

6. Diskussion

6.1 Gezielte Antigenexpression zur Modulation der Immunantwort

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch gezielte Expression des Antigens auf MHC-II-positiven Zellen, die Th-Zelldifferenzierung mittels DNA Immunisierung zu beeinflussen. Der Vorteil bei der Verabreichung von Plasmid-DNA liegt darin, dass die kodierten Proteine von den transfizierten Zellen direkt *in vivo* produziert werden. Dadurch wird eine kosten- und zeitaufwendige Herstellung großer Mengen an Antigenen, die für eine Proteinimmunisierung nötig wären, vermieden. Zusätzlich ist es möglich unterschiedliche Plasmide gleichzeitig zu verabreichen. Die Immunisierung mit Plasmid-DNA eignet sich daher besonders gut, um potentiell immunmodulatorische Moleküle, wie Zytokine oder Membranproteine, zusammen mit dem Antigen *in vivo* zur Expression zu bringen. Der Ort der Expression solcher Moleküle bliebe dadurch begrenzt und toxische Wirkungen oder Effekte, die durch eine systemische Verabreichung auftreten könnten, wären so vermieden. Beispielsweise wäre eine Expression von Membranproteinen gar nicht anders, als durch Applikation von DNA möglich.

Die Koapplikation von Antigen-DNA in Kombination mit Zytokin-DNA hat sich schon mehrfach als erfolgreiche Methode zur Modulation von Immunantworten erwiesen^{72,87,89,92,143-145}.

Derartige Koimmunisierungen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt. Hierbei hatten allerdings einige Kombinationen mit DNA, auf der Membranproteine oder kostimulatorische Moleküle kodiert waren, zum Teil gar keinen Einfluss auf die Immunantwort. Auch Koimmunisierungen mit Zytokin-DNA hatten teilweise keine modulatorische Wirkung oder führten sogar zu völlig gegenteiligen Effekten, wie sich bei der IL-4-Koimmunisierung zeigte. Hierbei wurde die Th-Zelldifferenzierung in Richtung Th1-Entwicklung verschoben. IL-4 ist aber als stark Th2-induzierendes Zytokin bekannt. Neben der Th2-Differenzierung induzierenden Wirkung auf Th-Zellen hat IL-4 auch eine aktivierende und maturierende Wirkung auf DCs. Reife DCs sind verstärkt in der Lage IL-12 zu produzieren¹⁴⁶. In Folge der Koimmunisierung mit IL-4, wird IL-4 von allen transfizierten Zellen exprimiert und wirkt folglich auf die DCs der Haut, wodurch diese zur IL-12 Produktion veranlasst werden. Auch das Ovalbumin wird von allen transfizierten

Zellen produziert und anschließend sekretiert und erst dann von untransfizierten APCs der Umgebung aufgenommen und präsentiert.

Bei einer Koimmunisierung produzieren die Ova präsentierenden DCs auch IL-12. Jedoch sind nur wenige dieser Zellen direkt transfizierte DCs, und produzieren das koimmunisierte IL-4. Die Zahl der direkt transfizierten DCs der Haut, ist laut Untersuchungen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, sehr gering und beträgt circa 30 Stück. Die Anzahl derjenigen DCs, die das Antigen aufnehmen und präsentieren ist jedoch weitaus höher. Dadurch werden die Th-Zellen größtenteils durch IL-12-produzierende DCs aktiviert, während nur wenige DCs bei der Interaktion mit den T-Zellen IL-4 sezernieren. Hierdurch wird die Wirkung von IL-12 dominant und es resultiert eine Th1-Differenzierung. Um die Wirkung von IL-4 auf die Th-Zellen zu verstärken, müsste demnach die Anzahl von denjenigen DCs reduziert werden, die nur Ova präsentieren aber kein IL-4 sezernieren. Das sind diejenigen DCs, die sekretiertes Ovalbumin aufnehmen aber nicht direkt transfiziert sind. Wenn es also nur durch direkt transfizierte APCs zur Ova-Präsentation kommt, könnte somit die Wirkung des IL-4, bzw. auch anderer koimmunisierter Moleküle verbessert werden. Genau das sollte durch die Verwendung des pli80-OVA Vektors erreicht werden. Dieser Effekt tritt sehr wahrscheinlich nicht nur für die IL-4-Koimmunisierung, sondern auch für die Koimmunisierung mit anderen Modulatoren auf und verringert oder verändert ihre Effektivität.

Daher sollte in dieser Arbeit die Antigenpräsentation auf direkt transfizierte APCs beschränkt werden. Das Antigen sollte dabei so verändert werden, dass es einerseits nicht mehr sekretiert wird, aber andererseits trotzdem effizient über MHC-II-Moleküle präsentiert wird. Somit würde das Antigen ausschließlich von den APCs präsentiert werden, die gleichzeitig das immunmodulatorische Molekül/Zytokin exprimieren.

6.1.1 li-Ovalbumin intrazellulär lokalisiert und über MHC-II-positive Zellen präsentiert

Das Modellantigen Ovalbumin besitzt eine Sekretionssequenz und wird demzufolge von den transfizierten Zellen der Haut sekretiert. Um dies zu verhindern, wurde diese Sequenz entfernt. Folglich würde das Ovalbumin im Zytosol verbleiben. Da intrazellulär vorliegende Proteine normalerweise nicht über MHC-II-Moleküle präsentiert werden,

wurde das Antigen noch einmal modifiziert, indem es zusätzlich an eine Ziel-Sequenz fusioniert wurde, durch die es effizient in den MHC-II-Peptidbeladungsweg eingeschleust wird. Eine solche Ziel-Sequenz ist die, der Invarianten Kette (Ii). Demzufolge wurde Ovalbumin an die ersten 80 Aminosäuren der Ii-Kette gekoppelt. In einer Untersuchung zur Th-Aktivierung in diesem System wurde gezeigt, dass die Effizienz der Antigenpräsentation unter verschiedenen Konstrukten am optimalsten war, wenn es die ersten 80 Aminosäuren der N-terminalen Ii-Sequenz beinhaltet¹²⁰. Somit wird das zytosolisch vorliegende Ii-Ovalbumin in die Endosomen eingeschleust und die MHC-II-Moleküle effizient beladen (siehe Abb6). Dadurch wird gewährleistet, dass das Antigen nicht sekretiert wird und außerdem nur von den direkt transfizierten MHC-II-positiven Zellen präsentiert wird (siehe Abb7).

