zelldifferenzierung zu erreichen.

### 3.3. DNA Immunisierung

Unter DNA Immunisierung, versteht man die Applikation von Expressionsplasmiden für das jeweilige Antigen. Dabei ist das Gen für ein bestimmtes Antigen auf einem Vektor kodiert, der in Bakterien amplifiziert werden kann. Die DNA kann somit in relativ großen Mengen hergestellt werden und auf einfachem Wege aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt werden.

Es gibt mittlerweile unterschiedliche Methoden, mit denen die DNA verabreicht werden kann. Eine der häufigsten ist die direkte Injektion z.B. in den Muskel, oder subkutane bzw. intradermale Applikation. Im Jahre 1990 konnte von *Wolff et. al.*<sup>58</sup> zum ersten Mal gezeigt werden, dass es durch die Injektion von Antigen kodierender Plasmid DNA in den Muskel zum Genetransfer und anschließender Genexpression durch die Muskelzellen kommt. Eine andere Methode durch die DNA appliziert werden kann ist durch die Verwendung der Genegun<sup>59,60</sup>. Hierbei werden winzige Goldpartikel (1µm Durchmesser) mit DNA beladen und durch Heliumdruck in die obersten Hautschichten geschossen.

Die Vorteile der Immunisierung mit DNA, im Vergleich zu Proteinimpfstoffen, sind zum einen, dass nur die Plasmid-DNA, die für bestimmte Proteine kodiert, zur Immunisierung benötigt wird. Plasmide sind zudem stabiler als Proteine, was die Temperaturempfindlichkeit betrifft. Zum anderen können mehrere Plasmide, die für verschiedene Proteine kodieren, gleichzeitig verabreicht werden. Dabei ist die Herstellung größerer DNA-Mengen, im Vergleich zu einer kosten- und zeitaufwendigen Proteinaufreinigung, von Vorteil. Zusätzlich werden bei der Applikation "nackter" DNA, die Risiken, die bei einer Immunisierung mit Lebendimpfstoffen, wie abgeschwächten Viren oder Bakterien auftreten können, umgangen.

Die Menge der applizierten Plasmid DNA, die nötig ist, um eine Immunantwort auszulösen, beträgt bei der Nadelinjektion 10-100µg, im Gegensatz dazu ist bei der Genegun-Immunisierung nur eine DNA Menge von 0,1-1µg nötig<sup>61</sup>. Die produzierte Antigenmenge liegt nach der Immunisierung mit DNA im Picogramm- bis Nanogrammbereich. Dies lässt darauf schließen, dass nur sehr wenige Zellen transfiziert sind und das Antigen produzieren. In der Mehrheit der Publikationen wird von einer sehr geringen Zahl direkt transfizierter DCs (circa 50-100 Stück), nach Genegun Immunisierung ausgegangen<sup>62,63</sup>, es gibt allerdings auch eine dem widersprechende Arbeit von *Garg et. al.*<sup>64</sup>, die zeigen, dass 10% der im Lymphknoten vorhandenen DCs nach

Genegun Immunisierung transfiziert sind, was wiederum eine sehr hohe Zahl darstellt. Diese Anzahl reicht jedoch aus, um eine messbare Immunantwort zu erzeugen.

Durch die Verwendung geeigneter Promotoren wird die Expression der gewünschten Proteine bzw. Antigene in den transfizierten, eukaryotischen Zellen *in vivo* erzeugt. Dabei werden unterschiedliche Zelltypen transfiziert. Die Präsentation des Antigens kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen können direkt transfizierte Zellen (Keratinocyten, Monozyten, u.a. MHC-II-neg Zellen), die prozessierte Peptide über MHC-I-Moleküle präsentieren und zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Zum anderen können APCs direkt transfiziert werden und Peptide präsentieren. Zusätzlich nehmen APCs das Antigen, welches von transfizierten Zellen sekretiert wurde, auf und präsentieren es. Dadurch werden Peptide über MHC-II-Moleküle präsentiert und CD4<sup>+</sup> Th-Zellen aktiviert. Sekretiertes Antigen ist zudem zugänglich für B-Zellen, die dieses spezifisch über ihren B-Zellrezeptor aufnehmen und auch über MHC-II-Moleküle präsentieren und dadurch, mit der Hilfe der Th-Zellen aktiviert werden und zu Plasmazellen differenzieren. Somit kommt es nach DNA Immunisierung nicht nur zur zellulären Immunantwort, sondern auch zur humoralen Immunantwort und zur Produktion von Antikörpern durch differenzierte Plasmazellen.

