

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Aufbau der verwendeten Antigenvektoren

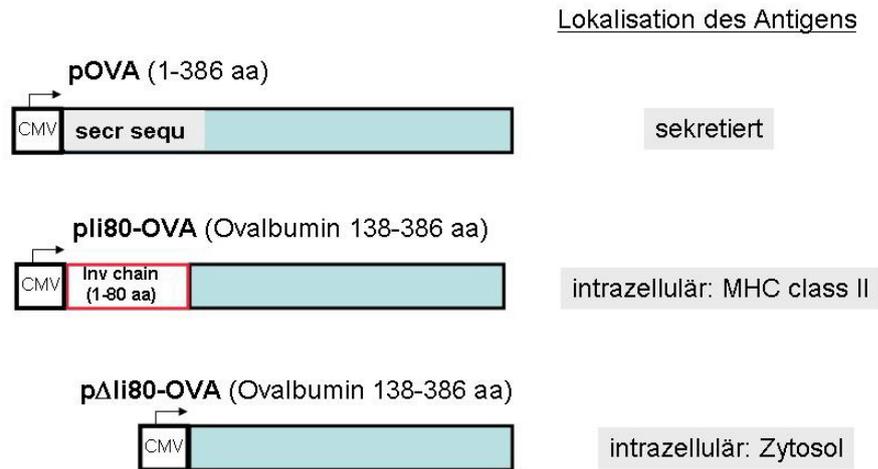
Für die DNA Immunisierung wurden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Plasmide, die das Modellantigen Ovalbumin kodieren, verwendet.

Der Vektor pOVA, kodiert für die komplette Sequenz des Ovalbumins. Dieses besitzt eine Sekretionssequenz (Aminosäuren 1-137) und wird dadurch von den transfizierten Zellen sekretiert.

Beim Vektor pli80-OVA, wurde die Sekretionssequenz entfernt, um eine Sekretion durch die transfizierten Zellen zu verhindern. Stattdessen wurden die ersten 80 Aminosäuren der Sequenz der Invarianten Kette (Ii80) eingefügt. Die Modifikation wurde vorgenommen, um das Ovalbumin gezielt in den MHC-II-Peptidbeladungsweg einzuschleusen, und dadurch eine effektive Antigenpräsentation zu gewährleisten.

Einem dritten Vektor, p $\Delta$ Ii80-OVA, fehlte sowohl die Sekretionssequenz, als auch die Ii80-Sequenz. Dadurch wird das Ovalbumin nicht sekretiert und verbleibt im Zytosol. Zytosolisch vorliegende Proteine werden normalerweise nicht über MHC-II-Moleküle präsentiert und generieren somit keine Th-Zellantwort. Dieser Vektor diente in einigen Experimenten als Kontrolle.

In Abbildung 1 sind die Antigenvektoren schematisch dargestellt, sowie die Lokalisation des Ovalbumins innerhalb der transfizierten Zelle.

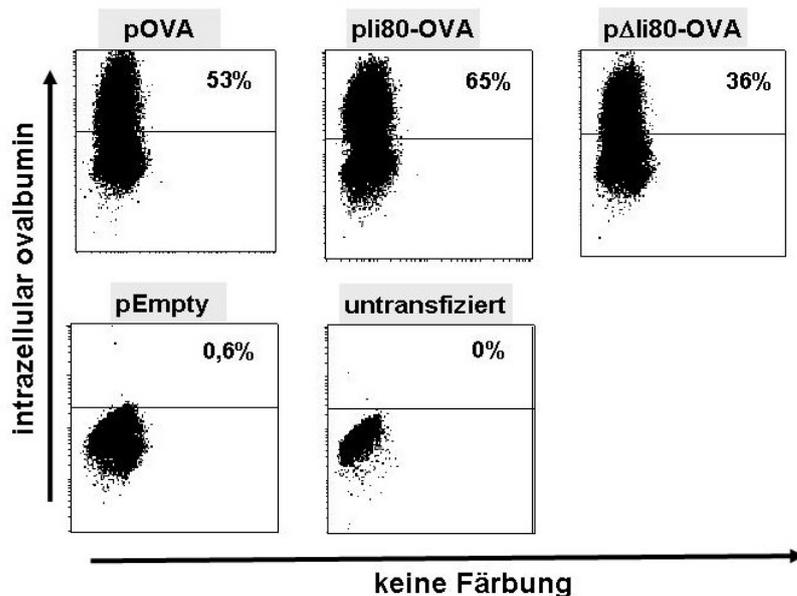


### Abb5 Aufbau der verwendeten Plasmide und der Ort ihrer Expression

Der Vektor pOVA kodiert für das vollständige Ovalbumin, das von transfizierten Zellen sekretiert wird. Der Vektor pli80-OVA besitzt keine Sekretionssequenz, dafür eine li-80-Sequenz, wodurch das Antigen nicht sekretiert wird und in den MHC-II-Peptidbeladungsweg dirigiert wird und folglich von transfizierten, MHC-II-positiven Zellen präsentiert wird. Der Vektor pΔli80-OVA besitzt weder eine Sekretionssequenz, noch die li80-Sequenz und ist somit im Zytosol lokalisiert.

#### 5.1.1 Expression des Ovalbumins *in vitro*

Zuerst einmal sollte die Expression des Ovalbumins, der drei Antigenvektoren *in vitro* überprüft werden. Dazu wurde eine Zelllinie mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und nach 6 Stunden Inkubation in Anwesenheit des Sekretionsinhibitors Brefeldin A, fixiert und intrazellulär gefärbt. Die Abbildung 2 zeigt die FACS Analyse zum Ovalbumin Nachweis und zeigt eine vergleichbare Expressionsstärke des Antigens.



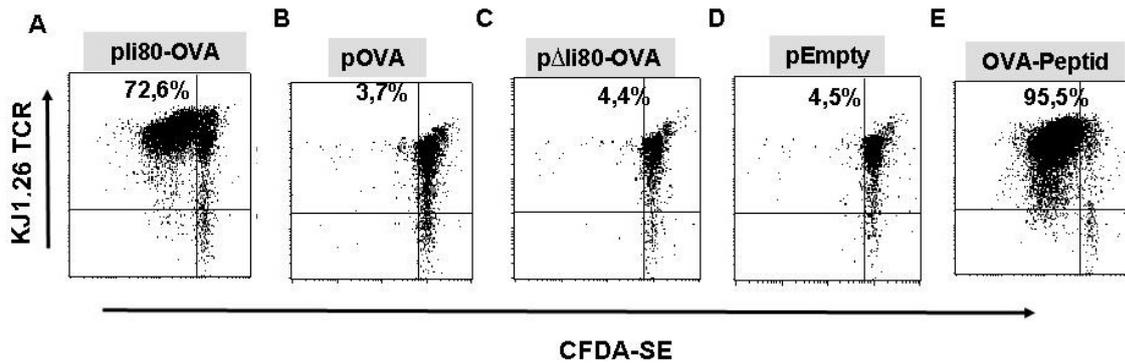
### Abb6 Ovalbuminexpression *in vitro*

Die Zelllinie 293T wurde durch Lipofektamin mit den verschiedenen Antigenvektoren transfiziert. Nach 6h Inkubation bei 37°C und in Anwesenheit des Sekretionsinhibitors Brefeldin A, wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend intrazellulär gefärbt und im Flowzytometer analysiert.

#### 5.1.2 pli80-OVA führt zur Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle *in vitro*

Zunächst musste getestet werden, ob pli80-OVA funktionell ist und eine effiziente Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle stattfindet. Die Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle kann nicht direkt angefärbt werden, sondern wurde indirekt sichtbar gemacht. Dazu wurde eine MHC-II-exprimierende B-Zelllinie (A20-Zellen) mit den verschiedenen Antigenvektoren transfiziert. Die transfizierten A20-Zellen wurden anschließend mit naiven TCR-transgenen Th-Zellen aus DO11.10 Mäusen für 3 Tage inkubiert. Diese Th-Zellen sind transgen für den  $\alpha/\beta$ -TCR, der das Peptid 323-339 des Ovalbumins erkennt, wenn es von dem I-A<sup>d</sup> Klasse-II-MHC-Molekül präsentiert wird. Dieser transgene TCR kann mit dem monoklonalen Antikörper KJ1.26 nachgewiesen werden. In Folge der antigenspezifischen Erkennung proliferieren die Th-Zellen.

Um die Proliferation der antigenspezifischen Th-Lymphozyten sichtbar zu machen, wurden die Th-Zellen zuvor mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFDA-SE markiert, der bei jeder Zellteilung an Intensität abnimmt und somit die Proliferation als Bandenmuster sichtbar wird.



### Abb7 Proliferation TCR-transgener Th-Zellen nach Antigenpräsentation *in vitro*

Die B-Zelllinie A20 wurde mit verschiedenen Antigenvektoren mittels Elektroporation transfiziert und anschließend zusammen mit naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zuvor mit CFDA-SE markiert um die Proliferation im FACS sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper KJ1.26 gefärbt, um die antigenspezifischen Zellen sichtbar zu machen.

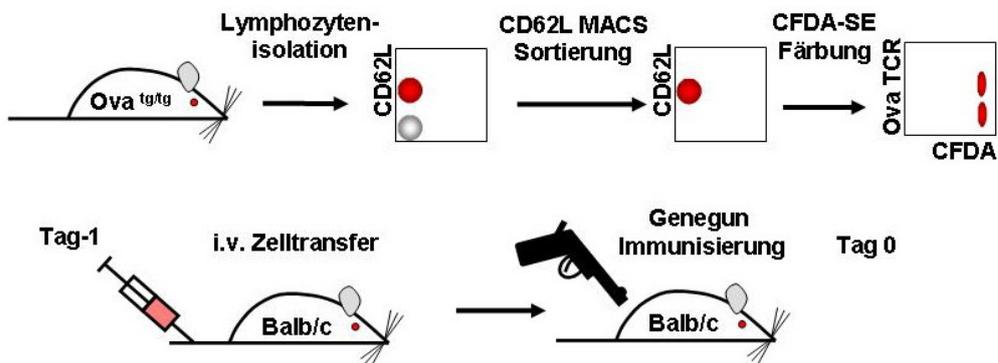
Eine Proliferation (72,6%) der Th-Zellen ist nur mit pli80-OVA transfizierten B-Zellen zu beobachten. Es wird deutlich, dass die Proliferation antigenspezifisch ist, da ausschließlich die TCR-transgenen Th-Zellen proliferieren (Abb7A). Das Ovalbumin wird offensichtlich auf Grund der li-Sequenz effektiv über MHC-II-Moleküle präsentiert. Im Vergleich findet keine Proliferation der Th-Zellen mit pOVA transfizierten B-Zellen statt (Abb7B). Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, dass die extrazelluläre Konzentration des sekretierten Ovalbumins zu gering ist, um von den B-Zellen in hinreichender Menge aufgenommen und präsentiert zu werden. Auch eine Transfektion mit pΔli80-OVA führt zu keiner Proliferation, da das Antigen weder in den MHC-II-Beladungsweg gelangt, noch sekretiert wird und somit nicht über MHC-II-Moleküle präsentiert werden kann. Wie erwartet erzeugt die Transfektion mit pEmpty keine Proliferation. Die Beladung der MHC-II-Moleküle mit Ova-Peptid von außen diente als positiv Kontrolle und erzeugt die maximale Proliferation.

Somit wurde gezeigt, dass das Fusionskonstrukt, bestehend aus der li80-Sequenz und der verkürzten Ovalbumin-Sequenz, gezielt in den MHC-II-Prozessierungsweg eingeschleust wird und von den transfizierten B-Zellen *in vitro* präsentiert wird.

### 5.1.3 Analyse der antigenspezifischen Th Zellantwort *in vivo*

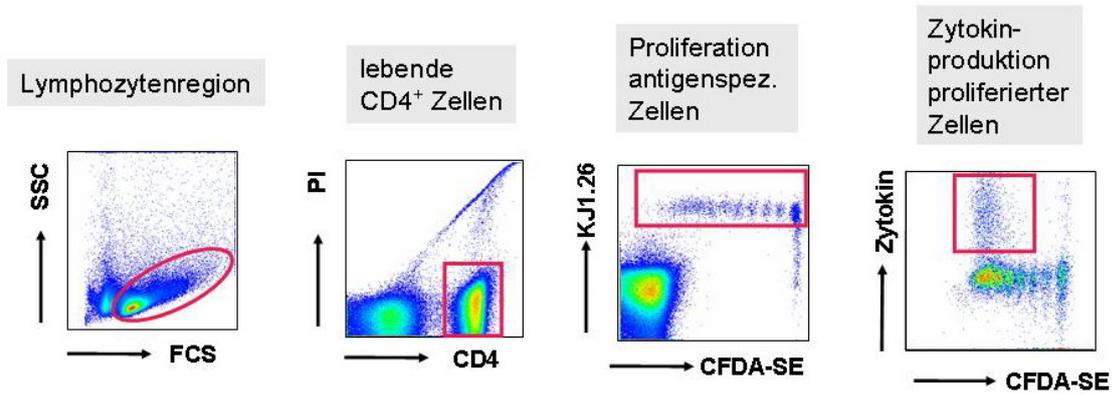
#### 5.1.3.1 Analyse antigenspezifischer Zellen mit Hilfe des Transfersystems

Um die antigenspezifische Th-Zellantwort *in vivo* zu untersuchen, wurde ein von *Jenkins et. al.*<sup>126</sup> beschriebenes Zelltransfersystem in veränderter Form benutzt (Abb8).