In einem *in vitro* System zeigte die Transfektion mit dem pli80-OVA eine starke Aktivierung TCR-transgener CD4⁺ T-Zellen, wohingegen pΔIi80-OVA keine Aktivierung hervorrief. Da der einzige Unterschied der beiden Vektoren das Vorhandensein der Ii-Sequenz war, zeigte dies, dass das Ii-Ovalbumin effektiv in die Endosomen eingeschleust werden musste, um die MHC-II-Moleküle effektiv mit Peptiden zu beladen. Die Transfektion mit pOVA führte nicht zur Proliferation der Th-Zellen, was zum einen daran lag, dass eine zu geringe Konzentration des sekretierten Ovalbumins im Medium vorlag, um von den A20-Zellen aufgenommen und präsentiert zu werden und zum anderen können B-Zellen *in vitro* nur schlecht Antigen unspezifisch aufnehmen. *In vivo* hingegen sind die DCs sehr effizient in der Aufnahme von Ovalbumin, was sich nach Genegun mit pOVA zeigte. Dabei führte die Immunisierung von Balb/c Mäusen, mit pli80-OVA sowie mit pOVA zu einer vergleichbar starken Proliferation der transfizierten Zellen.

Im Gegensatz dazu, wurde nach der Immunisierung mit pΔIi80-OVA, keine Th-Zellaktivierung beobachtet. Dies verdeutlicht, dass die Präsenz des Ovalbumins im Zytosol transfizierter APCs allein nicht ausreicht, um eine spezifische Th-Zellantwort auszulösen. Außerdem wird dadurch deutlich, dass eine Immunantwort auf Ovalbumin, das aus abgestorbenen, transfizierten Zellen frei wurde, keine Rolle bei der Th-Aktivierung spielte und die Immunantwort nicht beeinflusste. Dies zeigte auch, dass das Antigen entweder aufgenommen und präsentiert oder direkt in den MHC-II-Beladungsweg geschleust werden muss, um eine signifikante Immunantwort zu erzeugen.

Darüber hinaus konnten wir nach pOVA Immunisierung antigenspezifische Antikörper detektieren, nicht jedoch nach pli80-OVA. Dadurch wird noch einmal bestätigt, dass das Ii-Ovalbumin nicht sekretiert wird, da es nur zu einer B-Zellaktivierung kommt, wenn den B-

Zellen das Antigen zugänglich ist. Das heißt, wenn es entweder löslich vorliegt oder membrangebunden ist.

6.2 Keine verbesserte Wirkung der Koimmunisierung mit pli80-OVA

6.2.1 Koimmunisierung mit pIL-4 hat keine Wirkung auf die Th-Zelldifferenzierung

IL-4 ist das zentrale Th2-Differenzierung induzierende Zytokin und die Entwicklung von Th2-Zellen hängt wesentlich von der Anwesenheit des Zytokins zu Beginn der Immunantwort ab^{4,147}. Nach IL-4 DNA Koimmunisierungsstudien konnte im Krankheitsmodell gezeigt werden, dass nach Restimulation von Milzzellen erhöhte IL-4 und erniedrigte IFN γ Werte gefunden wurden^{91,148}.

Wie zuvor erwähnt wurde in unserer Gruppe die DNA Koimmunisierungen mit pOVA und pIL-4 durchgeführt und entgegen den Erwartungen ein Th1-induzierender Effekt beobachtet. Unser Ziel war es nun durch Koimmunisierung mit pli80-OVA und dem Plasmid kodierend für IL-4, die Wirkung des IL-4 auf die Th-Zelldifferenzierung zu verstärken, da die Antigenpräsentation nur durch direkt transfizierte Zellen erfolgt und somit auch die Modulation von derselben APC ausgeht. Dabei sollte der bekannte Th2-Differenzierung induzierende Effekt zu genutzt werden, um damit den Differenzierungsprozess der antigenspezifischen Th-Zellen *in vivo* zu modulieren.

Durch die Koimmunisierung mit pli80-OVA und pIL-4 konnten wir jedoch keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung feststellen. Bei genauerer Betrachtung des Zytokinprofils beobachteten wir eine generelle Th1-Verschiebung nach pli80-OVA Immunisierung, im Vergleich zu pOVA, die zudem unabhängig von der Koimmunisierung mit pIL-4 war. Die Tatsache, dass sowohl mit als auch ohne pIL-4 der Anstieg an IFN γ , im Vergleich zur pOVA Koimmunisierung, ungefähr gleich stark war, lässt vermuten, dass dieser Th1-polarisierende Effekt nicht auf das koapplizierte pIL-4 zurückzuführen ist und auch nicht davon beeinflusst wird. Dieses Ergebnis entsprach nicht unseren Erwartungen, zumal IL-4 als sehr potentes, Th2-induzierendes Zytokin bekannt ist, und nicht nur *in vitro*^{26,27}, sondern auch *in vivo*^{149,150} in der Lage ist die Differenzierung in Th2 Zellen zu induzieren.

Auch konnte es in Studien mit Autoimmunerkrankungen schon erfolgreich eingesetzt werden. Dabei hat man Versuchstieren eine größere Menge an löslichem IL-4 verabreicht und eine Besserung der Krankheitssymptome ausgelöst durch weniger IFN γ Produktion beobachtet^{42,45,151}.

Es gibt verschiedene mögliche Ursachen, die in Frage kommen, warum die IL-4 Koimmunisierung mit pli80-OVA keinen Einfluss hatte.

Die Funktionalität des pIL-4 können wir als Ursache ausschließen, da IL4 von einer mit diesem Vektor transfizierten Zelllinie *in vitro* produziert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine andere Ursache könnte die Stärke der Expression sein. Es wäre denkbar, dass die Menge an produziertem IL-4 *in vivo* nicht ausreicht, um eine Th2-Polarisierung zu induzieren. Ein weitere Ursache könnte der Zeitpunkt bzw. der Ort der IL-4 Produktion sein. Demnach ist es möglich, dass die maximale IL-4 Produktion entweder vor oder nach dem Zeitpunkt der Antigenpräsentation stattfand. Dadurch hätte IL-4 gar keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung. Dies wären Erklärungen, warum es keine Unterschiede nach pli80-OVA Koimmunisierung gibt, widerspricht jedoch der Tatsache, dass der Th1-induzierende Effekt nach pOVA Koimmunisierung beobachtet wurde, denn diese Auswirkungen sollten in allen Gruppen gleichermaßen zu beobachten sein. Sehr wahrscheinlich ist der Th1-induzierende Effekt durch pli80-OVA allein schon so stark, dass dieser durch IL-4 nicht beeinflusst wird.

