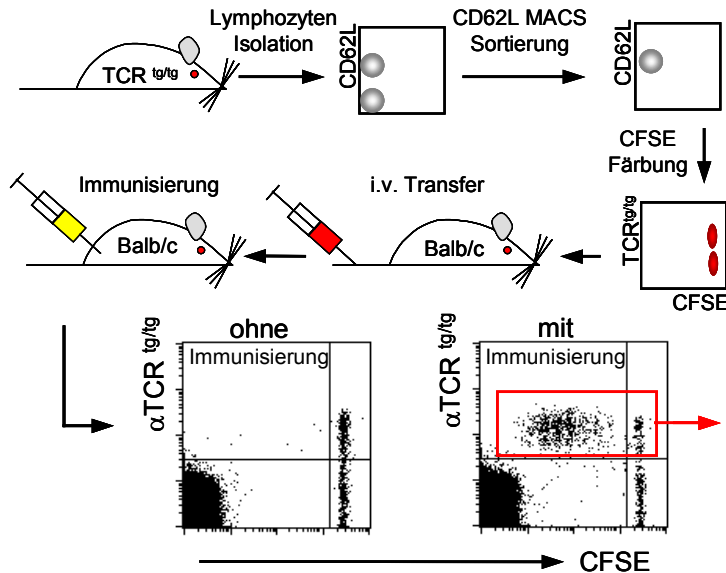


## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Analyse der spezifischen Th-Zellantwort ex vivo

#### 3.1.1 Zelltransfer und ex vivo Analyse

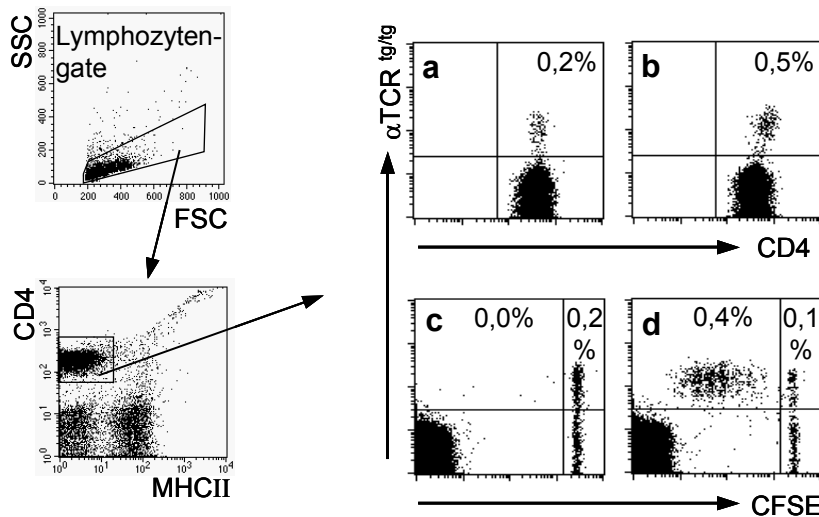
Um die spezifische Th-Zellreaktion *in vivo* im Detail analysieren zu können, wurde der von *Jenkins et al.* beschriebenen Zelltransfer in abgewandelter Form benutzt. Dazu wurden Lymphozyten (siehe Material und Methoden) aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen isoliert. Diese Mäuse sind transgen für den  $\alpha/\beta$ -TCR des T-Zellhybridoms DO11.10, der das Peptid323-339 des Ovalbumins des Huhns (OVA) erkennt, so es von dem I-Ad Klasse II MHC Molekül präsentiert wird. Circa 60-80% der Th-Zellen aus diesen Tieren tragen diesen T-Zellrezeptor. Zellen, die diesen Rezeptor tragen, lassen sich durch den klonotypspezifischen Antikörper KJ1-26 anfärben.



**Abb. 2: Zelltransfer und ex vivo Analyse spezifischer Th-Zellen**

Die isolierten Lymphozyten wurden nach einer Erythrozytenlyse mit CFSE gefärbt. Dann wurden  $4-8 \cdot 10^6$  dieser Zellen ( $\Rightarrow \sim 1-2 \cdot 10^6$  transgene Th-Zellen) intravenös in Rezipientenmäuse injiziert. Rezipienten- und Donortiere hatten den selben genetischen Hintergrund, wodurch eine Abstoßungsreaktion vermieden wird [194;195]. In den so

behandelten Rezipienten wurde auf diese Weise die Zahl der spezifischen Th-Zellen auf etwa 0,1-0-2% der gesamten Th-Zellpopulation erhöht. Damit war es möglich, die spezifische Th-Zellreaktion auf Einzelzellebene nach einfacher Immunisierung zu analysieren (Abb. 2). Gleichzeitig war die Frequenz der Zellen niedrig genug, um eine einigermaßen „natürliche“ Immunantwort zu gewährleisten [196].