**Abb8 Versuchsaufbau des Zelltransfers und Genegun Immunisierung**

Dafür wurden Th-Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) TCR-transgener Mäuse isoliert. Anschließend erfolgt eine Zellsortierung mittels magnetischer CD62L-Beads. Der Marker CD62L ist auf naiven Th-Zellen sehr stark exprimiert. Diese Sortierung ist notwendig, um zu gewährleisten, dass keine Th-Zellen transferiert werden, die bereits zu Effektorzellen differenziert sind und ein Zytokingedächtnis erworben haben. Die naiv sortierte Zellpopulation wird danach mit CFDA-SE gefärbt und anschließend intravenös (i.v.) in Empfängertiere transferiert. Es wurden stets ca.  $1-2 \cdot 10^6$  transgene Th-Zellen pro Empfängertier injiziert. Die Donor- und Empfängermäuse hatten denselben genetischen Hintergrund wodurch eine Abstoßungsreaktion vermieden wurde<sup>127,138</sup>. Mit Hilfe dieser Transfermethode konnte die Anzahl der spezifischen Th-Zellen auf etwa 0,1-0,2% der gesamten Th-Zellpopulation erhöht werden, gleichzeitig wurde die Reisolation und Analyse auf Einzelzellebene ermöglicht.



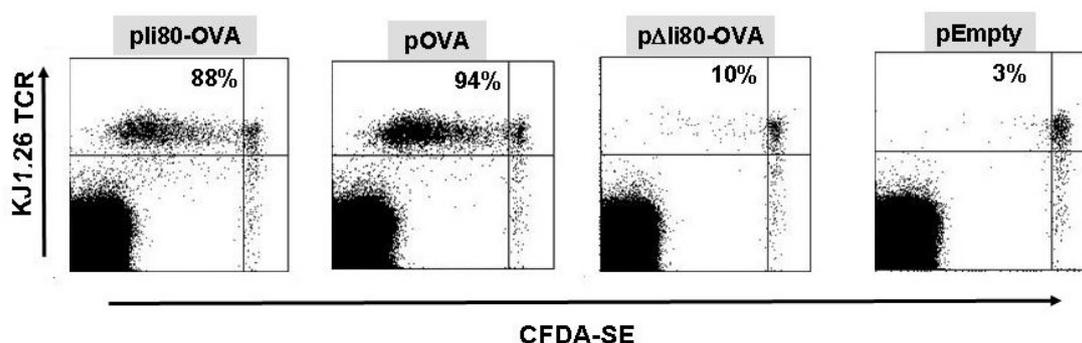
**Abb9 Analysestrategie nach Reisolation der transferierten Zellen**

Die Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Analyse eines Transferexperiments nach Immunisierung und verdeutlicht die Vorteile der CFDA-SE Färbung. Im ersten Analysefenster ist die gesamte Zellpopulation dargestellt und eine Region um die Lymphozytenpopulation gesetzt. Mit dieser Region werden bereits Zelltrümmer und Zellen mit starker Granularität, wie z. B. Granulozyten, ausgeschlossen. Im zweiten Analysefenster sind die Lymphozyten nach dem Oberflächenmarker CD4 und der Substanz PI aufgetragen. Die PI positiven Zellen erscheinen als Diagonale und stellen die toten Zellen dar, die somit aus der Analyse ausgeschlossen werden. Im dritten Analysefenster wird CFDA-SE gegen die TCR-transgenen Zellen aufgetragen. Anhand der CFDA-SE Färbung kann die Proliferation der transferierten, antigenspezifischen Th-Zellen analysiert werden. Mit jeder Zellteilung nimmt die Fluoreszenzintensität ab und es entsteht ein Bandenmuster, das die Anzahl der vollzogenen Zellteilungen wiedergibt. Die spezifischen Zellen, die sich mehrmals geteilt haben und deren CFDA-SE Färbung abnimmt, sind im letzten Analysefenster gegen die Zytokine angezeigt. Hier wird ersichtlich, dass die Th-Zellen erst nach mehrfachen Teilungen die Fähigkeit erwerben Effektorzytokine zu produzieren.

Durch das beschriebene Transfersystem und die CFDA-SE Färbung kann die spezifische Th-Zellantwort auf eine Immunisierung sehr detailliert und auf Einzelzellebene untersucht werden. Die CFDA-SE Färbung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen proliferierten und nicht proliferierten Zellen.

### 5.1.3.2 pli80-OVA und pOVA führen zu Proliferation *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das li-Ovalbumin *in vitro* in den MHC-II-Beladungsweg gelangt und effektiv spezifische Th-Zellen stimulieren konnte, sollte dieser Vektor nun *in vivo* auf Funktionalität getestet werden. Dazu wurde das oben beschriebene Transfersystem angewandt. Die Rezipientenmäuse wurden einen Tag nach dem Transfer mit der Genegun immunisiert (siehe Material & Methoden). Die drainierenden Lymphknoten wurden 4 Tage nach der Immunisierung entnommen und die Zellsuspension analysiert.



**Abb10 Analyse der Proliferation nach Genegun Immunisierung mit verschiedenen Antigenvektoren**

Balb/c-WT-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene naive Th-Zellen aus DO11.10 Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pOVA, pli80-OVA, pEmpty oder pΔli80-OVA immunisiert und 4 Tage später die drainierenden Lymphknoten zur Analyse entnommen. Direkt nach Reisolation wurden die Zellen auf Proliferation analysiert. %Proliferation bezieht sich auf die  $CD4^+$  KJ1.26<sup>+</sup> Zellen.

Die Rezipientenmäuse wurden mit vier verschiedenen Vektoren immunisiert. In Abbildung 10 ist die Proliferation der spezifischen Th-Zellen gezeigt. Die Prozentzahlen beziehen sich nur auf die TCR-transgenen Th-Zellen. Die Immunisierung mit pli80-OVA führt zu einer Proliferation von 88% der spezifischen Zellen. Das ist vergleichbar mit der Proliferation von 94% nach pOVA Immunisierung. Dies zeigte, dass die Aktivierung der transferierten Th-Zellen nach Immunisierung mit den beiden Antigenvektoren vergleichbar stark war.

Weiterhin kommt es nach Immunisierung mit pΔli80-OVA nur zu einer vergleichbar geringen Proliferation von 10%, was darauf hindeutet, dass das zytosolisch vorliegende Antigen nicht über MHC-II-Moleküle präsentiert wird. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass

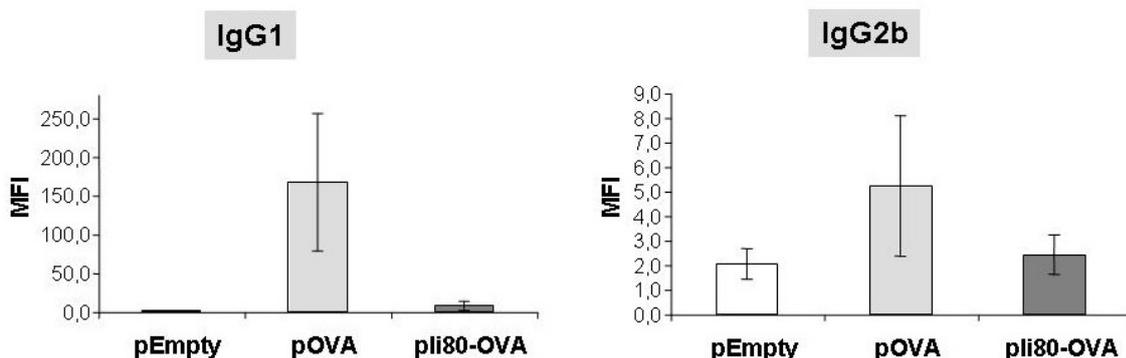
freigesetztes Antigen aus abgestorbenen, transfizierten Zellen keine Rolle spielt und bei der Auswertung der Ergebnisse vernachlässigbar ist.

Wie zu erwarten war, führt die Immunisierung mit dem Leervektor pEmpty zu keiner Proliferation (3%) der spezifischen Th-Zellen.

### 5.1.3.3 Die Antikörperproduktion ist abhängig von der Lokalisation des Ovalbumins

Das nach pOVA Immunisierung von den transfizierten Zellen sekretierte Ovalbumin, liegt als lösliches Antigen vor und ist somit für B-Zellen zugänglich. Es kann folglich von antigenspezifischen B-Zellen erkannt und aufgenommen werden. Die B-Zellen prozessieren das Antigen und präsentieren es über MHC-II-Moleküle den Th-Zellen. Durch die Interaktion zwischen B-Zellen und Th-Zellen werden die B-Zellen aktiviert und differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Bei einer intrazellulären Lokalisation des Antigens, wie es nach pli80-OVA der Fall ist, sollte somit keine B-Zellaktivierung und Antikörperproduktion stattfinden.

Um dies zu testen, wurden Balb/c Mäuse mit 6 Schuss pro Maus drei Mal im Abstand von einer Woche immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen, um Serum zu gewinnen. Die Ovalbumin spezifischen Antikörper im Serum der Tiere wurden mit einem abgewandelten CBA ELISA (BD Bioscience) detektiert.



### Abb11 Detektion der Antikörperklassen nach Genegun Immunisierung

Balb/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit 6 Schuss der Vektoren pEmpty, pOVA oder pli80-OVA immunisiert. 2 Wochen später wurde den Tieren Blut abgenommen um Serum zu gewinnen. Die antigenspezifischen Antikörper wurden mittels eines modifizierten CBA-ELISAs ermittelt.

Nach der Immunisierung mit pOVA waren antigenspezifische Antikörper der Klassen IgG1 und IgG2b im Serum der Mäuse detektierbar (Abb7). Im Vergleich dazu wurden keine Antikörper nach Immunisierung mit pli80-OVA und wie erwartet auch nicht mit pEmpty detektiert.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass das Antigen nach der Immunisierung mit pli80-OVA intrazellulär vorliegt, wo es für B-Zellen unzugänglich ist. Im Gegensatz dazu kann lösliches Ovalbumin von den B-Zellen erkannt und aufgenommen werden und führt mit Hilfe der Th-Zellen zur Aktivierung und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen.

### **5.2 Modulation der Immunantwort mittels DNA Koimmunisierung**

Nachdem in den vorangegangenen Teilen der Arbeit die Funktionalität des Antigenvektors pli80-OVA *in vitro* und *in vivo* getestet wurden, stand nun die gezielte Modulation der Th-Zellantwort im Vordergrund. Zu diesem Zweck sollte die DNA Immunisierung neben dem Antigenvektor mit einem weiteren Vektor durchgeführt werden, der ein potentiell immunmodulatorisches Zytokin exprimiert.

Ziel der Koimmunisierung war es, Th1-Polarisierung zu minimieren, da Th1-Zellen ursächlich mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen in Verbindung gebracht werden. Gleichzeitig sollte die Th2-Zellentwicklung gefördert werden, da sich Th2-Zellen positiv in Autoimmunprozessen auswirken. Ein Kandidat, um das Th1/Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2 zu verschieben ist das Zytokin IL-4, da es als eines der potentesten Th2-Differenzierung induzierendes Zytokin bekannt ist. Die Koimmunisierung mit pOVA und pIL-4 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und führte wieder Erwartung zu einer verstärkten Th1-Antwort. Diese Beobachtung wurde darauf zurückgeführt, dass IL-4 z. B. DCs dazu veranlassen kann IL-12 zu produzieren<sup>139</sup>. IL-4 wird bereits in der Haut exprimiert, wirkt dort auf die DCs und induziert die IL-12 Produktion. Die DCs nehmen das, von den transfizierten Zellen sekretierte Ovalbumin aus der Umgebung auf nach pOVA Immunisierung. Somit sind die Mehrzahl der Ova-präsentierenden DCs gleichzeitig IL-12 Produzenten und induzieren dadurch eine Th1-Antwort. Nur die direkt transfizierten DCs produzieren das koimmunisierte IL-4. Das bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Th-Zellaktivierung im

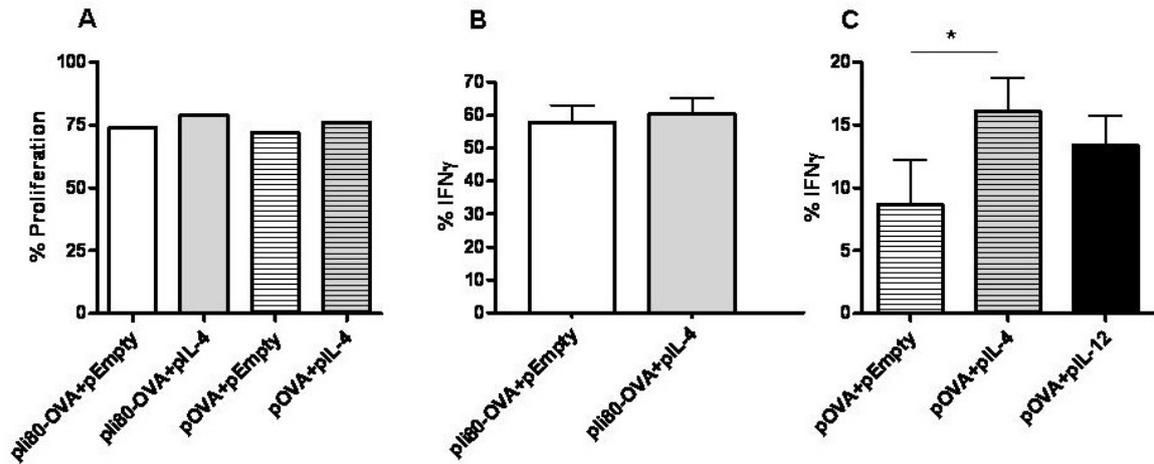
Lymphknoten die Ova-präsentierenden IL-12 produzierenden DCs überwiegen, im Vergleich zu den direkt transfizierten IL-4 produzierenden DCs. Das war der Grund dafür, die Koimmunisierung mit dem modifizierten pli80-OVA durchzuführen, weil die Antigenpräsentation auf die direkt transfizierten APCs beschränkt bleibt. Da man von einer Kotransfektion mit beiden Plasmiden ausgehen kann, sollte von allen APCs, die das Antigen präsentieren, gleichzeitig auch IL-4 exprimiert werden.