6.2.2 Vorteile für den Einsatz der siRNA-Technologie bei DNA

Immunisierungen

Eine relativ junge Technologie, die zur Modulation der Immunantwort eingesetzt werden kann ist die RNA Interferenz (siRNA). Durch die direkte Transfektion von Zellen bei der DNA Immunisierung können mittels siRNA gezielt nur in diesen Zellen bestimmte Zielmoleküle ausgeschaltet werden. Zudem werden die jeweiligen APCs nur für wenige Tage moduliert, wodurch es nicht zu einer langfristigen Beeinflussung physiologischer Prozesse kommt und die Funktion der betroffenen Zellen erhalten bleibt.

6.2.2.1 Einfluss der Koimmunisierung mit siRNA gegen IL-12 auf die Th-Zelldifferenzierung

Bei Koimmunisierungen mit Plasmiden kodierend für siRNA erfolgt die Modulation durch Ausschalten endogener Moleküle. Der Einsatz von RNA Interferenz ist eine relativ viel versprechende Methode, um z. B. die Funktion von DCs zu modulieren¹⁴⁰. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Funktion der DCs durch die Transfektion mit siRNA gegen proapoptische Moleküle^{152,153}, das Adaptermolekül MyD88¹⁵⁴, oder gegen Zytokine, die für die Th-Zelldifferenzierung wichtig sind wie IL-10^{155,156} oder IL-12^{141,142} beeinflusst werden kann.

Das von aktivierten DCs produzierte Zytokin IL-12 ist der zentrale Induktor der Th1-Differenzierung induzierenden Zytokine. Die Anwesenheit von IL-12 während der Aktivierung der Th-Zellen führt über Bindung an den IL-12-Rezeptor zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet und folglich zur IFN γ Produktion in diesen Zellen¹⁵⁷. Deshalb ist IL-12 ein geeignetes Zielmolekül, um dessen Expression gezielt durch siRNA auszuschalten und somit der Th1-Differenzierung entgegenzuwirken.

Wir beobachteten in einigen Experimenten eine IFN γ Inhibition mit psiIL12p35, nicht jedoch mit psiIL12p40, in anderen Experimenten fanden wir wiederum keine Unterschiede in der IFN γ Produktion mit oder ohne psiIL12p35. In der Mehrzahl der Experimente war die Th1-reduzierende Wirkung durch psiIL12p35 Koimmunisierung jedoch nicht reproduzierbar.

Die Funktionalität der siRNAs, konnte als eine mögliche Ursache für unsere Beobachtungen ausgeschlossen werden, da ein *in vitro* Test ergab, dass die IL-12 Produktion, in einer mit pIL-12 transfizierten Zelllinie herunter reguliert wurde. Nach Genegun Immunisierung könnte jedoch eine zu schwache Runterregulierung der IL-12 Produktion als Ursache in Frage kommen. Zumal eine Koimmunisierung unter Verwendung der 10fachen Menge der siRNA-Vektoren (Daten nicht gezeigt) auch keinen Einfluss auf die Th-Zellantwort hatte. Somit konnte allein die Erhöhung der Vektormenge dies nicht verändern.

Bisher gibt es nur eine Veröffentlichung, die eine siRNA Anwendung mit der Genegun zeigt¹⁵². Dabei wurde allerdings kein siRNA-kodierender Vektor, sondern die reine siRNA verwendet. Die Autoren demonstrierten die Wirkung der siRNA, indem die Funktion proapoptischer Moleküle in transfizierten DCs inhibiert wurde. Dies äußerte sich in einer verlängerten Lebensdauer der DCs, wodurch die Immunantwort verstärkt wurde. Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, dass es möglich ist siRNA mittels Genegun zu applizieren und die präsentierenden DCs in ihrer Funktion zu beeinflussen. Andere Untersuchungen zeigten, dass mit *in vitro* sip35 transfizierte DCs, injiziert in Empfängertiere die Th2-Antwort fördern¹⁴¹. Diese Daten zeigen, dass es prinzipiell möglich ist durch den Einsatz von siRNA gegen IL-12 eine Th2-Polarisierung zu fördern. Bezüglich unseren Beobachtungen, können wir aber keine Aussage darüber treffen, ob die auf dem Vektor kodierte siRNA effizient genug ist, um das von den transfizierten DCs produzierte IL-12 *in vivo* inhibieren zu können. Auch *Borg et. al.*¹⁴² konnte *in vitro* durch Transfektion von DCs mit sip40 zeigen, dass die IFN γ Produktion in NK-Zellen inhibiert wird.

Weiterhin war unklar, warum die Tendenz der IFN γ Inhibition bei der Koimmunisierung mit beiden Antigenvektoren auftrat. Der Effekt von siIL12 sollte sich nur auf direkt transfizierte Zellen beschränken, deshalb sollte dieser erwartungsgemäß mit pli80-OVA stärker sein, als mit pOVA Immunisierung. Dies war jedoch nicht der Fall. Generell wäre es denkbar, dass das Zeitfenster, in dem die siRNA maximal wirkt, *in vivo* ein anderes ist als *in vitro* und zu dem Zeitpunkt der APC/Th-Zell-Interaktion verschoben ist.

Darüber hinaus konnten wir wie schon nach der IL-4-Koimmunisierung, die verstärkte IFN γ Produktion mit pli80-OVA, im Vergleich zur Immunisierung mit pOVA, beobachten. Diese verstärkte Th1-Differenzierung konnte auch noch in weiteren, hier nicht gezeigten Koimmunisierungsexperimenten beobachtet werden. Beispielsweise konnten wir in Koimmunisierungen mit verschiedenen Notch-Liganden (Jagged-1, Delta-4) keinen Einfluss auf die Th-Zellantwort feststellen.