Es gibt verschiedene Ansichten darüber, ob die direkt transfizierten Zellen oder die Zellen, die das Antigen aufgenommen haben, nach DNA Immunisierung den wichtigeren Beitrag zur Immunantwort leisten. *Porgador et. al.*<sup>62</sup> zeigen eine dominante Rolle der transfizierten Zellen, im Gegensatz dazu, zeigen andere Arbeiten, dass Antigen, das von nicht-APCs produziert wurde, den entscheidenden Beitrag zur Immunantwort leistet<sup>65,66</sup>.

In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch DNA Immunisierung eine spezifische und protektive Immunantwort induziert werden konnte, die sowohl zellulärer, als auch humoraler Natur war und die Versuchstiere vor einer Infektion schützte<sup>59,67,68</sup>. Unternehmungen eine DNA Immunisierung gegen infektiöse Krankheiten, verursacht durch Bakterien oder Viren, im Menschen anzuwenden, sind bereits mehrfach erfolgt. Klinische Studien mit Patienten zeigten zumindest schon mal, dass eine Immunisierung mit Plasmid DNA sicher ist und vom Körper toleriert wird<sup>69,70</sup>.

Ein großer Vorteil der DNA Immunisierung ist, dass auf einfachem Wege eine Manipulation der Immunantwort möglich ist. Die Verabreichung von Plasmid DNA erlaubt es, ein bestimmtes Antigen zusammen mit einem immunmodulatorischen Molekül zu verabreichen. Solche Moleküle können z. B. für Zytokin oder kostimulatorische Moleküle kodieren, wodurch die Immunreaktion verstärkt oder in eine bestimmte Richtung

gelenkt werden kann<sup>71-75</sup>. Des Weiteren ist bei der DNA Immunisierung die genetische Manipulation des Antigens vereinfacht, wodurch beispielsweise auf die Art der Antigenpräsentation Einfluss genommen werden kann.

Auf die Manipulation der Immunantwort durch die DNA Immunisierung soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden.

### 3.3.1 Beeinflussung der Immunantwort durch DNA Immunisierung

Ein großer Teil der veröffentlichten Untersuchungen beschäftigt sich mit der Frage, wie DNA Impfungen optimiert werden können, um die Immunantwort einerseits zu verstärken und andererseits gezielt zu manipulieren<sup>76-78</sup>. In der Literatur sind diverse Protokolle beschrieben, wodurch dies erreicht werden kann.

Beispielsweise kann allein schon durch die Wahl der Immunisierungsrouten die Th-Zelldifferenzierung beeinflusst werden. So wurde bereits früh erkannt, dass die DNA Injektion in den Muskel eher zu einer Th1-Polarisierung führt<sup>79</sup>. Im Gegensatz dazu, wurde eine Begünstigung der Th2-Antwort nach Genegun Immunisierung beschrieben, die durch eine verstärkte IL-4 Produktion und verringerte IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen gekennzeichnet ist<sup>80-83</sup>. Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf die verabreichte Menge an DNA zurückzuführen, die bei der Genegun circa 100 Mal geringer ist, als bei der Injektion in den Muskel. Die in der bakteriellen DNA enthaltenen CpG-Motiven besitzen eine starke adjuvante Wirkung<sup>84</sup> und verstärken in den transfizierten APCs unter anderem die IL-12 Produktion, durch die Interaktion mit dem intrazellulären Toll-Like-Rezeptor-9 (TLR9). Der TLR9 wird in der Maus von allen dendritischen Zellen sowie u. a. von Monozyten und Makrophagen exprimiert. Die verstärkte IL-12 Produktion führt dazu, dass die Th-Zellen dazu angeregt werden verstärkt IFN $\gamma$  zu produzieren<sup>85,86</sup>.

Eine gezielte Manipulation des Th1/Th2-Gleichgewichts kann sehr effektiv durch die zusätzliche Applikation von Plasmiden erreicht werden, auf denen Zytokine<sup>87</sup> oder kostimulatorische Moleküle<sup>75,88</sup> kodiert sind. Bestimmte Zytokine, wie GM-CSF, können z. B. als Adjuvanz, zur Verstärkung einer Immunantwort auf ein Antigen eingesetzt werden<sup>89</sup>. Andere Zytokine sind wiederum besonders geeignet, um eine Differenzierung in Th1-Zellen zu fördern. Dies konnte für IL-12<sup>90</sup>, ein sehr potentes Th1-induzierendes Zytokin, aber auch für andere Zytokine, wie IFN $\gamma$  oder IL-18, bereits gezeigt werden<sup>72,73</sup>.