**Abb. 3: CFSE Färbung ermöglicht detaillierte Analyse der spezifischen Th- Zellen**

Balb/c Mäusen wurden, wie im Text beschrieben, etwa  $5 \cdot 10^6$  CFSE gefärbte Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen intravenös injiziert. Dann wurde den Tieren CFA+Ovalbumin (50µg) Emulsion subkutan am Schwanzansatz injiziert (b bzw. d). Kontrolltiere blieben ohne Immunisierung (a bzw. c). Nach 5 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen, gefärbt und direkt im FACS Calibur analysiert. a und c bzw. b und d zeigen jeweils die selben Zellen.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Analyse eines solchen Experimentes und macht den Vorteil der CFSE Färbung deutlich. In Plot a ist die Frequenz der OVA-spezifischen Th-Zellen nach einem Transfer ohne Immunisierung abzulesen: hier 0,2%. Im Vergleich dazu sind in Plot b Th-Zellen aus einem Tier abgebildet, welches mit Ovalbumin+CFA immunisiert wurde. Der Erfolg der Immunisierung lässt sich an zweierlei Beobachtungen ablesen. Zum einen exprimieren die spezifischen Zellen nach Immunisierung das CD4 Molekül stärker und zum anderen ist deren Frequenz auf 0,5% gestiegen. Beide Beobachtungen sind aber nur begrenzt aussagekräftig: Zum einen nimmt die Expression des CD4 Moleküls nach einer gewissen Zeit wieder ab und zum anderen kann die Anzahl der erfolgreich transferierten Zellen von Tier zu Tier stark variieren.

In Plot c&d sind die selben Zellen wie in a&b abgebildet. Statt gegen CD4 ist die Färbung des transgenen T-Zellrezeptors hier aber gegen die CFSE Färbung aufgetragen.

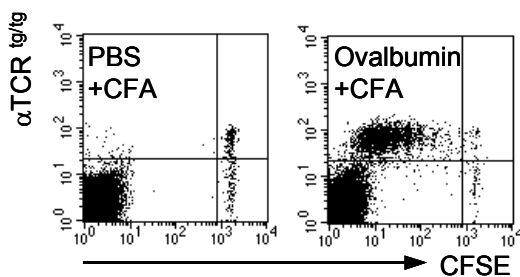
Zellen im Quadranten unten links sind nicht CFSE gefärbte Th-Zellen des Rezipienten. Zellen in den beiden rechten Quadranten sind transferierte, CFSE gefärbte Th-Zellen. Zellen, die sich im Quadranten oben links befinden, sind spezifische Th-Zellen, die sich mehrmals geteilt haben. Sichtbar wird dies durch ihre im Vergleich zur Ausgangspopulation abnehmende CFSE Färbung.

Die CFSE Färbung ermöglicht also eine klare Unterscheidung von proliferierten und nicht proliferierten Zellen. Dadurch kann der Erfolg einer Immunisierung deutlich sensitiver und zuverlässiger ermittelt werden.

### 3.1.2 Th-Zellantwort ist spezifisch

Um die Spezifität der Th-Zellantwort zu testen, wurden Balb/c Mäusen wie oben beschrieben Lymphozyten transferiert. 12h später wurde den Tieren eine CFA/PBS Emulsion mit oder ohne Ovalbumin s.c. injiziert. Nach 5 Tagen wurden Lymphozyten aus den drainierenden Lymphknoten isoliert und analysiert. Wie aus der Abbildung 4 ersichtlich, proliferierten von den transferierten Th-Zellen ausschließlich die OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Zellen. Die ebenfalls transferierten Th-Zellen, die aber nicht den transgenen T-Zellrezeptor trugen, zeigten keinerlei Proliferation. Ebenso war auch keinerlei Zellteilung zu beobachten, wenn kein Ovalbumin vorhanden war.