Der Th2-fördernde Effekt des IL-4 sollte also mit pli80-OVA verstärkt werden, da die Antigenpräsentation und Zytokinexpression gleichzeitig von derselben APC ausgehen.

### **5.2.1 IL-4 Koimmunisierung mit pli80-OVA hat keinen Effekt auf die Th-Polarisierung**

Im Folgenden wird die Koimmunisierung mit dem pli80-OVA und pIL-4, im Vergleich zu pOVA durchgeführt und untersucht, welchen Einfluss diese auf die Th-Zellpolarisierung hat. Beispielsweise liegt eine Th1-Polarisierung vor, wenn  $\text{IFN}\gamma$  verstärkt produziert wird. Im Gegensatz dazu sind  $\text{IFN}\gamma$ -produzierende Zellen kaum nachweisbar, wenn eine Th2-Polarisierung gegeben ist.

Zunächst wurden TCR-transgene, naive Th-Zellen in WT Tiere transferiert und vier Tage nach der Genegun Immunisierung aus dem Lymphknoten reisoliert. Ein Teil dieser Zellen wurde für die Analyse der Proliferation verwendet und der restliche Teil wurde restimuliert, um das *in vivo* erworbenes Zytokinprofil abzurufen. Die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion wurde daraufhin intrazellulär analysiert.



### Abb12 Proliferationsstärke und IFN $\gamma$ Produktion der proliferierten Th-Zellen nach Koimmunisierung mit pIL-4

Balb/c-WT-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene naive Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA oder pOVA in Kombination mit pIL-4 bzw. pEmpty immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. %Proliferation bezieht sich auf CD4<sup>+</sup> KJ1.26<sup>+</sup> Zellen. %Zytokin bezieht sich auf die Zytokin positiven Zellen innerhalb der proliferierten Zellen (vergl. Abb5). Signifikanz: t-Test: \* p<0,05

Die Abbildung 12A zeigt die Proliferation nach der Koimmunisierung mit pIL-4 und den jeweiligen Antigenvektoren. Dargestellt ist der Prozentsatz der proliferierten, TCR-transgenen Th-Zellen. Die Proliferation hat in allen Immunisierungsgruppen in gleichem Maße stattgefunden, somit kann davon ausgegangen werden, dass das pIL-4 keinen Einfluss auf die Expansionsstärke hat.

Die Abbildungen 12B und 12C zeigen die IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen nach der IL-4 Koimmunisierung mit pli80-OVA (12B) und pOVA (12C).

Nach Koimmunisierung mit pli80-OVA/pIL-4 (12B), konnte, im Vergleich zur Kontrollgruppe pEmpty/pIL-4, kein Effekt auf die Polarisierung der Th-Zellen beobachtet werden, der auf die Wirkung von IL-4 zurückzuführen wäre.

In der Abbildung 12C ist zu erkennen, dass die Koimmunisierung mit pOVA/pIL-4, im Vergleich zum Leervektor, zu einer verstärkten IFN $\gamma$  Produktion führte und folglich zu einer Th1-Polarisierung. Dies geschah auch nach Koimmunisierung mit pIL-12, welches

als Th1-Indikator mitgeführt wurde, da IL-12 das zentrale Th1-induzierende Zytokin ist. Hiermit konnten die vorherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden.

Der Vergleich der Antigenvektoren untereinander, zeigt jedoch eine generelle Th1-Induktion, sowohl mit, als auch ohne pIL-4 zu beobachten, die durch eine starke Erhöhung (ca. 3fach) von IFN $\gamma$  gekennzeichnet ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz einer vergleichbaren Proliferation der Th-Zellen in allen Immunisierungsgruppen, der Effekt der verschiedenen Antigenvektoren bezüglich der Differenzierung der Th-Zellen stark unterschiedlich sein kann. Die Koimmunisierung mit dem modifizierten Antigenvektor pli80-OVA zeigte somit keine Verbesserung des Effekts des IL-4 bei der Koimmunisierung. Der erwünschte Th2-fördernde Effekt blieb aus.

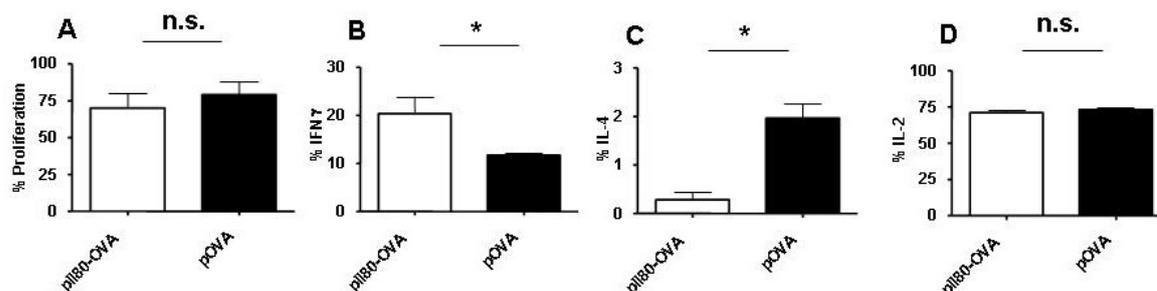
Somit konnte keine Optimierung der Koimmunisierung, durch die Verwendung von pli80-OVA, erreicht werden. Vielmehr haben wir eine generelle Th1-Verschiebung mit pli80-OVA beobachtet.

Neben der Koimmunisierung mit pIL-4, ergaben auch andere Koimmunisierungen, z. B. mit den Notch-Liganden Jagged-1 und Delta-4, die nicht in dieser Arbeit dargestellt sind, eine Th1-Verschiebung in Kombination mit pli80-OVA. Aufgrund dessen und mit der Absicht eine Th2-Antwort zu induzieren, erschien es daher sinnvoll zuerst einmal die Mechanismen, die zu der verstärkten Th1-Antwort führen aufzuklären.

### **5.3 Analyse und Charakterisierung der Th1-Polarisierung nach Immunisierung mit dem li-Fusionskonstrukt**

#### **5.3.1 Genegun Immunisierung mit pli80-OVA induziert starke Th1 Polarisation**

Eine genaue Analyse des Zytokinprofils nach pli80-OVA und pOVA Immunisierung zeigt den Th1-induzierenden Effekt anhand der beiden zentralen Th1- und Th2-definierenden Zytokine IFN $\gamma$  und IL-4 deutlich (Abb13).



### Abb13 Zytokinprofil nach Genegun Immunisierung mit beiden Vektoren im Vergleich

Balb/c-WT-Mäusen erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene naive Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA oder pOVA immunisiert. 4 Tage später wurden die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. (vergl. Abb4). t-Test: \*  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Wie bereits in Abbildung 10 gezeigt wurde, führten beide Immunisierungen zu einer vergleichbaren Proliferation der transferierten naiven  $CD4^+$  T-Zellen. Die Analysefenster in Abbildung 13 zeigen das Zytokinprofil nach der Immunisierung mit pOVA bzw. mit pli80-OVA.

Wie aus Abbildung 13B/13C ersichtlich, produzierten die proliferierten Zellen nach Immunisierung mit pOVA 13%  $IFN\gamma$  und 5% IL-4, wohingegen 28%  $IFN\gamma$  und nur 0,6% IL-4 Produzenten nach pli80-OVA Immunisierung zu beobachten waren. Dies bedeutet eine 2fach stärkere  $IFN\gamma$  Produktion und eine fast vollständige Inhibition des IL-4 der expandierten Zellen mit pli80-OVA. Diese Zytokinwerte zeigen eine Th1-Verschiebung.

Die IL-2 Produktion unter den proliferierten Zellen betrug ca. 80% nach Immunisierung mit beiden Antigenvektoren, was auf eine vergleichbar starke Aktivierung der Th-Zellen hindeutete.

Das Zytokinprofil beider Immunisierungen verdeutlicht die verstärkte Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Applikation, die durch eine 2fache  $IFN\gamma$  Produktion und eine Inhibition der IL-4 Produktion gekennzeichnet ist.

Für eine solche Th1-Antwort können verschiedene Ursachen in Frage kommen. Im Folgenden werden unterschiedliche Ansätze, zur Ursachenklärung der verstärkten Th1-Polarisierung, genauer untersucht.

### **5.3.2 Untersuchung der Rolle von CpG Motiven bei der Th1-Polarisierung**

APCs können durch unterschiedliche immunogene Stimuli dazu angeregt werden das proinflammatorische Zytokin IL-12 zu produzieren, das wiederum auf die Th-Zellen wirkt und die Produktion von IFN $\gamma$  hervorruft. Als ein solcher Stimulus sind z. B. CpG-Motive bekannt<sup>85</sup>. Diese CpG-Motive liegen in bakterieller DNA unmethyliert vor und werden in dieser Form von dem Toll-Like-Rezeptor9 (TLR9) erkannt. Zur Induktion der IL-12 Produktion wird eine Signalübertragung über TLR9 und das Adaptermolekül MyD88 ausgelöst. Da die zur Immunisierung verwendeten Plasmide in Bakterien vermehrt wurden enthalten sie unmethylierte CpG-Motive.

Bei der pOVA Immunisierung haben die APCs das Ovalbumin aus der Umgebung aufgenommen, um es zu präsentieren. Der Unterschied zur pli80-OVA Immunisierung ist, dass hier alle präsentierenden APCs direkt mit dem Plasmid transfiziert wurden und dadurch auch alle APCs CpG-Signale erhalten. Somit könnte die DNA bzw. die darin enthaltenen CpG-Motive eine Ursache für die starke IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen nach pli80-OVA sein. Wenn das Adaptermolekül MyD88 fehlt, findet keine CpG/TLR9-Signalweiterleitung statt.

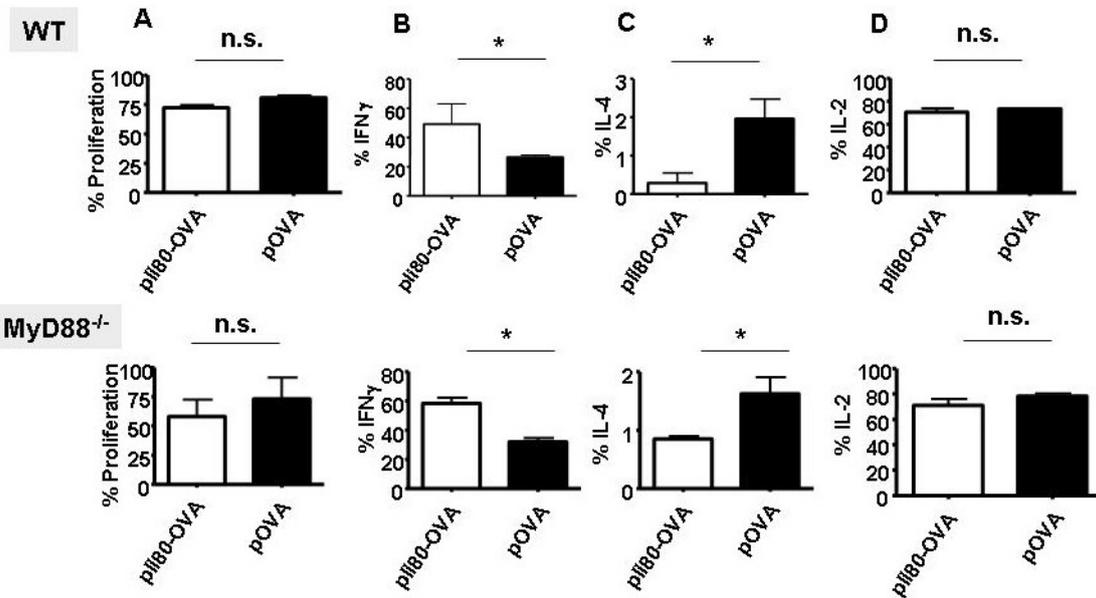
Ob dieser Mechanismus eine Ursache der Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung ist sollte im nächsten Experiment, durch die Immunisierung von MyD88-knockout (MyD88<sup>-/-</sup>) Tieren untersucht werden.

#### **5.3.2.1 Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung ist nicht auf einen Signalweg über MyD88 zurückzuführen**

Das Adaptermolekül MyD88 ist essenziell für die Weiterleitung von TLR9-Signalen. CpG-Motive, die vom TLR9 erkannt werden, können somit in MyD88<sup>-/-</sup> Tieren keine Signaltransduktion induzieren.

Aus diesem Grund sollte die Th-Zelldifferenzierung zwischen MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse und WT-Mäusen miteinander verglichen werden. Beiden Mausstämmen wurden TCR-transgene Th-Zellen transferiert.

Einen Tag nach Transfer wurden die Tiere entweder mit pli80-OVA oder pOVA immunisiert. Die antigenspezifische Th-Zellantwort wurde wiederum auf Proliferation und Zytokinproduktion analysiert und mit denen der WT-Mäuse verglichen.