Diese starke, ausschließlich mit pli80-OVA auftretende Th1-Verschiebung musste folglich mit der Sequenz der Invarianten Kette zusammenhängen bzw. in dem, durch diese hervorgerufenen Antigenpräsentationsmechanismus liegen.

Die Gesamtheit der Koimmunisierungsexperimente zeigte keine Verbesserung der Wirkung des koimmunisierten Moleküls, durch die Verwendung von pli80-OVA. Vielmehr haben wir eine generelle Th1-Verschiebung nach pli80-OVA beobachtet. Aufgrund dieser Basis und mit dem Ziel eine Th2-Antwort zu induzieren, erschien es daher sinnvoll zuerst einmal die Mechanismen, die zu der verstärkten Th1-Antwort führen aufzuklären. Erst dann kann entschieden werden, ob die Koimmunisierungsstrategie mit pli80-OVA erfolgversprechend ist.

6.3 Mögliche Ursachen für die Th1-Polarisierung

Die Th1-Antwort nach Immunisierung mit pli80-OVA, war durch eine erhöhte Anzahl an IFN γ produzierenden Th-Zellen sowie einer fast vollständigen Aufhebung der IL-4 Produktion (Abb14), im Vergleich zu pOVA, gekennzeichnet. Die Proliferation und IL-2 Produktion war mit beiden Antigenvektoren auf vergleichbarem Niveau (Abb14). Dadurch konnte eine unterschiedlich starke Aktivierung der Th-Zellen nicht als Ursache für die genannten Unterschiede in Frage kommen.

In der Literatur hingegen ist eine generelle Th2-Antwort nach Genegun Immunisierung beschrieben worden^{158,159}. Diese Th2-Verschiebung haben wir weder nach pOVA, noch nach pli80-OVA Immunisierung beobachtet.

Möglicherweise könnte der relativ frühe Zeitpunkt (4 Tage), zu dem die transferierten Th-Zellen nach der Genegun Immunisierung analysiert wurden, eine Erklärung für die Th1-Polarisierung sein. In unserer Arbeitsgruppe sind dazu bereits Kinetiken durchgeführt worden, in denen gezeigt wurde, dass je später die transferierten Th-Zellen analysiert wurden, desto schwächer war das Th1-Übergewicht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde aber auch zu einem späten Zeitpunkt die Th-Zelldifferenzierung untersucht (CD40L⁺ Gedächtniszellen, Abb20/21) und zumindest für die pli80-OVA Immunisierung ebenfalls eine Th1-Verschiebung beobachtet. Damit kann der Zeitpunkt der Analyse als Ursache ausgeschlossen werden und erklärt nicht, die verstärkte Th1-Antwort nach pli80-OVA, im Vergleich zu pOVA.

Eine mögliche Ursache, könnten CpG Motive sein, die in der Plasmid-DNA enthalten sind. Da nach pli80-OVA Immunisierung, jedoch nicht nach pOVA, ausschließlich die mit der DNA direkt transfizierten APCs die präsentierenden Zellen sind, könnte hier verstärkt durch CpG-Motive eine Th1-Polarisierung ausgelöst werden. Aber nicht nur CpG-Motive könnten in dem Zusammenhang wichtig sein. Auch die von den präsentierenden Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle oder andere Faktoren, die sich zwischen direkt transfizierten APCs und denen, die das Antigen aus der Umgebung aufgenommen haben möglicherweise unterscheiden, könnten die Th-Zelldifferenzierung beeinflussen.

Ein weiterer Unterschied nach pli80-OVA und pOVA Immunisierung ist die Lokalisation des Ovalbumin (intrazellulär versus sekretiert). Dadurch ist das Antigen für B-Zellen bei einer pli80-OVA Immunisierung nicht zugänglich und kann folglich von diesen auch nicht präsentiert werden. Somit fehlen die B-Zellen als APCs hier, was jedoch nicht der Fall ist

nach pOVA Immunisierung. Möglicherweise hat das Fehlen einer B-Zellbeteiligung Auswirkungen auf die Th-Zelldifferenzierung.

Es wäre auch vorstellbar, dass die effiziente Beladung der MHC-II-Moleküle, hervorgerufen durch die li80-Sequenz, eine verstärkte Antigenpräsentation nach pli80-OVA Immunisierung zur Folge hat. Dadurch werden mehr MHC-II-Peptid-Komplexe auf den transfizierten APCs präsentiert, was sich wiederum auf die Th-Zelldifferenzierung auswirken kann.

Im Folgenden werden unterschiedliche Ansätze zur Ursachenklärung der verstärkten Th1-Polarisierung, hervorgerufen durch die pli80-OVA Immunisierung, diskutiert.

6.3.1 CpG Motive führen nicht zur Th1-Differenzierung nach pli80-OVA Immunisierung

In der Plasmid-DNA enthaltene CpG-Motive könnten einen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung haben, da sich diese DNA in allen transfizierten Zellen befindet. Während die Antigenpräsentation nach pli80-OVA Immunisierung ausschließlich von direkt transfizierten APCs der Haut erfolgt, präsentieren nach pOVA Immunisierung hauptsächlich die Zellen das Antigen, die es aus der Umgebung aufgenommen haben. Deshalb sollte untersucht werden, ob die verstärkte Th1-Polarisierung mit pli80-OVA auf die CpG-Motive in der DNA zurückzuführen ist.

CpG Motive sind Cystein- und Guanin-reiche DNA-Sequenzen, die sowohl in eukaryotischer, als auch in bakterieller DNA enthalten sind. Die in Bakterien vorkommenden CpG-Motive sind jedoch unmethyliert. Solche unmethylierten CpG-Motive können von dem intrazellulären Toll-Like-Rezeptor 9 (TLR9) erkannt werden^{160,161}. Die für die Immunisierung verwendeten Plasmide, werden in Bakterien vermehrt und enthalten daher besonders viele unmethylierte CpG-Sequenzen. Durch die Erkennung der CpG-Motive über TLR9 wird eine Signalkaskade in Gang gebracht, wobei es zur Transkription verschiedener Gene kommt und die APC stark aktiviert wird. In Folge der Aktivierung werden nicht nur kostimulatorische Moleküle (B7.1, B7.2) und MHC-II-Moleküle in verstärktem Maße exprimiert¹⁶², sondern auch Zytokine, wie z. B. IL-12. Da IL-12 als ein starkes Th1-induzierendes Zytokin bekannt ist, könnten somit CpG-Motive

der Plasmid-DNA eine Ursache für die beobachtete Th1-Polarisierung nach pli80-OVA sein.