Es gab also trotz der starken Stimulation durch CFA keine unspezifische Proliferation.



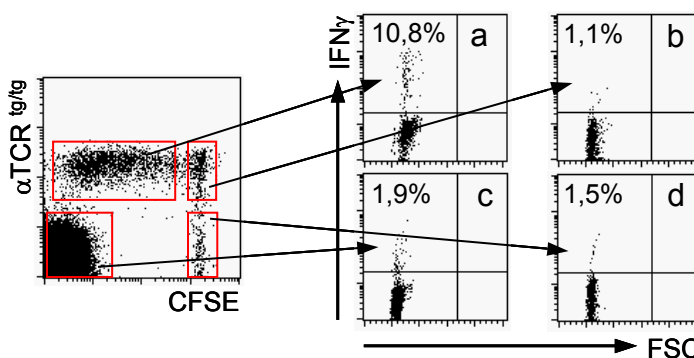
**Abb. 4: Spezifität der Th-Zellreaktion *in vivo***

Balb/c Mäusen wurden wie in Abbildung 3 behandelt. Statt der Kontrolle ohne Immunisierung wurde den Kontrolltieren eine CFA+PBS Emulsion injiziert.

### 3.1.3 Analyse der Zytokinproduzenten nach Immunisierung

Wie in der Einleitung beschrieben, ging es in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig um Polarisierung von Th-Zellen. Abbildung 5 zeigt exemplarisch welche Zellpopulation herangezogen wurden, um die im weiteren Verlauf dieser Arbeit vielfach gezeigten Frequenzen der Zytokinproduzenten zu ermitteln. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Prozentzahlen an Zytokinproduzenten auf die Zellen, die Plot a entsprechen, also diejenigen transferierten Th-Zellen, die spezifisch sind (OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> positiv) und auf eine Immunisierung mit Proliferation reagiert haben.

Die % Zytokinproduzenten der Zellen in Plot b, c und d änderten sich bei praktisch allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen kaum (Ausnahme 3.3.5) und lagen immer im Rahmen der für naive Balb/c Mäuse zu erwartenden Werte.



**Abb. 5: Analyse des Zytokinprofils der spezifischen Th-Zellen**

Balb/c Mäusen wurden 5 Tage nach Zelltransfer und Immunisierung (vgl. Abb. 2) die drainierenden Lymphknoten entnommen. CD4 Zellen wurden mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) aufgereinigt, 4 h mit PMA/Ionomycin restimuliert und mit Formaldehyd fixiert. Dann wurden die Zellen intrazellulär gefärbt und analysiert. In a-d sind jeweils etwa gleich viele Zellen angezeigt.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte der % Zytokinproduzenten der Th-Zellen wurden aus Zellen bestimmt, die direkt *ex vivo* für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert worden waren. Diese Restimulation war nötig, da die Zellen direkt *ex vivo* zu wenig Zytokine produzierten, um eine zuverlässige Aussage über ihre Polarisierung machen zu können (Daten nicht gezeigt). Die Restimulation mit PMA/Ionomycin hatte gegenüber der mit Ovalbumin, die alternativ möglich gewesen wäre, den Vorteil, unabhängig von APC zu sein. Die Verhältnisse an % Produzenten verschiedener Zytokine ändert sich kaum in Abhängigkeit der Restimulationsart (Daten nicht gezeigt), wobei die Werte nach

PMA/Ionomycin Stimulation absolut höher sind als nach Antigenstimulation (Daten nicht gezeigt + [187]).

### **3.2 Etablierung der DNA Immunisierung**

#### **3.2.1 DNA Immunisierungsrouten**

Mit dem vorgestellten Transfersystem wurde nun die spezifische Th-Zellantwort nach DNA Immunisierung untersucht. Da wenig über die unmittelbare Reaktion spez. Th-Zellen auf verschiedene DNA-Immunisierungen bekannt war, wurden zunächst verschiedene Routen im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Th-Zellproliferation zu induzieren, untersucht. Von den zahlreichen publizierten Methoden DNA zu applizieren (i.e. intramuskuläre, intradermale, intravenöse, intraperitoneale, epidermale mittels Hautschürfung, orale, intranasale und vaginale Gabe; Überblick: [122]), ist die am häufigsten verwendete Route die intramuskuläre Injektion. Zwei weitere häufig verwendete Routen sind Nadelinjektion in die Haut und die sogenannte GeneGun Immunisierung. Wir haben uns entschieden diese Routen zu testen, da zu ihnen die meisten Daten vorliegen, und ihre Funktionalität vielfach gezeigt wurde.