**Abb14 Proliferation und Zytokinprofil nach Immunisierung von MyD88<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren**

MyD88<sup>-/-</sup> bzw WT-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene naive Th-Zellen aus OTII-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA oder pOVA immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. % Proliferation bezieht sich auf CD4<sup>+</sup> KJ1.26<sup>+</sup> Zellen. % Zytokin bezieht sich auf die Zytokin positiven Zellen innerhalb der proliferierten Zellen (vergl. Abb5). t-Test: \*  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Die Proliferation (Abb14A), sowie die IL-2 (Abb14D) Produktion der expandierten Zellen, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Immunisierung mit pli80-OVA und pOVA, sowie auch zwischen den beiden Mausstämmen selbst, was auf eine vergleichbar starke Aktivierung der Th-Zellen nach der Immunisierung hindeutet. Deutlich wird auch, dass die MyD88-Defizienz keinen Einfluss auf Proliferation und IL-2 Produktion der transferierten Th-Zellen hat.

Anhand der Zytokinexpression von IFN $\gamma$  (Abb14B) und IL-4 (Abb14C) konnte eine Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung festgestellt werden. Das Zytokinprofil zeigt,

in beiden Mausstämmen eine 2fache Erhöhung der IFN $\gamma$  Produktion nach pli80-OVA Applikation, im Vergleich zu pOVA. Die Th1-Verschiebung macht sich auch in beiden Mausstämmen in der IL-4 Expression bemerkbar, wonach pOVA Immunisierung rund 2% und nach pli80-OVA rund 0.2% der expandierten Zellen IL-4 produzieren. Somit ist kein Einfluss durch die MyD88-Defizienz erkennbar.

Auf Grund dieser Beobachtungen können wir sagen, dass die Aktivierung der transferierten Th-Zellen in gleichem Maße vonstatten geht und, dass CpG-Motive bzw. eine MyD88-Defizienz keinen Einfluss auf die Th-Differenzierung haben. Als Ursachen für die verstärkte Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung können CpG-Motive daher ausgeschlossen werden.

### **5.3.3 Untersuchung der Rolle von B-Zellen bei der Th1 Polarisierung**

Wie bereits unter Punkt 5.1.3.3 gezeigt wurde, konnten wir nach pli80-OVA Immunisierung keine antigenspezifischen Antikörper detektieren, schon aber nach pOVA Immunisierung. Somit kommt es offensichtlich nur nach pOVA Immunisierung durch die Aufnahme löslichen Antigens zur B-Zellaktivierung. Somit können B-Zellen das aufgenommene Antigen spezifischen Th-Zellen über MHC-II-Moleküle präsentieren und als APCs fungieren und bei der Aktivierung von Th-Zellen beteiligt sein.

Auf Grund dessen, wollten wir untersuchen, wie wichtig B-Zellen als APCs in unserem System sind bzw. welchen Einfluss eine fehlende Antigenpräsentation über B-Zellen auf die Th-Zelldifferenzierung bei einer pli80-OVA Immunisierung hat.

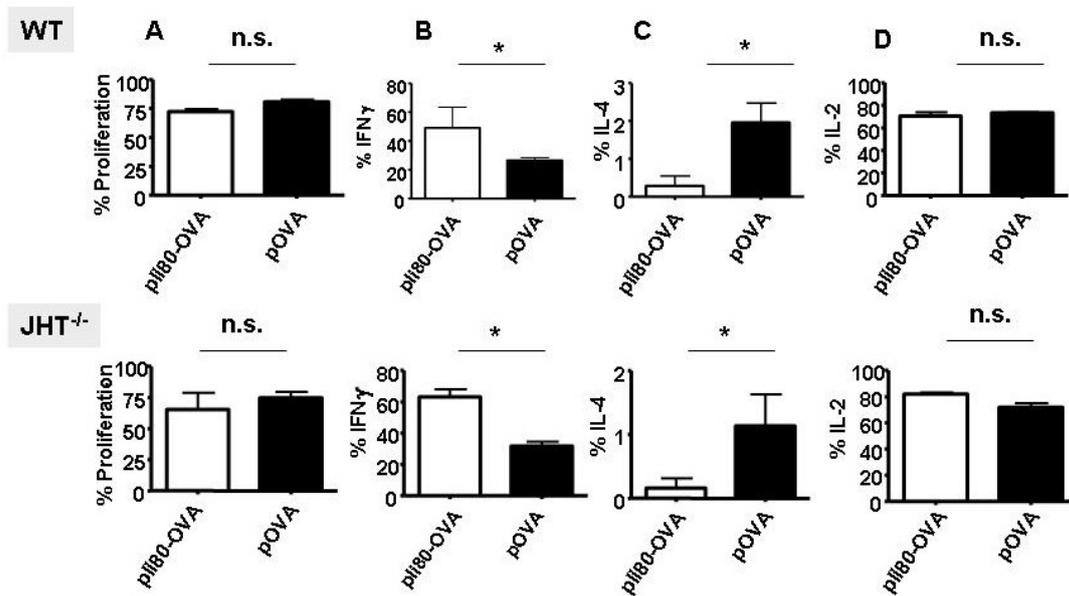
#### **5.3.3.1 B-Zellen als APCs haben keinen Einfluss auf Th-Zellaktivierung und -differenzierung nach Genegun Immunisierung**

Um zu testen, inwiefern das Fehlen der B-Zellaktivierung zur verstärkten Th1-Polarisierung beiträgt, sollten B-Zell-knockout (JHT<sup>-/-</sup>) Mäuse mit beiden Antigenvektoren immunisiert werden.

In JHT<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die B-Zelldifferenzierung im Knochenmark blockiert<sup>136</sup>. Der Zusammenbau der J<sub>H</sub>-Gensegmente während der Rearrangierung der Immunglobulingene

kann nicht stattfinden, da den Mäusen diese Segmente fehlen. Dadurch ist die B-Zellentwicklung in einem frühen Stadium blockiert. Die  $JHT^{-/-}$ -Mäuse besitzen somit keine B-Zellen.

Im Folgenden sollte die Th-Zelldifferenzierung zwischen  $JHT^{-/-}$ -Mäuse und WT-Mäusen miteinander verglichen werden. Beiden Mausstämmen wurden TCR-transgene Th-Zellen transferiert. Einen Tag später wurden sie entweder mit pli80-OVA oder pOVA immunisiert. Die antigenspezifische Th-Zellantwort wurde wiederum auf Proliferation und Zytokinproduktion analysiert und mit denen der WT-Mäuse verglichen.



**Abb15 Proliferation und Zytokinprofil nach Immunisierung von  $JHT^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu WT-Tieren**

Wildtyp-Tiere bzw.  $JHT^{-/-}$ -Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgenen naiven Th-Zellen aus OTII-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA oder pOVA immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. % Proliferation bezieht sich auf  $CD4^+ KJ1.26^+$  Zellen. % Zytokin bezieht sich auf die Zytokin positiven Zellen innerhalb der proliferierten Zellen (vergl. Abb5). t-Test: \*  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Nach der Immunisierung mit pli80-OVA und pOVA, zeigten sich in beiden Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation (Abb15A) sowie in der IL-2 Produktion (Abb15D) der expandierten Zellen. Dies deutete auf eine vergleichbar starke

Aktivierung der Th-Zellen nach der Immunisierung hin. Weiterhin zeigte dies, dass eine B-Zelldefizienz keinen Einfluss auf die Proliferation und IL-2 Produktion der transferierten Th-Zellen in unserem System hat.

Deutlichere Unterschiede zwischen beiden Antigenvektoren zeigten sich jedoch in der Expression von IFN $\gamma$  (Abb15B) und IL-4 (Abb15C). Somit beobachteten wir nach pli80-OVA Immunisierung eine 2fach erhöhte IFN $\gamma$  Produktion der proliferierten Zellen in beiden Mausstämmen. Des weiteren war die IL-4 Produktion in beiden Mausstämmen nach pli80-OVA fast vollständig inhibiert. Im Vergleich dazu, betrug die IL-4 Produktion 1-2% nach der pOVA Immunisierung.

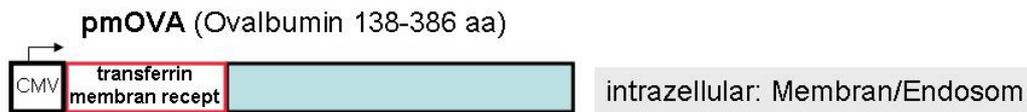
Somit beobachteten wir wiederum eine Th1 Verschiebung mit dem pli80-OVA Vektor, die sich in beiden Mausstämmen gleichermaßen zeigte.

Den Ergebnissen dieses Experiments zu Folge, konnten wir, auch ohne B-Zellbeteiligung in beiden Mausstämmen, eine vergleichbare Aktivierung der transferierten Th-Zellen beobachten, sowie eine Th1-Induktion mit pli80-OVA. Demnach können wir sagen, dass die B-Zellen in unserem System als APCs keine Rolle spielen und nicht als Ursache für die beobachtete Verstärkung der Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung ausgeschlossen werden können.

### **5.3.4 Ist die Antigenpräsentation ausschließlich durch direkt transfizierte DCs verantwortlich für die Th1-Polarisierung?**

Nachdem wir in der Vektor-DNA enthaltene CpG-Motive und eine fehlende B-Zellaktivierung als Ursache der verstärkten Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung ausschließen konnten, sollte untersucht werden, ob der Th1-induzierende Effekt auf die direkt transfizierten APCs selbst zurückzuführen ist. Es wäre möglich, dass die direkt transfizierten APCs (wie mit pli80-OVA), im Gegensatz zu den APCs, die das Ovalbumin aufgenommen haben (wie mit pOVA), in verstärktem Maße durch die Transfektion selbst, aktiviert wurden. Die verstärkte Aktivierung der APCs könnte einen Einfluß auf die Th-Zelldifferenzierung haben. Um dies herauszufinden, wurde ein dritter Antigenvektor für die Immunisierung benutzt (Abb16).

Lokalisation des Antigens

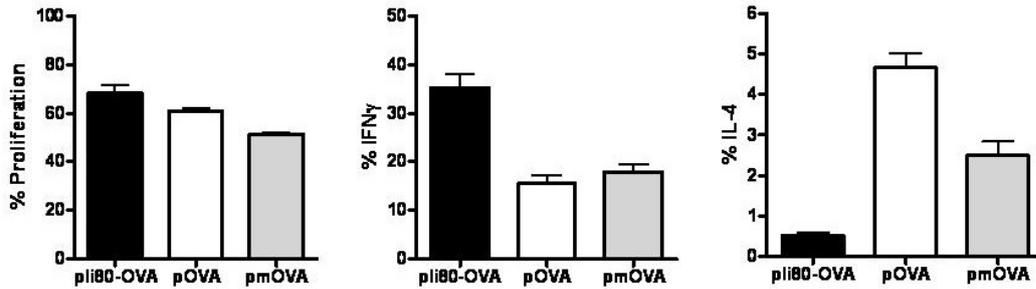


**Abb16 Antigenkonstrukt des Fusionsantigens membran-OVA (pmOVA)**

Der Vektor pmOVA besitzt keine Sekretionssequenz, dafür eine Sequenz des Transferrin-Membranrezeptors, wodurch das Antigen zuerst in der Zellmembran exprimiert wird und anschließend zu Endosomen transportiert, in diesen zu Peptidfragmenten abgebaut und auf MHC-II-Moleküle geladen wird. Das Antigen wird somit nur intrazellulär exprimiert.

Der Vektor pmOVA (Abb16) kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus einer Sequenz des Transferrinmembran Rezeptors und dem verkürzten Ovalbumin ohne die Sekretionssequenz. Das Ovalbumin wird zuerst in die Zellmembran inseriert und anschließend zum Endosomen Kompartiment transportiert, wo es degradiert wird und anschließend auf MHC-II-Moleküle geladen wird. Analog zum pli80-OVA findet keine Sekretion des Antigens statt und die Antigenpräsentation beschränkt sich nur auf transfizierte Zellen.

Im nachfolgenden Experiment wurde der Einfluss der Immunisierung mit den verschiedenen Antigenvektoren *in vivo* miteinander verglichen. Dazu wurden WT-Mäusen TCR-transgene Th-Zellen transferiert. Anschließend immunisierten wir die Tiere mit den verschiedenen Antigenvektoren, pOVA, pli80-OVA bzw. pmOVA. Die Proliferation und die Zytokinproduktion der spezifischen Th-Zellen wurden untersucht.



### Abb17 Proliferation und Zytokinprofil nach Immunisierung mit verschiedenen Antigenvektoren

Balb/c-WT-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgenen naiven Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA, pOVA oder pmOVA immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. % Proliferation bezieht sich auf CD4+ KJ1.26+ Zellen. % Zytokin bezieht sich auf die Zytokin positiven Zellen innerhalb der proliferierten Zellen (vergl. Abb5). t-Test: \*  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Die Abbildung 17A zeigt die Frequenzen der proliferierten Zellen. Demnach ist die Proliferation nach pOVA und pli80-OVA Immunisierung vergleichbar, im Vergleich dazu jedoch nach pmOVA Immunisierung geringfügig vermindert.

Das Zytokinprofil nach pmOVA ist vergleichbar mit dem nach pOVA Immunisierung. Demzufolge liegt die IFN $\gamma$  Produktion (Abb17B) auf vergleichbarem Niveau mit pOVA, die des pli80-OVA ist im Vergleich dazu circa 2fach erhöht. Die IL-4 Produktion (Abb17C) ist nach pli80-OVA Immunisierung fast völlig inhibiert. Im Vergleich dazu, fanden wir nach pOVA Immunisierung circa 5% IL-4 Produzenten und mit pmOVA circa 2,5%. Die pmOVA Immunisierung führte nicht zur verstärkten Th1-Polarisierung.

Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass die Antigenpräsentation über ausschließlich direkt transfizierte APCs keine Verstärkung der Th1-Polarisierung hervorruft. Die verminderte Proliferation mit pmOVA könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Mechanismus, durch den es zur Antigenpräsentation kommt nicht mit dem von pli80-OVA vergleichbar ist.

### **5.3.5 Nachweis und Untersuchung der Ova-Peptid präsentierenden Zellen**

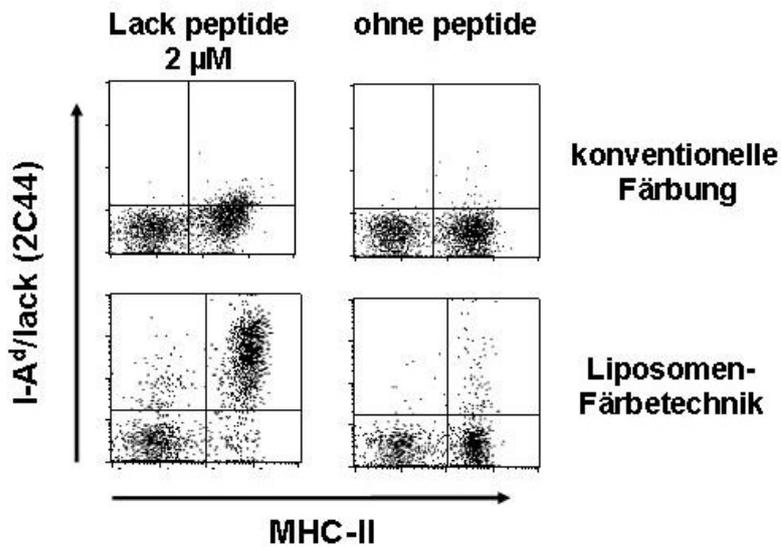
Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit zur Ursachenfindung der Th1-Polarisierung mit pli80-OVA waren eher indirekt. Da die Aktivierung der Th-Zellen von den APCs ausgeht, sollten diese Zellen direkt untersucht werden. Dazu sollten im nächsten Experiment die Ova-Peptid präsentierenden Zellen durch Detektion der MHC-II/Peptid-Komplexe direkt nachgewiesen werden. Das Ziel war es zum einen die Frequenz der präsentierenden APCs zu bestimmen, sowie die Dichte der MHC-II/Peptid-Komplexe zu quantifizieren. Andererseits sollte der Aktivierungszustand der Peptid-präsentierenden Zellen untersucht werden und die Expression kostimulatorischer Moleküle, sowie der Zytokine analysiert werden. Möglicherweise könnten hierbei auftretende Unterschiede Hinweise auf die Ursachen für die verstärkte Th1-Antwort nach pli80-OVA Immunisierung geben.

#### **5.3.5.1 Detektion der Antigenpräsentation mittels Liposomenfärbung**

Um die antigenpräsentierenden APCs sichtbar zu machen, haben wir einen Antikörper (2C44) benutzt, der spezifisch für I-A<sup>d</sup>/Lack-Komplexe ist, das heißt, der spezifisch die MHC-II/Lack-Peptid-Komplexe erkennt. Für die Genegun Immunisierung wurden die Vektoren pli80-OVA und pOVA so verändert, dass das Lack-Peptid jeweils mit dem Ovalbumin exprimiert wird. So entstanden die Vektoren pOVA-Lack und pli80-OVA-Lack, die in diesem Versuch für die Genegun Immunisierungen verwendet wurden.

Als Nachweismethode wurde die Liposomen-Färbetechnik angewandt (Material & Methoden Abb 4). Dazu wurde ein digoxiginiertes 2C44-Antikörper zur Markierung der Peptid/MHC-II-Komplexe eingesetzt. Als Sekundärfärbereagenz ein an die Liposomen gekoppelter anti-Dig Antikörper benutzt.

Die Liposomenfärbung ist eine Methode, mit der die Färbung von Antigenen verstärkt werden kann. Deshalb ist diese Methode geeignet für die Färbung von schwach exprimierten Antigenen. Der verstärkende Effekt der Liposomenfärbung wird in Abb14 deutlich.

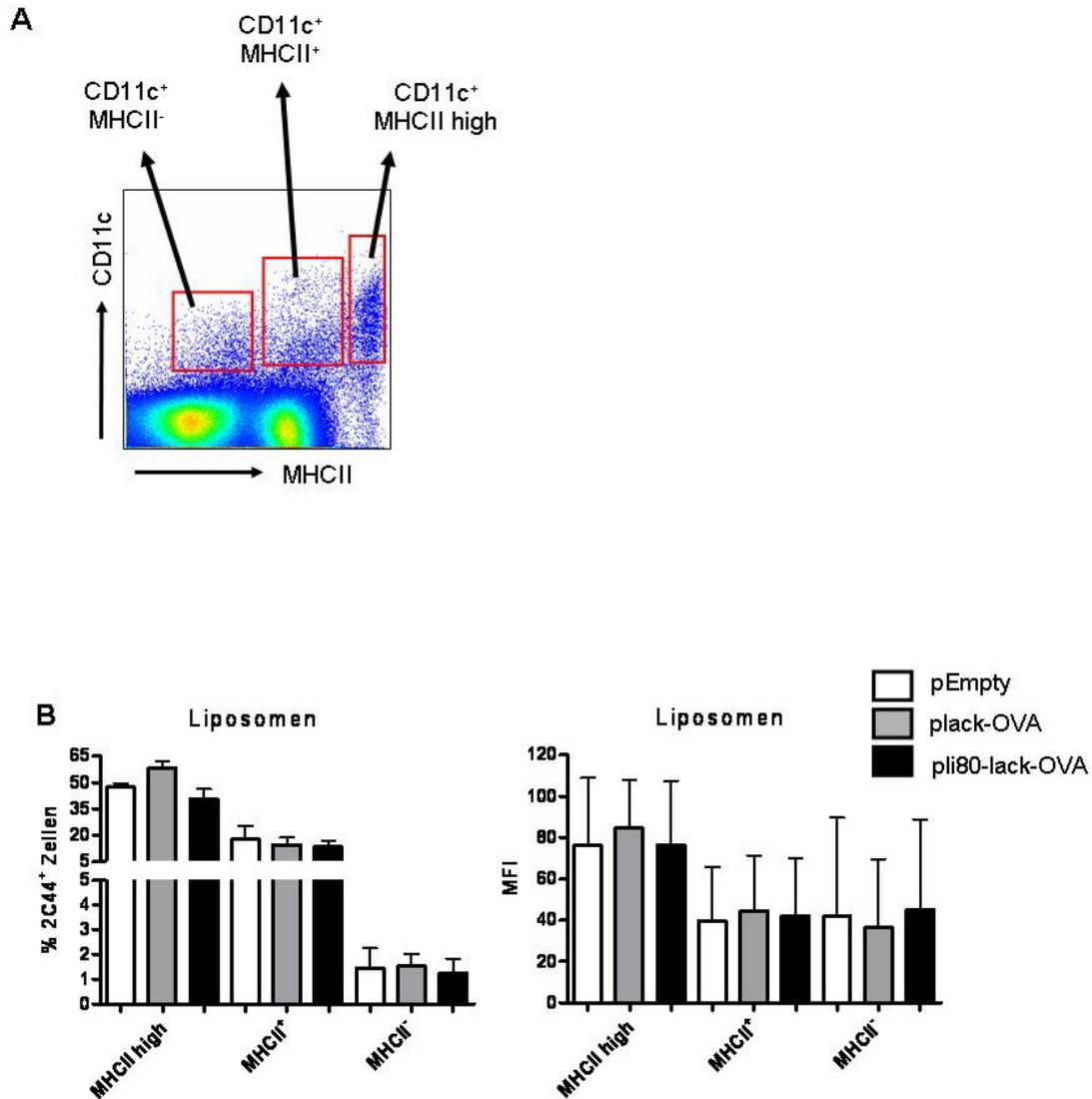


### Abb18 Gegenüberstellung einer konventionellen Färbung und der Liposomenfärbung

Die MHC-II-Moleküle der B-Zelllinie A20 wurden von außen mit Lack-Peptiden beladen, zur Kontrolle wurden unbeladene Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen entweder konventionell mit dem monoklonalen 2C44-Antikörper angefärbt, oder mit demselben, an Liposomen gekoppelten Antikörper, angefärbt. Die Zellen wurden daraufhin im Flowzytometer analysiert.

Die Abbildung 18 macht deutlich, dass die MHC-II/Peptid-Komplexe auf den B-Zellen sehr schwach exprimiert sind und mit einer konventionellen Färbung nur schwach positiv erscheinen. Unter Verwendung der Liposomenfärbung jedoch werden die schwach positiven Zellen stärker angefärbt und können dadurch eindeutig als positiv identifiziert werden.

Um eine genügende Anzahl von Zellen für die Analyse zu erhalten, wurden die Tiere mit jeweils 6 Schuss immunisiert. Durch den mehrmaligen Beschuss erhöht sich die Zellzahl der direkt transfizierten DCs im drainierenden Lymphknoten, wie von *Porgador et. al.*<sup>62</sup> gezeigt wurde. Für die Analyse wurden die drainierenden Lymphknoten aus zwei Tieren vereint. Ungefähr 18 Stunden nach Immunisierung wurden die Lymphknoten isoliert und eine Zellsuspension hergestellt. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung der oben beschriebenen Liposomen gefärbt und im FACS analysiert.



### Abb19 Liposomenfärbung zum Nachweis der Antigenpräsentation

A Darstellung der Analysestrategie der einzelnen DC Populationen. Die Peptid-präsentierende DC-Population sollte unter den CD11c<sup>+</sup>MHCII-high Zellen zu finden sein. B Balb/c Mäuse wurden mit 6 Schuss von pEmpty, pOVA oder pli80-OVA immunisiert. 18h später wurden die DCs aus den drainierenden Lymphknoten isoliert und für die Analyse im FACS gefärbt. Pro Gruppe wurden 6 Tiere verwendet. Dargestellt ist die Frequenz der 2C44<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD11c<sup>+</sup>MHCII-high Zellen (links), sowie die Mean Fluoreszenz Intensität (MFI) (rechts).

Aus Abbildung 19A wird die Analysestrategie ersichtlich, die zur Detektion der antigenpräsentierenden DCs verwendet wurde. DCs wurden anhand des Oberflächenmoleküls CD11c identifiziert. Die CD11c-positiven Zellen exprimieren das MHC-II-Molekül in verschiedenen starken Ausprägungen und werden daher in DC-MHCII-

DC-MHCII<sup>+</sup> oder DC-MHCII-high eingeteilt. Die direkt transfizierten DCs aus der Haut sind innerhalb der CD11c<sup>+</sup>/MHCII-high Population zu finden.

Die Balkendiagramme in Abbildung 19B zeigen die Frequenz der 2C44-positiven Zellen innerhalb der CD11c<sup>+</sup>MHC-II-high-Population (links), sowie deren Mean-Fluoreszenz-Intensität (MFI) (rechts), wodurch die Expressionsstärke des MHC-II/Peptid-Komplexes erkennbar sein sollte. Aus beiden Balkendiagrammen der Abb14B wird ersichtlich, dass sowohl innerhalb der DC-MHCII-high Population als auch in den anderen DC-Populationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Vektoren zu beobachten sind. Das bedeutet, wir konnten keine Lack-Peptid präsentierenden DCs unter der DC-MHCII-high Population detektieren und demzufolge auch keine Unterschiede in der Expressionsstärke dieser Komplexe.

Zudem beträgt aber die Frequenz der 2C44-positiven Zellen innerhalb der MHCII-high-Population in allen Immunisierungsgruppen circa 50%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Färbung mit den Liposomen einen starken Background verursacht, in dem Fall 50%. Dadurch erscheinen eigentlich negative Zellen positiv. Somit könnte es sein, dass eine geringe Anzahl positiver Zellen nicht mehr detektiert werden kann und sozusagen im Background untergeht.

Leider war es nicht möglich die Peptid-präsentierenden DCs durch die Liposomen-Färbetechnik nachzuweisen. Es bleibt die Frage weiter offen, ob sich die DCs nach der Immunisierung mit den verschiedenen Antigenvektoren in ihrem Phänotyp unterscheiden, und ob eventuelle Unterschiede die Ursache für die verstärkte Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung sind.