Das Adaptermolekül, das für die Weiterleitung des TLR9-Signals verantwortlich ist, ist MyD88. Mäusen, denen dieses Molekül fehlt haben einen normalen Phänotyp, können aber ein TLR9 Signal nicht mehr weiterleiten^{163,164}.

Um die Rolle von CpG-Motiven zu prüfen, immunisierten wir MyD88-ko und WT Tiere zum Vergleich. Dabei beobachteten wir auch ohne Übertragung von TLR9 Signalen, über MyD88, einen starken Effekt der Immunisierung mit pli80-OVA auf die Th1-Polarisierung (Abb15). Da die Signalweiterleitung von TLR9-Signalen ausschließlich über MyD88 erfolgt^{160,165,166}, können die CpG Motive hier als Th1-induzierende Faktoren ausgeschlossen werden. Genauer betrachtet war die Proliferation und die IL2-Produktion zwischen MyD88-ko und WT Tieren vergleichbar, was zeigte, dass die transferierten Zellen, unabhängig vom genetischen Hintergrund, gleichermaßen aktiviert wurden. In Untersuchungen von mehrfach DNA immunisierten TLR9- und MyD88-defizienten Tieren im Vergleich zu WT Tieren konnte gezeigt werden, dass CpG-DNA keine dominante Rolle bei der Initiierung einer Immunantwort nach DNA Immunisierung spielt¹⁶⁷, was auch zu unseren Beobachtungen passte. Darüber hinaus wurde in einem Tuberkulose Mausmodell kein Einfluss auf die Entwicklung der Krankheit in MyD88 defizienten Tieren festgestellt¹⁶⁸. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Beobachtungen und zeigen, dass der MyD88-Signalweg nach DNA Immunisierung sowie bei einer Infektion mit Mycobakterien nicht unbedingt benötigt wird, um eine starke Immunreaktion auszulösen bzw. die mycobakterielle Infektion zu bekämpfen. Das bedeutet jedoch nicht, dass der MyD88-Signalweg generell keine Bedeutung bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen hat, was wiederum in Staphylococcus aureus- sowie Toxoplasma gondii-Infektionen deutlich wird, in denen sich die Signalübermittlung über MyD88 als überlebenswichtiger Mechanismus herausstellte^{169,170}.

Somit konnten wir zeigen, dass Signale, die über das Adaptermolekül MyD88 übertragen werden, nicht die Ursache für die beobachtete Th1-Verschiebung nach pli80-OVA Immunisierung sind. Dadurch können wir jedoch nicht ausschließen, dass direkt transfizierte APCs, im Gegensatz zu APCs, die Ovalbumin aus der Umgebung aufgenommen haben, besonders stark aktiviert sind und andere Signale oder Signalwege hier aktiviert sind.

6.3.2 Beteiligung antigenspezifischer B-Zellen an der Immunantwort hat keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung

B-Zellen sind in der Lage über ihren BCR spezifisch lösliche Proteine aufzunehmen, diese zu prozessieren und anschließend über MHC-II-Moleküle den Th-Zellen zu präsentieren. Somit können B-Zellen auch als APCs fungieren und bei der Aktivierung von Th-Zellen beteiligt sein^{171,172}. Solch eine B-Zellbeteiligung findet bei der Immunisierung mit pOVA statt, da das Ovalbumin sekretiert wird und als lösliches Antigen vorliegt. Im Gegensatz dazu finden wir keine B-Zellbeteiligung mit pli80-OVA. Aufgrund dieses Unterschieds wollten wir untersuchen, ob die fehlende B-Zellbeteiligung nach pli80-OVA eine mögliche Ursache für die beobachtete Th1-Polarisierung ist.

Es gibt Hinweise aus *in vitro* Experimenten, dass von B-Zellen stammende Zytokine, wie IL-10 und IL-6, eine Th1-Entwicklung hemmen und eine Th2-Entwicklung fördern. Demnach wird die Anzahl IFN γ -produzierender Th-Zellen reduziert und die der IL-4 Produzenten erhöht, wenn die Th-Zellen in der Anwesenheit von DCs und B-Zellen aktiviert werden¹⁷³. Dieser Effekt konnte durch den Zusatz von anti-IL-10 bzw. anti-IL-6 Antikörpern aufgehoben werden. Daraus ergab sich die Frage, ob die verstärkte Th1-Polarisierung auf das Fehlen einer B-Zellbeteiligung zurückzuführen war.

Andere Untersuchungen zur Antigenpräsentation nach Genegun Immunisierung zeigten, dass die DCs der Haut allein als APCs nicht ausreichen, um eine optimale Th-Zellaktivierung zu induzieren¹⁷⁴. Daraus ergab sich die Frage, ob die Aktivierung der Th-Zellen nach Genegun Immunisierung in einer Umgebung ohne B-Zellen als APCs beeinträchtigt ist.

Wir immunisierten B-Zell-defiziente Tiere und parallel dazu WT Tiere mit beiden Antigenvektoren. Dabei beobachteten wir in beiden Mausstämmen eine vergleichbare Proliferation und IL-2 Produktion der transferierten Th-Zellen (Abb15). Dies zeigte, dass die Th-Zellaktivierung auch ohne B-Zellbeteiligung unverändert blieb. jedoch könnten auch andere APCs, wie z. B. Makrophagen, eine wichtige Rolle als Antigen präsentierender Zelltyp spielen.

Das Zytokinprofil zwischen WT und B-Zell-ko Mäusen unterschied sich nicht. Vielmehr beobachteten wir in beiden Mausstämmen die verstärkte Th1-Polarisierung nach pli80-OVA Immunisierung, im Vergleich zu pOVA (Abb15). Demzufolge, ist die verstärkte Th1-Antwort nach pli80-OVA Immunisierung auch nicht auf von B-Zellen produzierten

Zytokine zurückzuführen. Somit scheint der oben beschriebene Th1-hemmende und Th2-fördernde Mechanismus keinen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung zu haben.