##### **3.2.1.1 Th-Zellantwort nach GeneGun Immunisierung stärker als nach intramuskulärer Applikation**

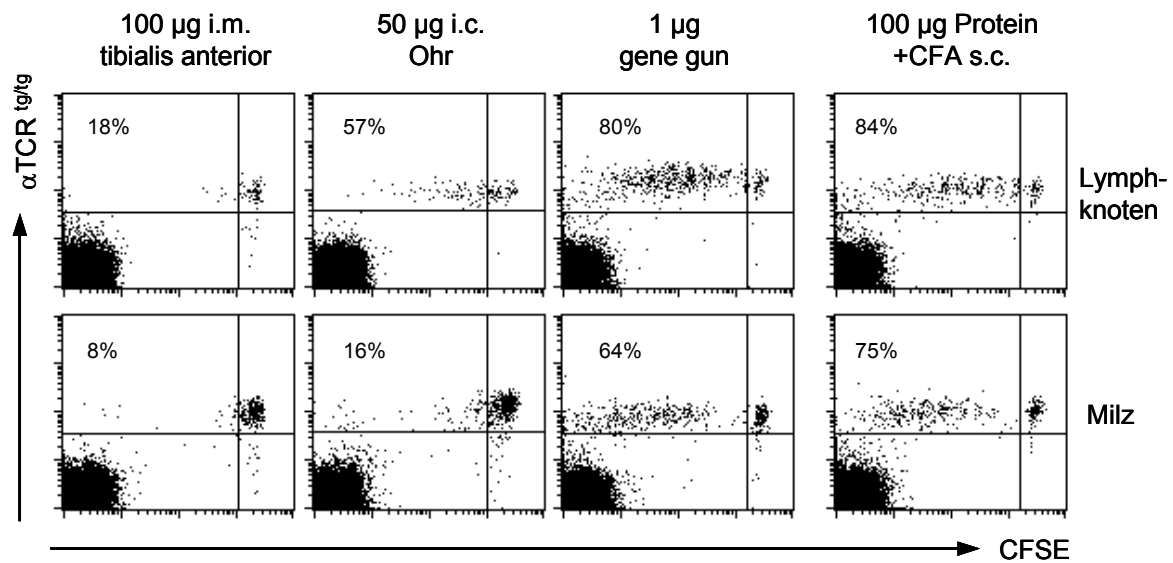
Aus den unter 3.1.1 erläuterten Gründen wurden zur Analyse der spezifischen Th-Zellantwort nach verschiedenen Immunisierungen Balb/c Mäuse verwendet, die am Tag vorher CFSE gefärbte Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen erhalten hatten. Um eine möglichst geringe Aktivierungsschwelle der Zellen sicherzustellen, wurden in diesen ersten Experimenten Zellen transferiert, die eine Woche vor dem Transfer *in vitro* stimuliert worden waren. Zum Zeitpunkt des Transfers befanden sich die Zellen dann wieder in einem ruhenden Zustand (Daten nicht gezeigt). Somit war zum einen sichergestellt, dass die Zellen in die drainierenden Lymphknoten einwandern konnten, zum anderen sollten die Zellen auch auf einen schwachen Stimulus mit Expansion reagieren. Die so behandelten Tiere wurden folgendermaßen immunisiert:

- Als positiv Kontrolle wurden Tiere mit 100µg Ovalbumin in CFA [1µg/µl] subkutan immunisiert.
- Des Weiteren wurden Mäuse intramuskulär 100µg pCMV-OvaP [2µg/µl] injiziert.

-- Einer weiteren Gruppe injizierten wir 50µg pCMV-OvaP [2µg/µl] in die Haut der Ohren. Diese Immunisierungsart wurde als intradermale Route beschrieben. Nach unseren Erfahrungen kann aber auf Grund der zu geringen Hautdicke der Ohrhaut von Balb/c Mäusen nicht sicher davon ausgegangen werden, dass sich die DNA nach einer solchen Applikation tatsächlich in der Haut befindet. Es handelt sich vielmehr in unseren Augen um eine zum Teil intradermale und zum Teil subkutane lokalisierte Gabe.