## **5.4 Untersuchung der CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen nach Genegun Immunisierung**

### **5.4.1 Identifikation und Untersuchung endogener, antigenspezifischer CD4-Lymphozyten mit Hilfe des Markers CD154 (CD40 Ligand)**

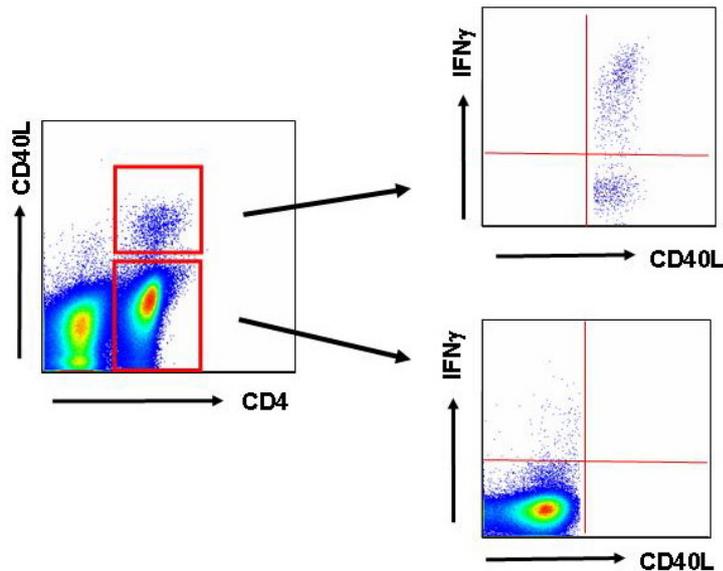
Der Transfer antigenspezifischer Th-Zellen, stellt insofern einen Vorteil dar, als dass diese Methode die Untersuchung der Th-Zelldifferenzierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt

nach der Immunisierung erlaubt und die antigenspezifischen T-Zellen auf Einzelzellebene untersucht werden können. Ein möglicher Nachteil könnte jedoch die hohe Zahl an transferierten Th-Zellen sein, die fast alle einen transgenen TCR mit derselben Spezifität tragen, und nur ein bestimmtes Peptid des Antigen erkannt wird. Dies entspricht nicht der physiologischen Situation während einer Immunantwort und ist so im Körper normalerweise nicht zu finden.

Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit <sup>128</sup> beschreibt erstmals eine Methode, zur Identifikation aller reaktiven, antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung. Dabei werden die Zellen, nach antigenspezifischer Restimulation *ex vivo*, anhand ihrer CD154 Expression identifiziert. Auf diese Weise können die antigenspezifischen Gedächtniszellen angefärbt, und phänotypisch analysiert werden. Somit war es erstmals möglich alle endogenen, antigenspezifischen Th-Zellen, nach DNA Immunisierung zu analysieren, ohne zu Hilfenahme des Transfersystems.

### **5.4.3.1 Beschränkte Antigenpräsentation induziert CD154 exprimierende Gedächtniszellen**

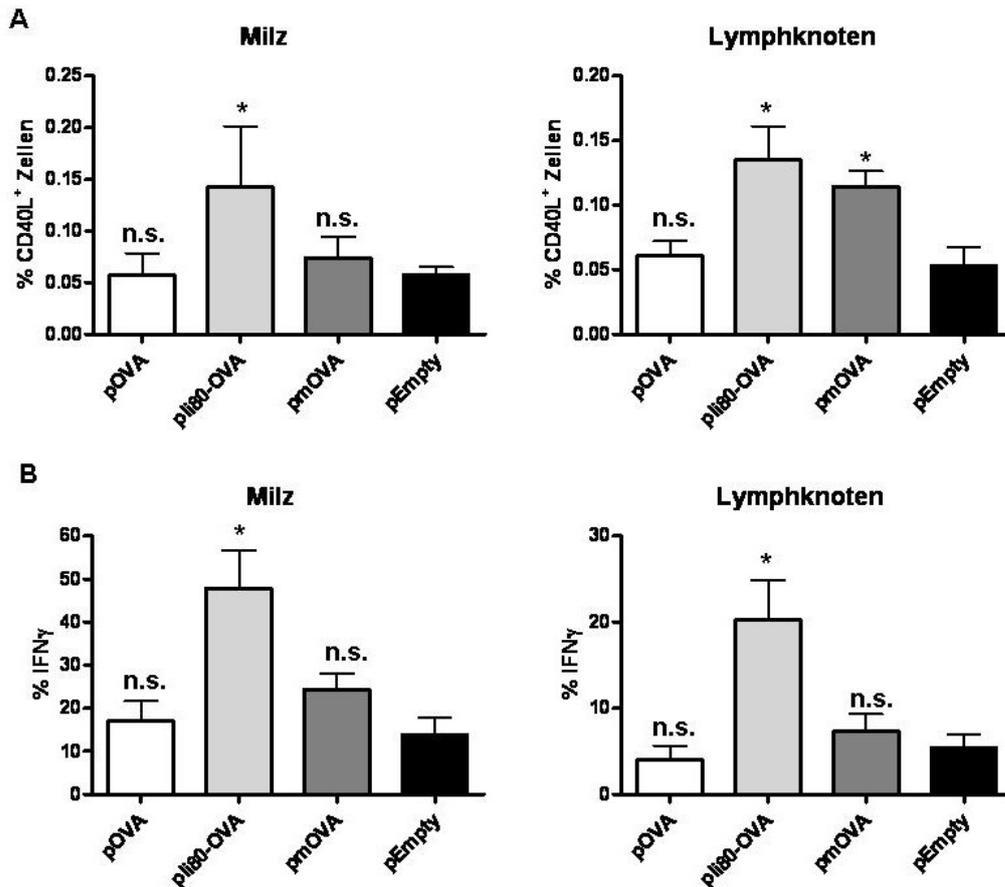
Das Ziel dieses Experimentes war es, die physiologische Immunantwort nach Genegun Immunisierung mit den verschiedenen Antigenvektoren pli80-OVA, pOVA und pmOVA zu untersuchen. Demzufolge sollte die Frequenz der Gedächtniszellen untersucht werden und gleichzeitig die IFN $\gamma$  Produktion der reaktiven Zellen. Dazu wurden Balb/c Mäuse mit den verschiedenen Antigenvektoren immunisiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor mitgeführt.



### Abb 20 Analysestrategie der CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen

Balb/c-WT-Tiere wurden mit verschiedenen Antigenvektoren dreimal im Abstand von einer Woche immunisiert. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden in Anwesenheit von antiCD28 Antikörper und 1mg/ml Ovalbumin ÜN restimuliert. Der Sekretionsinhibitor Brefeldin A wurde zur Akkumulation der Zytokine hinzugesetzt. Danach wurden die Zellen mit FA fixiert, gefärbt und im FACS analysiert.

Aus Abbildung 20 ist die Analysestrategie ersichtlich. Zuerst wurde der prozentuale Anteil der gesamten CD40L<sup>+</sup>-Population innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen ermittelt und dann in einem neuen Analysefenster gegen IFN $\gamma$  angezeigt, um die Frequenz der Zytokinproduzenten innerhalb der CD40L<sup>+</sup>-Zellen zu ermitteln (oben). In einem dritten Analysefenster sind die CD40L<sup>-</sup>-Zellen gegen IFN $\gamma$  angezeigt (unten), woraus deutlich wird, dass diese Zellpopulation nicht reaktiv ist und keine Zytokine produziert.



**Abb21 Analyse der CD154<sup>+</sup> (CD40L<sup>+</sup>) Population und des Zytokinprofils nach Immunisierung**

Balb/c-WT-Mäuse wurden analog zur Beschreibung in Abb20 behandelt. A Die Frequenzen der CD40L<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Population sind als Balkendiagramme dargestellt. B Die Frequenzen der IFN $\gamma$  Produzenten innerhalb der CD40L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen sind als Balkendiagramme dargestellt. Pro Gruppe wurden 6 Tiere verwendet. Signifikanz: t-Test: \*<0,05 bzw. n.s.=nicht signifikanz bezogen auf pEmpty

In den Balkendiagrammen der Abbildung 21A ist der prozentuale Anteil CD40L<sup>+</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und im Lymphknoten dargestellt. Im Vergleich zum Leervektor fanden wir keine antigenspezifischen Zellen nach pOVA Immunisierung in beiden Organen. Im Vergleich dazu ist nach pli80-OVA Immunisierung eine mehr als 2fache Erhöhung der spezifischen Gedächtniszellen in beiden Organen zu detektieren. Die Frequenz der spezifischen Gedächtniszellen nach pmOVA Immunisierung ist, im Vergleich zu pli80-OVA geringfügig vermindert im Lymphknoten, jedoch nicht in der Milz zu detektieren.

In den Balkendiagrammen der Abbildung 21B ist die Frequenz der IFN $\gamma$  Produzenten unter den CD40L<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und im Lymphknoten dargestellt. Eine signifikant erhöhte Frequenz der IFN $\gamma$  Produzenten von circa 20-30% innerhalb der spezifischen

Gedächtniszellen ist nur nach pli80-OVA Immunisierung in beiden Organen zu beobachten. Jedoch ist die Frequenz der IFN $\gamma$  Produzenten mit pmOVA, nur in der Milz geringfügig (5%) erhöht.

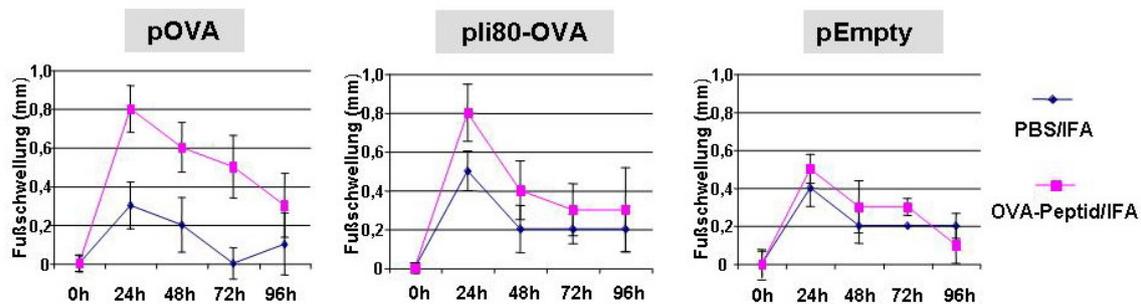
Anhand dieser Ergebnisse können wir sagen, dass durch eine gezielte Antigenpräsentation auf direkt transfizierte DCs (pli80-OVA und pmOVA) die Bildung von CD4<sup>+</sup>-Gedächtniszellen gefördert wird. Wobei dies in verstärktem Maße durch die pli80-OVA Immunisierung geschieht. Zudem finden wir auch im physiologischen System mit pli80-OVA eine verstärkte IFN $\gamma$  Produktion in den antigenspezifischen Gedächtniszellen.

### **5.5 Die DTH-Reaktion als Krankheitsmodell einer Th1-vermittelten Entzündungsreaktion**

Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler entzündlicher Erkrankungen. Als Modell für eine solche Th1-vermittelte Entzündungsreaktion wird die DTH-Reaktion (*delayed-type-hypersensitivity reaction*) durchgeführt. Die DTH-Reaktion gehört zu den Überempfindlichkeitsreaktionen des verzögerten Typs, die erst nach mehreren Stunden bis Tagen auftreten können. Es entsteht eine lokale Entzündungsreaktion, die vor allem von spezifischen CD4-T-Zellen vom Th1-Typ ausgelöst wird, die in der Peripherie vorhanden sind und an die Stelle der Antigenpräsentation einwandern. Dort schütten sie nun Chemokine und Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  aus, wodurch die lokale Durchlässigkeit der Blutgefäße erhöht wird und es zur Einwanderung von u. a. Granulozyten kommt. Diese Reaktion bewirkt weiterhin eine lokale Schwellung des Gewebes. Die auftretende Schwellung gilt als Maß für die Stärke der Entzündungsreaktion. Dieser Test wird im Mausmodell durch Injektion des Antigens in Kombination eines Adjuvanz, entweder ins Ohr oder in die Fußsohle, durchgeführt.

### 5.5.1 Untersuchung der Th1-Reaktion nach pli80-OVA Immunisierung anhand der Fußsohlenschwellung

Ziel war es zu untersuchen, wie stark die Th1-Zellen, die durch die Genegun Immunisierung induziert wurden, in der Lage sind, eine Entzündungsreaktion zu vermitteln. Wildtyp Balb/c Mäuse wurden mit den Vektoren pli80-OVA, pOVA oder pEmpty immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen jeweils in eine Fußsohle der Hinterbeine Inkomplettes Freudsches Adjuvanz (IFA) gemischt mit Ova-Peptid bzw. in die andere Fußsohle IFA gemischt mit PBS als "interne Kontrolle" injiziert. Nun wurde die Fußschwellung, alle 24 Stunden über mehrere Tage gemessen. Als Ausgangswert wurde die Dicke der Füße vor der Injektion gemessen.



**Abb22 DTH-Reaktion Messung der Fußsohlenschwellung über die Zeit**

Balb/c-WT-Tiere wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit pEmpty, pOVA bzw. pli80-OVA immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde die DTH-Reaktion in der Fußsohle ausgelöst, indem rechts Ova-Peptid in IFA und links als Kontrolle PBS in IFA injiziert wurden. Die Fußsohlenschwellung wurde alle 24h über mehrere Tage gemessen.

Aus Abbildung 22 wird ersichtlich, dass die Fußsohlenschwellung 24h nach der Injektion am stärksten ist, dies ist besonders nach pli80-OVA (0,8mm) und pOVA (0,8mm), im Vergleich zum Leervektor (0,5mm) deutlich. Wobei der Fuß, in den Peptid/IFA injiziert wurde, stärker anschwellt, als der Kontrollfuß. Nach 48 Stunden war die Schwellung in allen drei Gruppen im PBS/IFA-Fuß fast auf den Ausgangswert zurückgegangen, eine Restschwellung von 0,2mm blieb erhalten. Der Unterschied zwischen Peptid/IFA-Fuß und PBS/IFA-Fuß nach pli80-OVA Immunisierung weist keinen signifikanten Unterschied auf (0,1-0,2mm Unterschied), das zeigt sich in gleichem Maße für die pEmpty Immunisierung. Im Gegensatz dazu nimmt die Schwellung nach 48 Stunden im Peptid/IFA-Fuß nach

pOVA Immunisierung zwar leicht ab (um 0,2mm), aber bleibt über mehrere Tage erhalten und nimmt nur sehr langsam weiter ab. Nach pOVA Immunisierung ist der Unterschied (0,4-0,5mm Unterschied) zwischen Peptid/IFA-Fuß zum PBS/IFA-Fuß somit über längere Zeit (3 Tage) sehr stark, was auf eine anhaltende Entzündungsreaktion hindeutet.