Die B-Zellen haben in unserem System als eine weitere Antigen präsentierende Zellart keinen Einfluss auf die Aktivierung und Differenzierung der Th-Zellen.

6.3.3 Wird die Th-Zelldifferenzierung beeinflusst wenn die Antigenpräsentation ausschließlich über direkt transfizierte APCs stattfindet?

Es ist vorstellbar, dass die direkt transfizierten APC, im Vergleich zu den APCs, die das Ovalbumin aus der Umgebung aufnehmen, in verstärktem Maße durch die Transfektion selbst, aktiviert wurden. Dadurch kommt es beispielsweise zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86), wodurch die Th-Zelldifferenzierung beeinflusst werden kann^{21,175-177}. Um zu untersuchen, ob die Transfektion selbst die APCs derart beeinflusst, dass eine Th1-Entwicklung gefördert wird, sollte ein Antigenvektor zum Einsatz kommen, durch den die Antigenpräsentation, genau wie mit pli80-OVA, nur auf die direkt transfizierten APCs beschränkt ist. Dieser Antigenvektor kodiert für eine membranbundene, nicht-sekretierte Form des Ovalbumins (pmOVA) (Abb19)¹¹⁵. Das membran-Ovalbumin wird an der Zelloberfläche der transfizierten Zellen exprimiert, anschließend internalisiert und über Vesikeltransport ins Zellinnere gebracht. Dort verschmelzen die Vesikel mit den Endosomen, wo das Protein abgebaut wird und die MHC-II-Moleküle mit den Peptidfragmenten beladen werden. Die Antigenpräsentation nach pmOVA Immunisierung findet somit, wie auch mit pli80-OVA, ausschließlich von direkt transfizierten APCs statt.

Die Immunisierung mit pmOVA induzierte eine leicht verminderte Proliferation der Th-Zellen, im Vergleich zu pli80-OVA und pOVA. Dies könnte daran liegen, dass Internalisierung und Abbau von Membranproteinen und die anschließende Beladung der MHC-II-Moleküle mit den Peptiden nicht so effizient vonstatten geht. Demnach könnte die Menge an präsentiertem Ova-Peptid gerade ausreichen, um eine Immunantwort zu induzieren, findet aber in schwächerem Maße, als mit pOVA oder pli80-OVA statt. Dies entsprach auch der Beobachtung einer anderen Arbeit, dort war die Expansion der Th-Zellen nur halb so stark mit demselben Membrankonstrukt, pmOVA im Vergleich zum pOVA¹⁷⁴.

Die Zytokinproduktion innerhalb der proliferierten Th-Zellen glich dem der pOVA Immunisierung (Abb17), was bedeutet, dass die verstärkte Th1-Polarisierung nur nach pli80-OVA Immunisierung zu beobachten war, nicht jedoch mit den beiden anderen Antigenvektoren. Dies war somit ein Indiz dafür, dass die verstärkte Th1-Antwort nicht darauf zurückzuführen war, dass die Antigen-präsentierenden Zellen ausschließlich die direkt transfizierten sind, was wir auch schon durch die Immunisierung der MyD88-ko Mäuse für den CpG/TLR9-Signalweg gezeigt haben.

Eine mögliche Erklärung, warum pmOVA nicht auch zu einer verstärkten Th1-Zelldifferenzierung, wie pli80-OVA führte, könnte an dem Vorgang liegen, wie die Beladung der MHC-II-Moleküle mit Peptiden vonstatten geht. Durch die invariante Kette wird das Ovalbumin effizient in die Endosomen geschleust, wo es zu Peptiden abgebaut wird und dadurch verstärkt auf MHC-II-Moleküle geladen wird¹⁷⁸. Im Vergleich dazu gelangt das membran-Ovalbumin nicht in verstärktem Maße in die Endosomen, sondern unterliegt dem natürlichen Abbauprozess aller Membranproteine. Es wäre eine mögliche Erklärung, dass die Antigenpräsentation über MHC-II, in Folge der pli80-OVA Immunisierung derart verstärkt wird, dass dadurch eine hohe Antigenichte auf den APCs entsteht. Dass dies zu einer Th1-Antwort führt wurde schon mehrfach, in *in vitro* Experimenten durch T-Zellstimulation mit unterschiedlicher Antigenosis gezeigt^{38,171,179}. Um eine Aussage zu treffen, ob diese Hypothese wirklich zutrifft, wollten wir die Ova-Peptid präsentierenden APCs im Lymphknoten direkt detektieren.

6.3.4 Kein Nachweis der Peptid-präsentierenden Zellen möglich

Mögliche Ursachen, die für die Th1-Induktion nach pli80-OVA Immunisierung in Frage kamen, wie das Fehlen der B-Zellbeteiligung oder die Aktivierung der Th-Zellen durch ausschließlich direkt transfizierte APCs, die in besonderer Weise über CpG-Motive oder die Transfektion selbst aktiviert wurden, konnten bis hierher ausgeschlossen werden. Um die Ursache aber herauszufinden, wollten wir in diesem Experiment das "Problem" direkt angehen. Das bedeutet die für die Th-Zellaktivierung verantwortlichen APCs sollten direkt analysiert werden.

Zunächst sollte die Frequenz der APCs bestimmt werden, die das immunodominante Peptid präsentieren. Zudem sollte die Dichte der MHC-II/Peptid-Komplexe auf diesen Zellen analysiert werden, um so Rückschlüsse auf die Th1-Differenzierung zu ziehen. Um

die Detektion der MHC-II/Peptid-Komplexe zu verstärken, wurde die Liposomen-Färbetechnik angewandt.

Leider gelang es uns nicht, innerhalb der DC-Population der drainierenden Lymphknoten, Unterschiede in der Frequenz, sowie in der Expressionsstärke (MFI) des MHC-II/Peptid-Komplexes nachzuweisen. Eine Ursache hierfür, könnte in der Liposomen-Färbetechnik selbst liegen, da auch die Detektion unspezifisch gebundener Antikörper verstärkt wird und dadurch ein hoher "Background" entsteht. Es wäre denkbar, dass die geringe Zahl der positiven APCs innerhalb der unspezifisch positiven Population (Background) lag und dadurch praktisch überlagert wurde. Somit lässt sich auch erklären, warum die Messwerte nach der Immunisierung mit dem Leervektor und den Antigenvektoren auf vergleichbarem Niveau lagen.