-- Eine sicher intradermale Route ist die Immunisierung mittels „Gene Gun“, auch als „particle mediated DNA delivery/vaccination (PMDD) [197] bezeichnet. Hierfür wurden Mäuse am Abdomen mit einem Elektrorasierer enthaart. Dann wurden die Tiere mittels Heliumdruck mit Goldpartikeln beschossen. Die Goldpartikel befanden sich hauptsächlich in der die Epidermis, teils in der Dermis (Daten nicht gezeigt). Die Partikel waren mit pCMV-OvaP beladen, wobei pro Schuss ca. 1µg Plasmid DNA appliziert wurde. Die Tiere erhielten zwei sich nicht überlappende Schüsse.

Den immunisierten Mäuse wurden nach vier Tagen Milz und Lymphknoten entnommen, wobei die Organe von 3-4 Tieren gepoolt wurden. Die Lymphozyten wurden isoliert, gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert (vgl. 3.1.1).



**Abb. 6: Test verschiedener Immunisierungsrouten**

Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen wurden in vitro durch Zugabe von OVA-Peptid stimuliert. Nach 5-7 Tagen wurden die lebendigen Zellen mit CFSE gefärbt.  $1-2 \cdot 10^6$  dieser Zellen wurden in Rezipiententiere transferiert. Die Tiere wurden wie im Text beschrieben immunisiert. Nach 4-7 Tagen wurden die peripheren Lymphknoten und die Milz entnommen, die Zellen gefärbt und im FACS analysiert. Angezeigt werden CD4 positive Lymphozyten. Pro Gruppe wurden 3 Tiere gepoolt. Die Prozentzahlen beziehen sich nur auf die OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Zellen im Quadranten oben links.

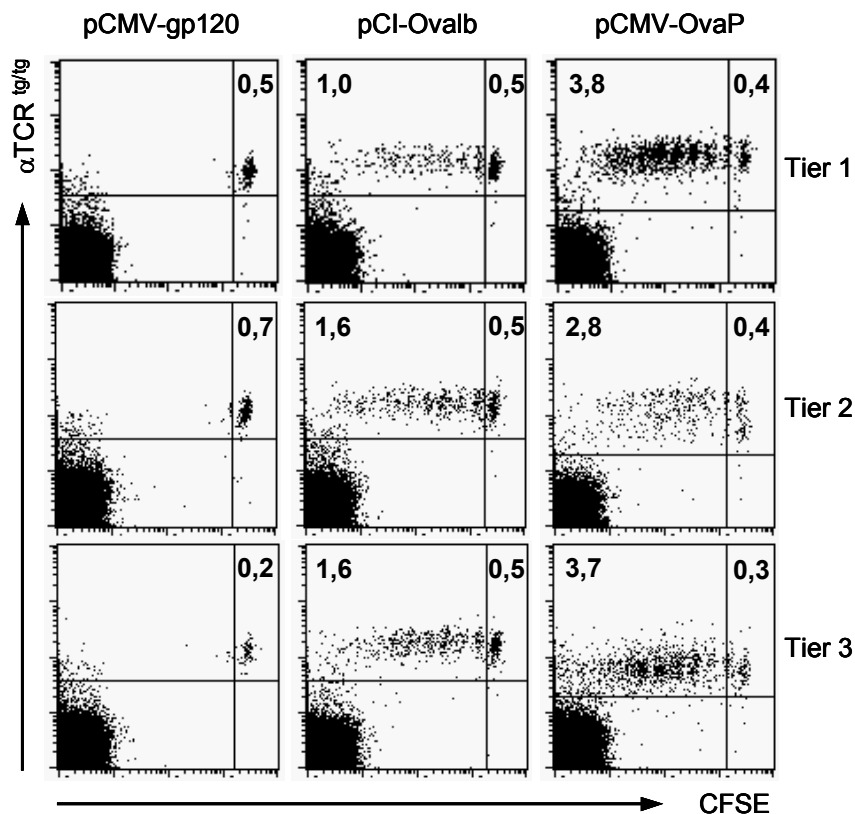
Nach Immunisierung mit Protein reagierten die spezifischen Zellen erwartungsgemäß stark. So waren 84% der spez. Th-Zellen in den drainierenden Lymphknoten Zellen die sich geteilt hatten (Abb. 6). Ein ähnlicher Wert von 75% proliferierte Th-Zellen fand sich in der Milz. Von den drei getesteten DNA Immunisierungen führte die Immunisierung mit der GeneGun zur stärksten Reaktion der spez. Th-Zellen. Mit 80% proliferierter Th-Zellen in den drainierenden Lymphknoten und 64% in der Milz waren die Werte vergleichbar mit denen der bekanntermaßen starken Protein/CFA Immunisierung. Damit bestätigen wir Daten von *Creusot et al.* [196]. Die Injektion der DNA in die Haut der Ohren resultierte in einer zwar noch sichtbaren, aber mit 57% proliferierten Th-Zellen deutlich geringeren Th-Zellreaktion. Diese schwache Reaktion spiegelte sich nicht nur in den Prozentzahlen wieder, sondern auch in der Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen. Überraschenderweise konnten wir kaum Proliferation der spezifischen Th-Zellen nach intramuskulärer DNA Injektion detektieren (Abb. 6), obwohl wir vier unabhängigen Experimente, bei denen jeweils 4 - 5 Tiere analysiert wurden, durchführten. Dies war eine unerwartete Beobachtung, da es keine Hinweise gibt, dass die Th-Zellantwort nach intramuskulärer DNA Immunisierung beeinträchtigt wäre. Auch werden nach i.m. Immunisierung normale Antikörpertiter gefunden.