Des Weiteren kann auch eine Th2-Polarisierung z. B. durch den Einsatz eines IL-4 kodierenden Plasmids induziert werden, wie in einem EAE Mausmodell gezeigt werden konnte, wo es sogar möglich war eine Th1-Antwort in eine protektive Th2-Antwort umzukehren<sup>91</sup>. Die Koimmunisierung mit Zytokin-DNA kann aber nicht nur immunstimulierende, sondern auch -hemmende<sup>92</sup> Wirkung haben, wie eine Studie zeigt, bei der DNA kodierend für IL-10 koappliziert wurde.

Eine Beeinflussung der Immunantwort kann aber nicht nur durch das Einbringen von Molekülen, sondern auch durch das gezielte Ausschalten endogener Moleküle erfolgen. Eine relativ neue und viel versprechende Methode dafür ist der Einsatz von RNA Interferenz<sup>93</sup>, wobei spezifisch die Expression eines bestimmten Gens inhibiert wird. Beispielsweise kann dieser Mechanismus genutzt werden, um die Expression von Oberflächenmolekülen auf den transfizierten Zellen oder die Zytokinexpression herunterzuregulieren. Somit kommt es zu einem Fehlen bestimmter Moleküle und zu einer veränderten Funktion der transfizierten Zellen, was wiederum die Immunantwort beeinflussen kann.

### **3.3.1.1 Modulation durch Verwendung von siRNA**

Eine elegante Methode, zur selektiven Ausschaltung von Proteinexpression wurde von zwei amerikanischen Wissenschaftlern entdeckt. Es waren Craig C. Mello und Andrew Z. Fire<sup>94</sup>, die dafür in diesem Jahr den Nobelpreis für Medizin bekamen. Durch den Einsatz sogenannter siRNA<sup>95</sup> in eukaryotischen Zellen werden RNA-Moleküle sequenzspezifisch abgebaut und somit die Expression bestimmter Proteine verhindert. Das Prinzip wodurch siRNA wirkt, wurde in Pilzen<sup>96</sup>, Pflanzen<sup>97</sup> und Würmern<sup>94,98</sup> bereits beobachtet, bevor man auf die Idee kam, die Methode zum Ausschalten der Genexpression in eukaryotischen Zellen<sup>99</sup> einzusetzen.

Der Wirkmechanismus der siRNA ist relativ einfach. Zuerst wird eine 19-22 Nukleotide (nt) lange doppelsträngige (ds) RNA durch ein Enzym namens Dicer, das der RNase III Familie angehört, in kurze siRNA Fragmente geschnitten. Die kurzen Fragmente binden an einen Proteinkomplex, genannt RISC (RNA-inducing silencing complex), dieser katalysiert die sequenzspezifische Bindung der siRNA an die mRNA, was zur Zerstörung der mRNA führt<sup>95</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Transfektion von Zellen *in vitro* und *in vivo* möglich war, mit isoliert vorliegender siRNA<sup>100,101</sup> sowie unter einem

bestimmten Promotor auf einem Expressionsplasmid kodiert<sup>102,103</sup>, oder in attenuierte Viren eingebaut<sup>104,105</sup>, die Expression bestimmter Proteine vorübergehend zu inhibieren. Natürlich liegt es nahe siRNA für das Ausschalten krankheitsrelevanter Gene therapeutisch einzusetzen. Der Einsatz zur Therapie von Virusinfektionen sowie Tumorerkrankungen wurden bereits in Tiermodellen erfolgreich getestet<sup>106,107</sup>, jedoch auch zur Modulation oder Regulierung einer Immunantwort kann siRNA verwendet werden. Durch das gezielte Ausschalten von Zytokinexpression in APCs, während der Aktivierungsphase (Primingphase) könnte beispielsweise der Ausgang der Immunreaktion gesteuert werden.