Es konnte weder geklärt werden, ob sich die Frequenz der präsentierenden DCs nach pli80-OVA bzw. pOVA unterscheidet, oder die Anzahl der MHC-II/Peptid-Komplex pro DC unterschiedlich ist, noch ob sich diese DCs bezüglich Zytokinexpression oder kostimulatorischen Molekülen unterscheiden.

Ob eine erhöhte Anzahl der mit Peptid beladenen MHC-II-Moleküle eine mögliche Ursache für die verstärkte Th1-Polarisierung ist, bleibt eine zu klärende Frage.

6.4 Immunisierung mit pli80-OVA induziert CD4⁺ IFN γ -produzierende Memoryzellen

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 in ausreichender Zahl detektierbar sind. Ein möglicher Nachteil könnte die hohe Zahl an transferierten Th-Zellen sein, die fast alle einen transgenen TCR mit derselben Spezifität besitzen, da nur ein bestimmtes Peptid des Antigens erkannt wird. Dies entspricht nicht der physiologischen Situation während einer Immunantwort und ist so im Körper normalerweise nicht zu finden.

Bis vor einiger Zeit war die direkte Analyse antigenspezifischer Th-Zellen auf Einzelzellebene ohne den Zelltransfer so nicht durchführbar. Mit Hilfe einer kürzlich beschriebenen Methode ist es nun möglich antigenspezifische CD4⁺ Gedächtniszellen,

aufgrund ihrer CD154 (CD40L) Expression, direkt zu identifizieren und phänotypisch zu analysieren¹²⁸. Somit hatten wir erstmals die Möglichkeit alle endogenen, antigenspezifischen Th-Zellen, nach DNA Immunisierung zu analysieren.

Nach DNA Immunisierung mit pli80-OVA, pOVA und pmOVA sollte die Frequenz der antigenspezifischen Th-Zellen verglichen, und gleichzeitig sollte anhand der IFN γ Expression untersucht werden, wie sich die Th-Zellpolarisierung der Gedächtniszellen unterscheidet.

Wir konnten antigenspezifische Gedächtniszellen nur nach pli80-OVA und pmOVA Immunisierung nachweisen, wobei die Frequenz nach pmOVA geringer ausfiel. Nach pOVA Immunisierung war jedoch kein Nachweis möglich. Dies ließ den Schluss zu, dass die Genegun Immunisierung mit pOVA zu schwach war, um eine detektierbare Frequenz an antigenspezifischen Gedächtniszellen zu induzieren. Da wir in pOVA immunisierten Tieren antigenspezifische Antikörper nachweisen konnten (Abb11) und für die B-Zellaktivierung und damit verbundene Antikörperproduktion eine T-Zellhilfe benötigt wird, können wir davon ausgehen, dass antigenspezifische Th-Zellen vorhanden sind, wir sie nur nicht detektieren konnten.

Die vermehrte Bildung von Gedächtniszellen mit pli80-OVA, könnte auf zweierlei Mechanismen zurückzuführen sein. Zum einen könnten durch die verstärkte Antigenpräsentation über die MHC-II-Moleküle insgesamt mehr spezifische Zellen generiert werden. Andererseits könnte dies auch auf eine erhöhte Expansion oder ein besseres Überleben der spezifischen Zellen zurückzuführen sein.

Der Vorgang der APC-Transfektion bei der Genegun Immunisierung könnte bestimmte Signale induzieren, die womöglich antiapoptotisch auf die Th-Zellen wirken. Solche Signale könnten dadurch eine verstärkte Expansion der Th-Zellen auslösen oder dazu führen, dass mehr Zellen überleben. Die Identifikation und Analyse derartiger Signale oder Signalmoleküle wurde durch direkte Färbung der Peptid präsentierenden APCs versucht. Es ließen sich jedoch keine spezifisch angefärbten Zellen nachweisen. Möglicherweise war die Anzahl von MHCII-Peptid-Komplexen pro APC zu gering.

Die Bildung mehr spezifischer Gedächtniszellen wäre auch durch folgenden Mechanismus denkbar: Während der Prozessierung der Antigene in den Endosomen, entstehen verschiedene Peptide mit unterschiedlicher Affinität zur Bindungsfurche des MHC-II-Moleküls. Folglich gibt es hochaffine und niedrigaffine Peptide. Durch die Fusion der li80-Sequenz ans Ovalbumin wird dieses effizient in den MHC-II-Beladungsweg der Endosomen geschleust. Dadurch erhöht sich die Konzentration an Ova-Peptiden, sowohl

der niedrigaffinen als auch der hochaffinen, in den Endosomen. Folglich werden die MHC-II-Moleküle vermehrt mit diesen beladen¹²⁰. Somit wird nicht nur die Antigenpräsentation der hochaffinen Peptide, sondern auch die der niedrigaffinen verstärkt¹⁸⁰. Das könnte wiederum dazu führen, dass nicht nur verstärkt die Th-Zellen aktiviert werden, die für hochaffine Peptide spezifisch sind, sondern auch die, die für niedrigaffine Peptide spezifisch sind¹⁸¹. Dadurch könnten zusätzliche Gedächtniszellpopulationen generiert werden, wodurch die höhere Frequenz nach pli80-OVA, im Vergleich zu pmOVA erklärbar wäre.

Wiederholt fanden wir eine erhöhte Frequenz der IFN γ Produzenten innerhalb der Gedächtniszellen nach pli80-OVA, im Vergleich zu den anderen Antigenvektoren. Auch andere Arbeiten zeigen, dass eine Immunantwort durch den Einsatz der invarianten Kette, bei der nur das CLIP-Fragment durch ein Antigenpeptid ersetzt wird, ebenfalls verstärkt werden kann^{123,178,182}. Hierbei wurde jedoch weder eine Th1-Polarisierung, noch die Entstehung von Gedächtniszellen beschrieben.

Die Bildung langlebiger Gedächtniszellen ist das generelle Ziel einer effizienten Vakzinierung. Hierin liegt das therapeutische Potential von pli80-OVA, durch die Induktion einer verhältnismäßig großen Population antigenspezifischer CD4⁺ Gedächtniszellen, könnte dieser Vektor sehr gut bei Impfungen zum Einsatz kommen.