Da wir eine starke Th1-Polarisierung nach Immunisierung mit pli80-OVA beobachtet haben, würden wir eine starke DTH-Reaktion erwarten. Entgegen dieser Erwartung, war die Schwellung nach pli80-OVA Immunisierung nach 48 Stunden bereits fast auf Ausgangsniveau zurückgegangen und zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollfuß. Im Gegensatz dazu, zeigte sich nur nach Immunisierung mit pOVA eine anhaltende lokale Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch eine ungleich langsamer abnehmende Schwellung. Die Ergebnisse dieses Experiments geben erste Hinweise, in welchem Maße die Entzündungsreaktion durch die aktivierten Th-Zellen nach der Genegun Immunisierung vermittelt werden kann.

Die DTH-Reaktion konnte jedoch nicht wiederholt werden, da die Induktion der Fußsohlenschwellung durch die Injektion von Ova-Peptid/IFA ausblieb. Dies äußerte sich in einer sehr geringen Fußsohlenschwellung in allen Immunisierungsgruppen nach 24 Stunden von 0,2-0,4mm. Das bedeutet, dass gar keine Entzündungsreaktion ausgelöst wurde und dadurch keine Aussage möglich war.

### **5.6 Koimmunisierung mit siRNAs gegen die Untereinheiten des IL-12**

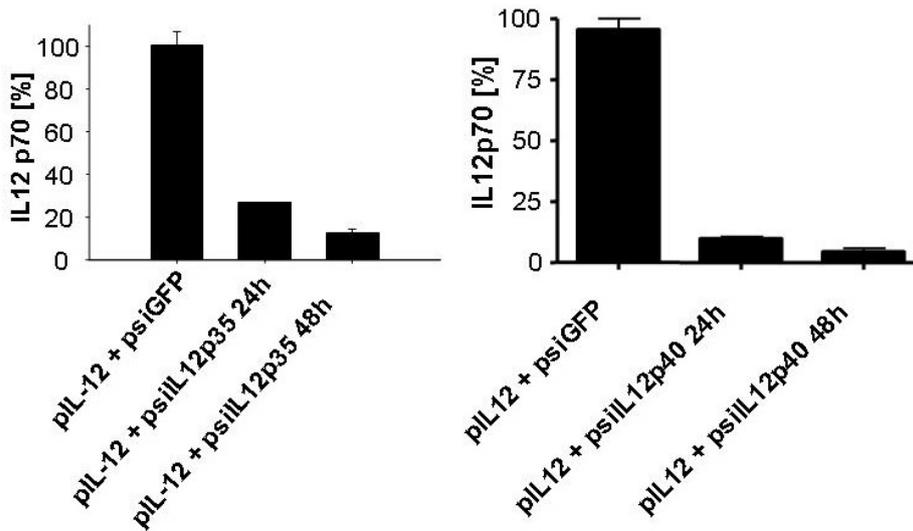
APCs werden durch immunogene Stimuli aktiviert und dazu angeregt das proinflammatorische Zytokin IL-12 zu produzieren, welches wiederum auf Th-Zellen wirkt und die Produktion von IFN $\gamma$  induziert. Teilweise ist man der Ansicht, dass es zu einer Ausbildung von Th2-Zellen kommen kann, wenn IL-12 fehlt oder nur in geringer Menge produziert wird. Deshalb ist IL-12 ein besonders geeignetes Zielmolekül, um APCs zu modulieren und dadurch die Th-Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Eine solche Modulation könnte durch die gezielte Inhibition endogener IL-12 Produktion stattfinden. Hierfür ist der Einsatz von RNA Interferenz eine relativ neue und vielversprechende Methode, um die Funktion von DCs zu modulieren<sup>140</sup>. Es konnte bereits in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass die Th-Zelldifferenzierung durch die Transfektion von DCs mit siRNA gegen IL-12, beeinflussen kann<sup>141,142</sup>.

Das Prinzip der siRNA, durch den die Inhibition bestimmter Moleküle vermittelt wird, beruht auf kurzen RNA-Molekülen (small interference RNA, siRNA), die sich sequenzspezifisch an die zelleigene RNA lagern, wodurch die Translation verhindert und vorübergehend die Proteinexpression inhibiert wird. Diese kurzen RNA-Moleküle können von bestimmten Expressionsvektoren exprimiert werden, wenn diese unter der Kontrolle eines so genannten mU6pro-Promoters stehen.

Im Folgenden sollte versucht werden, durch Koimmunisierung mit Vektoren kodierend für siRNA gegen die Untereinheiten des IL-12, die Th1-Differenzierung zu hemmen und eine Th2-Differenzierung zu fördern. Dabei sollten beide Antigenvektoren zum Einsatz kommen und die Effekte auf die Th-Zelldifferenzierung miteinander verglichen werden.

### **5.6.1 siRNA gegen die Untereinheiten von IL-12, p35 und p40 sind funktionell *in vitro***

Zuerst einmal wurden die siRNA-Vektor konstruiert, die jeweils für siRNA gegen die IL-12 Untereinheiten p35 und p40 kodieren (psiIL12p35 und psiIL12p40). Diese Vektoren mussten erst *in vitro* getestet werden, wie stark die siRNA die Expression von IL-12 hemmen kann. Dazu wurde eine Zelllinie mit den siRNA-Vektoren transfiziert und zusätzlich mit einem Vektor kodierend für das Zytokin IL-12. Die Frequenz der IL-12 exprimierenden Zellen wurde durch intrazelluläre Färbung im FACS nach 24 und 48 Stunden gemessen. Als positive Kontrolle wurde bei einem Ansatz ein siRNA-Vektor verwandt, der für eine irrelevante RNA spezifisch ist (psiGFP).



### Abb23 Funktionalitätstest der siRNA-Vektoren psiIL12p35 und psiIL12p40

Transfektion der 293T Zelllinie *in vitro* mit pIL-12 und den siRNA-Vektoren psiIL12p35, psiIL12p40 bzw. einem Kontrollvektor psiGFP. Die Messung des Zytokins IL-12p70 erfolgte nach 24h und 48h. Dazu wurden die Zellen fixiert und intrazellulär angefärbt und im Flowzytometer analysiert.

Die Abbildung 23 zeigt, dass die Expression von IL-12 schon nach 24 Stunden um circa 70% gehemmt ist und nach 48 Stunden um circa weitere 20% abnimmt. Somit wurde *in vitro* gezeigt, dass der Vektor psiIL12p35 wirksam ist und in der Lage die Expression von IL-12 über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden zu inhibieren. Analog wurde der Funktionalitätstest für den Vektor psiIL12p40 durchgeführt und ähnlich starke Suppression der IL-12-Produktion erzielt. Somit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass beide siRNA-Vektoren wirksam sind und in der Lage sind, die Expression von IL-12 über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden zu inhibieren.

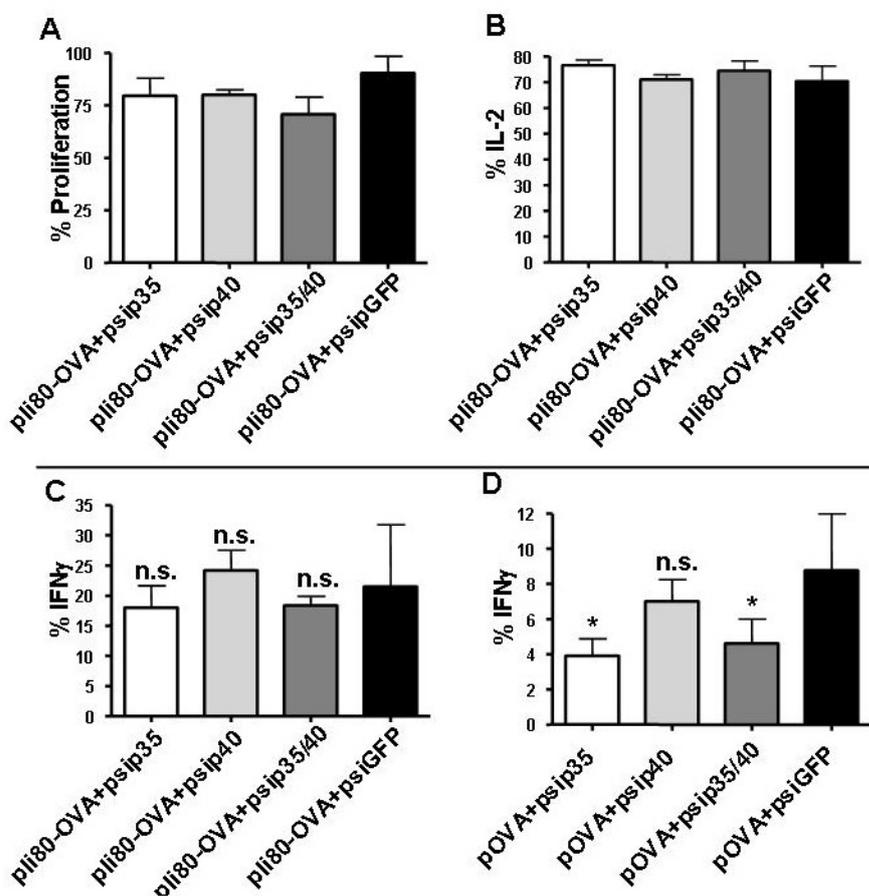
### 5.6.2 Koimmunisierung mit siRNA-Vektoren gegen IL-12 Untereinheiten und ihr Einfluss auf die Polarisierung der Th-Zellen

Wie bereits unter 5.2 beschrieben sollte durch die Beschränkung der Antigenpräsentation mit pli80-OVA der Effekt des koapplizierten Vektors verstärkt werden. Somit geht die Antigenpräsentation und die Modulation durch die siRNA von derselben APC aus und wirken dadurch effektiver auf die Th-Zelldifferenzierung.

Mit diesem Ziel wurden die beiden Antigenvektoren pli80-OVA und pOVA jeweils mit den siRNA-Vektoren psiIL12p35 und psiIL12p40 in Kombination koappliziert bzw. die

jeweiligen Antigenvektoren mit beiden siRNA-Vektoren gleichzeitig appliziert um eine maximale Inhibition auf die IL-12 Expression zu erzielen. Als siRNA-Kontrollvektor wurde psiGFP verwandt, der gegen ein irrelevantes Protein, das Green Fluorescent Protein (GFP), kodiert.

Zunächst wurden TCR-transgene, naive Th-Zellen in WT Tiere transferiert und vier Tage nach der Genegun Immunisierung aus dem Lymphknoten reisoliert. Ein Teil dieser Zellen wurde für die Analyse der Proliferation verwendet und der restliche Teil wurde mit PMA/Ionomycin restimuliert, um das *in vivo* erworbenes Zytokinprofil abzurufen. Die IFN $\gamma$  Produktion wurde daraufhin intrazellulär analysiert.



**Abb24 Zytokinproduktion der antigenspezifischen Th Zellen nach Koimmunisierung mit siIL12 Untereinheiten (p35 und p40)**

Wildtyp-Balb/c-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene, naive Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pII80-OVA oder pOVA, in Kombination der verschiedenen siRNA-Vektoren psiIL-12p35 bzw. psiIL12p40, immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. Signifikanztest t-Test: \*  $p < 0,05$  bzw. n.s.=nicht signifikant bezogen auf pGFP.

Die Abbildung 24 zeigt die Proliferation und die Zytokinfärbungen der verschiedenen Koimmunisierungen. Die Proliferation (Abb 24A) und die IL-2 Expression (Abb 24B) ist in allen Gruppen vergleichbar und zeigt, dass die zusätzlich verabreichten Plasmide keinen Einfluss auf die Aktivierung der Th Zellen ausüben.

Die Abbildungen 24C und 24D zeigen die Frequenzen der IFN $\gamma$  Produktion innerhalb der proliferierten Zellen. Die Koimmunisierung von pli80-OVA (Abb24C) und von pOVA (Abb24D) erfolgte jeweils mit den einzelnen siRNA-Vektoren oder in Kombination mit beiden.

Generell konnte mit beiden Antigenvektoren eine Reduktion der IFN $\gamma$  Produzenten nach Koimmunisierung mit psiIL12p35 bzw. mit psiIL12p35/p40 beobachtet werden. Diese Tendenz war nur bei der Koimmunisierung mit pOVA signifikant im Vergleich zum psiGFP ausgeprägt.