### 3.3.2 Beeinflussung der Immunantwort durch gezielte Antigenexpression

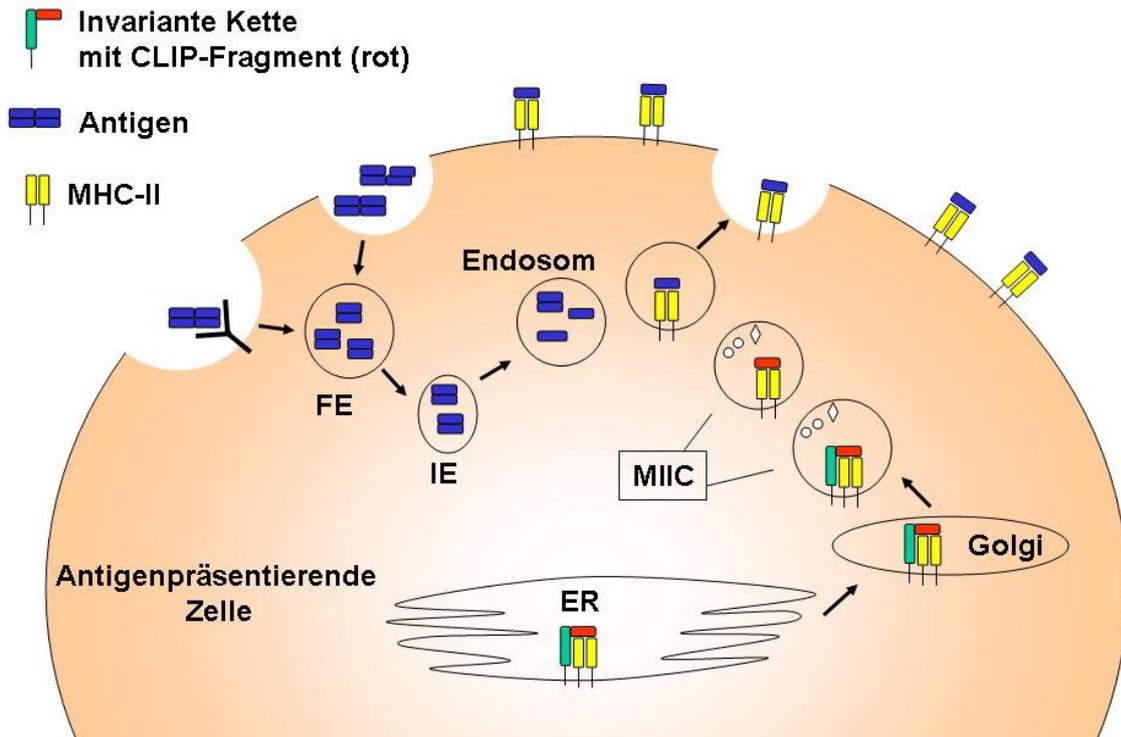
Die Art und die Stärke der Immunantwort kann durch die Lokalisation des Antigens (zytosolisch, membrangebunden, sekretiert) beeinflusst werden<sup>108-110</sup>. Demnach ist es beispielsweise möglich, die cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu verstärken, indem das Antigen mit einem Chemokin fusioniert wird, was zu einem gezielten Einschleusen in den MHC-I-Beladungsweg führt<sup>111</sup>. Überdies kann die Antigenexpression unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promoters stehen und somit nur in den Zellen erfolgen, in denen dieser aktiv ist. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Genegun Immunisierung nur in Dendritischen Zellen zur Antigenexpression kommt, wenn das Antigen unter der Kontrolle eines Fascein-Promoters<sup>112,113</sup> steht. Dies resultierte in verminderter Antikörper Produktion durch B-Zellen, da keine Antigensekretion stattfindet, sowie einer Verstärkung der Th1-Polarisierung. Alternativ erlaubte die Fusion des Antigens mit dem CD11c-Promoter eine auf DCs restringierte Expression<sup>114</sup>. Eine weitere Möglichkeit ist es, die Antigenexpression auf die Membran, und somit nur auf die transfizierte Zelle zu begrenzen. Dies geschieht z. B. durch die Fusion des Antigens an den Membranteil des Transferrinrezeptors<sup>115,116</sup>.

Verschiedene Methoden wurden veröffentlicht, wie ein Antigen direkt in den MHC-II Präsentationsweg eingeschleust werden kann<sup>109,117-119</sup>. Beispielsweise konnte dies mit einem Fusionsprotein, bestehend aus den ersten 80 Aminosäuren der Invarianten Kette (Ii80) des MHC-II-Komplexes und der verkürzten Ovalbuminsequenz (138-386aa) gezeigt werden<sup>120</sup>. Dabei wurde eine MHC-II-positive Zelllinie *in vitro* mit diesem Konstrukt transfiziert und eine verstärkte Beladung von MHC-II-Molekülen mit Antigen beobachtet. Außerdem führte dieses Konstrukt im Vergleich zu anderen, zu einer starken Th-Zellantwort nach Inkubation mit den transfizierten Zellen. In der hier präsentierten Arbeit

sollte dieses Konstrukt (Ii80-OVA) in Genegun Immunisierungen verwendet werden, um unter anderem eine effiziente Präsentation des intrazellulär vorliegenden Ovalbumins über MHC-II-Moleküle zu erreichen.