6.6 DTH-Reaktion als Th1 vermittelte Entzündungsreaktion

Die DTH-Reaktion (*Delayed Type Hypersensitivity Reaction*) ist eine Th1-vermittelte Entzündungsreaktion. Im Tiermodell kann diese Reaktion, zum Test für die Stärke einer Th1-Antwort, entweder in der Fußsohle oder im Ohr, induziert werden. Dabei wird eine lokale Entzündungsreaktion, vor allem durch spezifische CD4⁺ T-Zellen vom Th1-Typ, die in den Ort der Antigenpräsentation einwandern, ausgelöst. Die eingewanderten Th1-Zellen erkennen das ihnen, durch APCs, präsentierte Antigen und sezernieren daraufhin proinflammatorische Zytokine, wie z. B. IFN γ oder TNF α . Als Folge kommt es zu einer mehr oder weniger starken lokalen Schwellung des Gewebes, die als Maß für die Stärke der Entzündung gilt.

Im DTH-Tiermodell sollte untersucht werden, ob die durch pli80-OVA Immunisierung generierten Th1-Zellen, auch funktionell in der Lage sind eine starke Entzündungsreaktion zu vermitteln.

Die Induktion der DTH-Reaktion wird durch Injektion der Antigen/IFA-Emulsion in die Fußsohle vorgenommen. Es tritt eine Schwellung auf, die für gewöhnlich 24 Stunden nach Induktion am größten ist und danach abnimmt. Die unter Punkt 3.5.1 beschriebenen Ergebnisse der DTH-Experiments konnten in Wiederholungsexperimenten nicht bestätigt werden, da die Induktion, d. h. die Schwellung nach 24 Stunden, nicht erfolgreich war. Somit ist dieses Ergebnis nur ein erster Hinweis darauf, inwiefern die antigenspezifischen Th-Zellen eine Entzündungsreaktion vermitteln können. Überraschend war, dass wir nach pli80-OVA Immunisierung keine anhaltende Schwellung und somit keine lokale Entzündungsreaktion beobachteten. Im Vergleich dazu hielt die Schwellung nach pOVA Immunisierung über mehrere Tage an und ließ nur langsam nach. Dies entsprach nicht den Erwartungen, da pli80-OVA eine starke Th1-Polarisierung, gekennzeichnet durch erhöhte IFN γ Produktion, induziert. Möglicherweise könnte das Ausbleiben der Entzündungsreaktion mit pli80-OVA an der starken IFN γ Produktion selbst liegen. Es gibt Untersuchungen zur Rolle von IFN γ in Entzündungsprozessen, nach denen IFN γ in einer Th1-vermittelten Entzündungsreaktion selbst limitierend wirkt und dafür verantwortlich ist, dass die Entzündung und die damit verbundenen Schwellung wieder zurückgehen¹⁸³. Da die IFN γ Produktion mit pli80-OVA viel stärker ist, als mit pOVA, könnte dies zu einer schnelleren Abnahme der Schwellung führen.

Ein weiterer Unterschied zwischen der pli80-OVA und der pOVA Immunisierung ist das Ausbleiben einer B-Zellbeteiligung mit pli80-OVA. Demnach müsste die Rolle der B-Zellen bei der DTH-Reaktion untersucht werden. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass Antikörper die Initiierung der DTH-Reaktion vermitteln und die Rekrutierung der Th-Zellen an den Ort der Entzündung bewirken¹⁸⁴. Dies macht deutlich, dass B-Zellen bei einer DTH-Reaktion eine Rolle spielen können und würde die Schwellung nach pOVA erklären. Durch Injektion von Proteinantigen/IFA-Emulsion in die Fußsohle B-Zell-defizienter Mäuse sollte die B-Zellbeteiligung untersucht werden, eine Aussage war jedoch aufgrund des Ausbleibens der DTH-Induktion bzw. der Fußsohlenschwellung nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

Beide Erklärungen sind nur Vermutungen, da noch nicht klar ist, ob dieses Ergebnis reproduzierbar ist.

Eine mögliche Ursache für das wiederholte Ausbleiben der DTH-Induktion könnte daran liegen, dass die DNA Immunisierung insgesamt zu schwach war und die aktivierten Th-Zellen nicht effektiv genug sind eine Entzündungsreaktion auszulösen.

6.8 Ausblick

Als Schlussfolgerung aus den vorangegangenen Experimenten können wir somit sagen, dass die Verwendung von pli80-OVA für Koimmunisierungen mit dem Ziel eine Th2-Antwort zu begünstigen und eine Th1-Antwort zu hemmen, höchstwahrscheinlich ungeeignet ist.

Der pli80-OVA Vektor könnte jedoch in Vakzinierungsstudien therapeutisch zum Einsatz kommen, mit dem Ziel, eine schützende Immunantwort zu induzieren, da verstärkt die Bildung von Gedächtniszellen hervorgerufen wird.

Die stark Th1-Differenzierung induzierende Wirkung des pli80-OVA könnte bei der Behandlung allergischer Reaktionen zum Einsatz kommen. Bei Allergien werden u. a. Th2-Zellen gebildet, die B-Zellen aktivieren und diese zur IgE-Antikörperproduktion veranlassen. Solch einer Th2-Zellbildung könnte, durch Verabreichung des pli80-OVA gezielt entgegengewirkt werden und somit versucht werden die allergische Reaktion zu schwächen, zusätzlich würden idealer Weise B-Zellen gar nicht aktiviert werden. Hierzu konnte von *Toda et. al.*¹²⁴ gezeigt werden, dass durch DNA Immunisierung mit einem Plasmid bei dem das CLIP-Fragment der invarianten Kette, durch das Peptid eines Pollenallergens ersetzt wurde, die antigenspezifische IgE-Antikörperproduktion inhibiert wurde. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Th-Zelldifferenzierung nicht ausreichend charakterisiert.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Sarah Howie in Edinburg wurden biodegradable Partikel mit pli80-OVA beladen und diese in einem Allergie-Mausmodell zur Immunisierung benutzt. Erste Ergebnisse waren viel versprechend und zeigten einen Rückgang der allergischen Symptome (Abb26C). Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig, um Aufschluss über die DNA Immunisierung mit pli80-OVA als Therapie in Th2-vermittelten Erkrankungen zu erhalten.