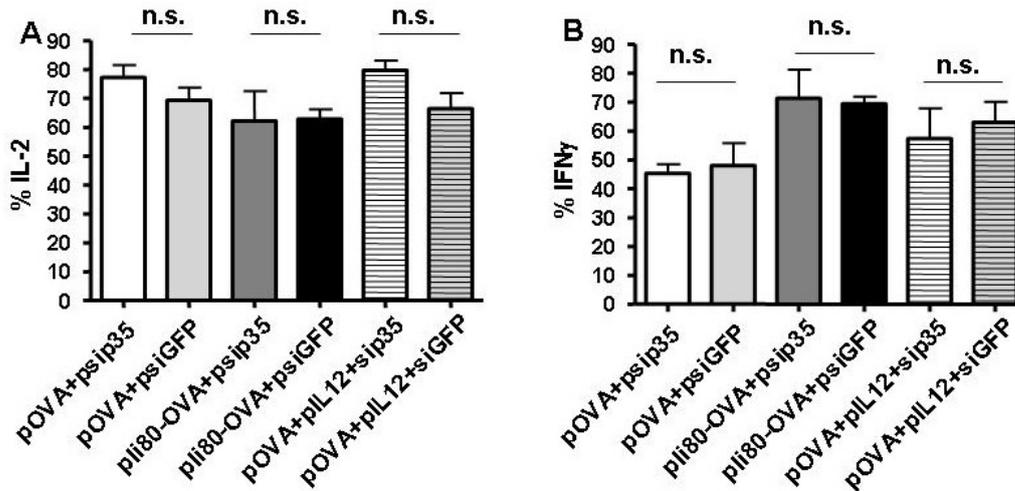
Im Gegensatz dazu, hatte die Koimmunisierungen mit pli80-OVA bzw. pOVA in Kombination mit psiIL12p40 allein, keinen Einfluß auf die Polarisierung der Th-Zellen, im Vergleich zum psiGFP.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Koimmunisierung mit dem siRNA-Vektor psiIL12p35 *in vivo* offensichtlich die DCs so moduliert, dass dies eine Abschwächung der Th1-Polarisierung, gekennzeichnet durch eine geringere Zahl an IFN $\gamma$  Produzenten zur Folge hat. Wiederholungsexperimente zeigten jedoch kontroverse Ergebnisse.

### **5.6.3 Wiederholung der Koimmunisierung mit siRNA-Vektor gegen IL-12**

#### **Untereinheit p35**

Im folgenden Koimmunisierungsexperiment wurden beide Antigenvektoren zusammen mit psiIL12p35 bzw. dem Kontrollvektor psiGFP verwendet. Der siRNA-Vektor psiIL12p40 wurde hier nicht mehr mitgeführt, da dieser keinen Effekt auf die Th-Zelldifferenzierung zeigte.



### Abb25 Zytokinproduktion nach Koimmunisierung mit psiIL12p35

Wildtyp-Balb/c-Tiere erhielten  $1 \cdot 10^6$  TCR-transgene, naive Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen, die zuvor mit CFDA-SE gefärbt wurden. Einen Tag später wurden die Mäuse mit pli80-OVA oder pOVA, in Kombination mit dem siRNA-Vektor psiIL-12p35, immunisiert und 4 Tage später die transferierten Zellen aus den drainierenden Lymphknoten reisoliert. Direkt nach der Reisolation wurde ein Teil der Zellen auf Proliferation analysiert und der restliche Teil mit PMA/Ionomycin für 4 Stunden restimuliert, nach 2 Stunden wurde der Zellsuspension der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und intrazellulär nach Zytokinen im FACS analysiert. t-Test: \*  $p < 0,05$  n.s.=nicht signifikant.

Die Abbildung 25A zeigt die Frequenz der IL-2 Produktion innerhalb der proliferierten Zellen. Hier sind geringfügige Unterschiede zwischen den Antigenvektoren zu beobachten. Die Kontrollgruppen pOVA+pIL12 in Kombination mit den siRNA-Vektoren psiIL12p35 oder psiGFP wurden mitgeführt, um den Effekt von psiIL12p35 zu kontrollieren. Die siRNA gegen p35 sollte den IFN $\gamma$  induzierenden Effekt des pIL12 verringern. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb25B beiden letzten Balken).

Die Abbildung 25B zeigt die IFN $\gamma$  Produktion der proliferierten Zellen. Der Vergleich von, pli80-OVA jeweils mit und ohne psiIL12p35, sowie pOVA jeweils mit und ohne psiIL12p35, zeigt keine signifikanten Unterschiede in der IFN $\gamma$  Produktion. Demzufolge hatte in diesem Experiment die Koimmunisierung mit dem si-RNA Vektor psiIL12p35 keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung und der inhibierende Effekt auf die IFN $\gamma$  Produktion blieb aus. Bei einem genaueren Vergleich der IFN $\gamma$  Produktion zwischen den beiden Antigenvektoren (pOVA und pli80-OVA) zeigte sich die verstärkte Th1-Verschiebung nach pli80-OVA Immunisierung, wonach circa 20% mehr IFN $\gamma$  detektiert wurde.

Die Koimmunisierungsexperimente mit der siRNA gegen IL-12 wurden mehrfach wiederholt. Es zeigte sich in manchen Experimenten ein Rückgang der IFN $\gamma$  Produktion und in anderen Experimenten wiederum kein Unterschied in der Frequenz der IFN $\gamma$  Produzenten zwischen den Immunisierungsgruppen mit psiIL12p35 und dem Kontrollvektor. Zusammengenommen ergab sich ein Verhältnis von 4:9, wobei 4 Mal der inhibitorische Effekt auf die IFN $\gamma$  Produktion zu beobachten war und es 9 Mal keinen Unterschied gab. Dieser Effekt war überraschenderweise bei der Koimmunisierung mit pOVA in 50% der Fälle (2:2) zu beobachten und mit pli80-OVA in 22% der Fälle (2:7). Zusammenfassend können wir sagen, dass die Koimmunisierung mit psiIL12p35 tendenziell einen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung hat, dieser scheint aber durch noch unbekannte Faktoren beeinflusst zu werden.

### **5.7 Anwendung des pli80-Antigenplasmids in einem Krankheitsmodell für allergisches Asthma**

Der Invariant-chain-Vektor (pli80) sollte in einem Krankheitsmodell zur Behandlung von allergischem Asthma eingesetzt werden, um das Potential zur Therapie von Th-2 vermittelten Erkrankungen zu untersuchen.

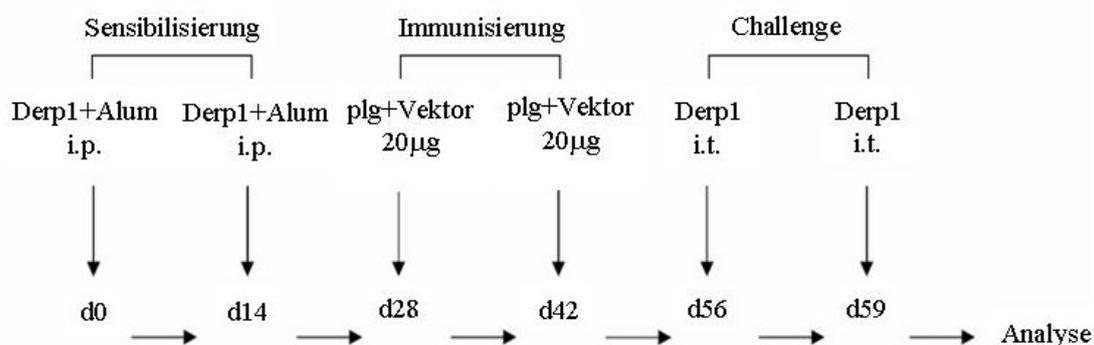
In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Sarah Howie der University of Edinburgh, Institut für Pathologie, wurde der pli80-Vektor zur Verfügung gestellt und in einem Krankheitsmodell zur Behandlung von allergischem Asthma angewandt. Die Versuche sind in den Abbildungen 26 und 27 dargestellt.

#### **5.7.1 Versuchsdurchführung**

Die Abbildung 26 zeigt das Behandlungsschema der Mäuse. Bei der Sensibilisierung an den Tagen 0 und 14 wird den Tieren ein Gemisch bestehend aus dem Antigen Derp1 und dem Adjuvanz Alum intra peritoneal (i.p.) injiziert. Dabei wird eine Immunreaktion gegen das Antigen Derp1 induziert. Durch die Verwendung des Adjuvanz Alum werden vorrangig Th2-Zellen generiert, die bei allergischen Reaktionen eine entscheidende Rolle

spielen. Anschließend erfolgt an den Tagen 28 und 42 die DNA Immunisierung mit "biodegradablen" Partikeln (plg), die mit den jeweiligen Vektoren beladen sind. Als Vektoren wurden Expressionsplasmide mit dem Antigen Derp1 (plg-pDerp1), dem MHC-II-restringierten Antigen Derp1 (plg-pIi-Derp1) und dem Kontrollplasmid pEmpty benutzt. Die eigentliche Auslösung der allergischen Asthmareaktion „Challenge“ erfolgt an den Tagen 56 und 59, durch Inhalation intra tracheal (i.t.).

6 Tage nach der letzten Challenge erfolgt die Analyse. Dabei wurde ein Entzündungsscore, zur Beurteilung der Stärke der allergischen Reaktion, in den verschiedenen Bereichen des Lungengewebes untersucht sowie die Infiltration der broncho-alveolar-Flüssigkeit (BALF) mit eosinophilen Granulozyten bestimmt.



### Abb 26 Versuchsprotokoll

Gruppen von n=6 Mäusen wurden in jeder Immunisierungsgruppe nach dem abgebildeten Protokoll behandelt.

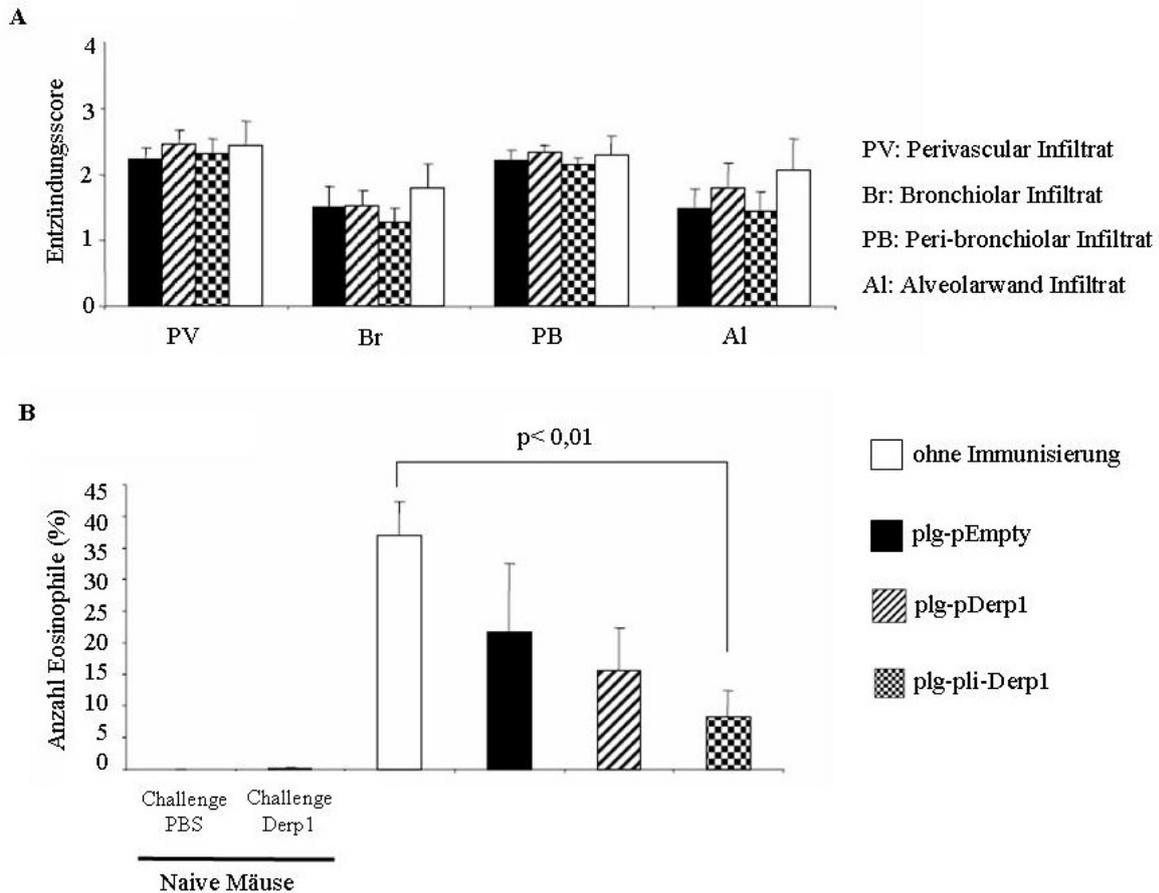
## 5.7.2 Effekt der Immunisierung mit dem pli80-Vektor auf die allergische Entzündungsreaktion

In den einzelnen Bereichen der Atemwege wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Entzündungsscores festgestellt (Abb 27A). Jedoch wurde eine stärkere Reduktion des Anteils der eosinophilen Granulozyten im BALF nach pli-Derp1 im Vergleich zur pDerp1 Immunisierung ermittelt (Abb 27B).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Immunisierung mit dem pli80-Vektor die Immunantwort in sensibilisierten Mäusen signifikant beeinflusst werden kann. Die Reduktion der Einwanderung eosinophiler Zellen in der Lunge ist ein viel versprechendes

## Ergebnisse

Ergebnis im Hinblick auf den Einsatz dieses Vektors zur Behandlung allergischer Erkrankungen. Weitere Untersuchungen sind an dieser Stelle jedoch notwendig, um genauere Aussagen über die Wirkung der DNA Immunisierung mit dem pli80-Vektor in Th2-vermittelten Erkrankungen zu erhalten.



### Abb 27 Darstellung von Entzündungsscore und Granulozyteninfiltration

Die Entzündung in verschiedenen Bereichen der Atemwege (PV,Br,PB,Al) der sensibilisierten Tiere wurde analysiert (A). Der Anteil von eosinophilen Granulozyten in der bronchio-alveolaren Flüssigkeit (BALF) wurde analysiert (B).