Hierbei wird die wichtige Funktion der Invarianten Kette (Ii) ausgenutzt und die Beladung der MHC-II-Molekülen mit Antigen im Endosom verstärkt. Die Ii-Kette verhindert normalerweise durch Assoziation mit dem neusynthetisierten MHC-II-Molekül die vorzeitige Bindung von Peptiden und dirigiert den Transport von MHC-II-Molekülen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einem Kompartiment mit saurem pH-Wert. In dieser chemisch sauren Umgebung wird die Ii-Kette durch Enzyme abgebaut und übrig bleibt, in der Bindungsfurche des MHC-II, nur ein kurzes Fragment, das so genannte CLIP-Fragment. Das CLIP-Fragment muss entweder dissoziieren oder verdrängt werden, um die Bindung von Peptiden zu ermöglichen, die dann an die Zelloberfläche gebracht werden. Der Austausch des CLIP-Fragments mit Peptiden wird durch ein HLA-DM Molekül beim Menschen, bzw. H-2M bei der Maus, gesteuert<sup>121,122</sup>.

Dieser Mechanismus wird bei Immunisierungen dadurch ausgenutzt, dass das immunogene Peptid das CLIP-Fragment ersetzt bzw. das Antigen anstelle des CLIP-Fragments fusioniert wird. Die Ii-Kette besitzt Signalsequenzen, durch die sie effizient in die Endosomen gelangt, wo die MHC-II-Moleküle mit Peptiden beladen werden. Durch das Fusionskonstrukt wird gleichzeitig das Peptid bzw. Antigen mit einschleust. Dadurch erfolgt eine Beladung des MHC-II mit den intrazellulär vorliegenden Peptiden effizienter und deren Präsentation auf der Oberfläche der APCs in erhöhtem Maße. Diese Strategie funktioniert sehr effektiv, um die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort zu verstärken, was bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde<sup>123-125</sup>. Der MHC-II-Beladungsweg wird in Abbildung 2 nochmals anschaulich dargestellt.



**Abb2 Der MHC-II-Präsentationsweg**

Dendritische Zellen können Antigen unter anderem über Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose aufnehmen. Endozytiertes Antigen wandert über frühe Endosomen (FE) und intermediäre Endosomen (IE) zu MHC-II beladungs-Kompartimenten (MIIC). Diese enthalten den MHC-II/II-Komplex sowie verschiedene proteolytische Enzyme (◊ ◊), die die Antigene in Peptide zerlegen, die Freisetzung des CLIP-Fragmentes und die anschließende Beladung des MHC-II katalysieren.

Die Invariante Kette heftet sich im Endoplasmatischen Reticulum (ER) an neusynthetisierte MHC-II-Moleküle an und verhindert so deren vorzeitige Bindung an intrazelluläre Peptide und partiell gefaltete Proteine im Lumen. Sie dirigiert das Ausschleusen von MHC-II-Molekülen durch den Golgi-Apparat in angesäuerte Endosomen, die Peptide enthalten. Hier wird die II-Kette schrittweise abgebaut, das MHC-II-Molekül wird mit Peptidantigenen beladen und an die Zelloberfläche transportiert.

### 3.4 Analyse der spezifischen Th-Zellantwort

Die Frequenz der antigenspezifischen naiven Th-Zellen ist verschwindend gering und macht deren Analyse nur begrenzt möglich. Nach einer Immunisierung kommt es jedoch zur klonalen Expansion der antigenspezifischen Zellen, die zu Effektorzellen differenzieren von denen ein geringer Teil als Gedächtniszelle überlebt. Um die antigenspezifische  $CD4^+$  T-Zellantwort *in vivo* hinsichtlich Proliferation und Th-Zell-

differenzierung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein von *Jenkins et.al.*<sup>126</sup> beschriebenes Zelltransfersystem benutzt. Bei dieser Methode werden naive TCR transgene T-Zellen in syngene Wildtyp (WT) Empfängertiere transferiert. Diese transgenen T-Zellen besitzen zu circa 80% einen T-Zellrezeptor des T-Zellhybridoms DO11.10, der das Peptid323-339 des Ovalbumins des Huhns (Ova) erkennt, wenn dieses von dem I-A<sup>d</sup> MHC-II-Molekül präsentiert wird. Die Identifizierung der transgenen CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgt durch Anfärben mit dem für den transgenen T-Zellrezeptor spezifischen Antikörper KJ-1.26. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass es möglich ist die antigenspezifischen Zellen zu identifizieren, bevor sie expandiert sind. Wird das Empfängertier nun mit Ova immunisiert, so kann die Ova-spezifische T-Zellantwort verfolgt und charakterisiert werden. Ein potentieller Nachteil dieser Methode ist, dass obwohl eine kleine Anzahl ( $1 \times 10^6$ ) von Th-Zellen transferiert wird, die Frequenz der nach klonaler Expansion resultierenden antigenspezifischen transgenen Th-Zellen, immer noch die der physiologischen Anzahl übersteigt. Ob diese, eher unphysiologische Frequenz monoklonaler Zellen in irgendeiner Form Auswirkungen auf die Immunantwort hat ist nicht bekannt. Man geht davon aus, dass der Transfer transgener Th-Zellen die Immunreaktionen endogener antigenspezifischer Th-Zellen ausreichend simuliert<sup>127</sup>.

Eine verbesserte Technik wurde kürzlich beschrieben, bei der die Analyse des gesamten Spektrums antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen ohne die Verwendung eines Transfersystems möglich ist. Demnach werden alle reaktiven Th-Zellen anhand der Expression des Moleküls CD40Ligand (CD40L) identifiziert<sup>128</sup>. In Anwesenheit des Ova-Proteins werden die Zellen *ex vivo* antigenspezifisch restimuliert. Die reaktiven Zellen sind demnach die antigenspezifischen Th-Zellen und exprimieren in Folge dessen CD40L<sup>129</sup>. Dieses Molekül kann mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Die Frequenz an CD40L<sup>+</sup> Zellen entspricht dabei der Anzahl antigenspezifischer T-Zellen, wobei durch den gleichzeitigen Nachweis der Zytokine die Th-Zelldifferenzierung untersucht werden kann. Somit ist es zum ersten Mal möglich, nach Immunisierung das gesamte Spektrum an Th-Zellen, die für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind, sowohl qualitativ als auch quantitativ direkt nachzuweisen und zu charakterisieren.

### 3.6 Ziele der Arbeit

In der Pathogenese einer Vielzahl von immunologischen Erkrankungen spielt die Differenzierung der T-Helferzellen in unterschiedliche Subpopulationen eine zentrale Rolle.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels DNA Immunisierung, gezielt auf die T-Helferzellendifferenzierung Einfluss zu nehmen und die Bildung von Effektorzelltypen zu fördern, die einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf haben.

Da sich in früheren Untersuchungen gezeigt hat, dass die Immunmodulation mit einer sezernierten Form des Antigens ineffizient war, sollte eine Immunisierung etabliert werden, bei der die Antigenpräsentation auf direkt transfizierte APCs beschränkt ist. Auf diese Weise soll gewährleistet werden, dass das Antigen und das immunmodulatorische Molekül gleichzeitig von allen transfizierten APCs präsentiert werden. Durch diese gezielte Expression von Antigen und immunmodulatorischem Molekül soll eine optimale Modulation der Th-Zelldifferenzierung erreicht werden.

Zunächst wird untersucht, inwiefern die Immunantwort, durch die restringierte Antigenpräsentation auf transfizierte APCs, im allgemeinen beeinflusst wird. Von besonderem Interesse ist dabei die Stärke der Th-Zellstimulation und das Zytokinprofil der antigenspezifischen T-Zellen.

Anschließend sollte getestet werden, ob durch die Restriktion der Antigenpräsentation die Effektivität einer Immunmodulation mittels DNA Immunisierung verbessert werden kann. Dabei sollte gezielt eine Th2-Antwort gefördert und gleichzeitig der Bildung von Th1-Zellen entgegengewirkt werden, da diese in der Lage sind, durch die Produktion entzündungsfördernder Zytokine, eine Autoimmunerkrankung aufrechtzuerhalten.

Die gezielte Manipulation der Th-Zelldifferenzierung sollte durch Koimmunisierung mit Zytokin kodierenden Plasmiden, wie IL-4 erfolgen, wodurch die Entwicklung einer Th2-Antwort begünstigt wird. Parallel dazu soll die Manipulation durch spezifische Inhibition der Genexpression des Th1-induzierenden Zytokins IL-12 mittels siRNA kodierenden Vektoren stattfinden.