Die Immunisierung mittels GeneGun stellte sich somit im Bezug auf T-Zellreaktion als die stärkste der getesteten DNA Immunisierungen heraus. Da sie zusätzlich auch noch die geringsten DNA Mengen benötigte und damit potentielle Probleme durch Endotoxine und ungewollte CpG Effekte minimierte, entschieden wir, uns im Folgenden auf diese Route zu beschränken.

### 3.2.1.2 Sowohl Peptid- als auch Proteinvektor erzeugen eine gut reproduzierbare und spezifische Th-Zellantwort

Nun galt es die Frage zu klären, wie gut reproduzierbar und wie spezifisch die GeneGun Immunisierung war. Für die Etablierung der Immunisierungsrouten wurde der pCMV-OvaP Vektor eingesetzt, der auf Sekretion des Peptidkonstrukts optimiert ist. Da aber im Rahmen dieser Arbeit auch die Antikörpertiter nach DNA Immunisierungen von Interesse waren, und der Peptidvektor nur das wichtigste Th-Zellepitop, nicht aber das haupt-B-Zellepitop kodierte, sollte zusätzlich getestet werden, ob ein Ovalbumin kodierender Vektor ebenfalls in unserem *in vivo* System funktionierte. Zu diesem Zweck wurden wie unter 3.2.2.1 behandelte Tiere mit a) dem pCI-Ovalb Plasmid, welches das komplette Ovalbumin codiert, b) dem pCMV-OvaP Plasmid, welches das OVA-Peptid codiert und c) einem CMV basierten Vektor, der das irrelevante Protein gp120 codiert immunisiert. Um die Reproduzierbarkeit der Immunisierungen zu testen, wurden die Lymphozyten der einzelnen Tiere innerhalb einer Gruppe getrennt analysiert.





**Abb. 7: Reproduzierbarkeit der GeneGun Immunisierung**

Balb/c Mäusen wurden analog Abb. 6 voraktivierte, CFSE gefärbte Zellen transferiert, die Tiere wurden mittels GeneGun und den angegebenen Vektoren immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert, die Zellen gefärbt und analysiert. Angezeigt sind CD4 positive Lymphozyten. Die Zahlen geben die Prozente aller gezeigten Zellen im entsprechenden Quadranten wieder.

Die GeneGun Immunisierung erwies sich im Bezug auf die Initiierung der Th-Zellproliferation als sehr gut reproduzierbar (Abb. 7, mittlere und rechte Spalte). Alle mit Hilfe der GeneGun Immunisierten Tiere zeigten deutliche Proliferation der spez. Th-Zellen, was zeigt, dass jede einzelne Immunisierung erfolgreich war. Dies galt sowohl für Immunisierungen mit dem Vektor, der das komplette Ovalbumin codierte (~ 2-3 fache Expansion der spez. Th-Zellen), als auch für Immunisierungen mit dem Vektor, der nur das OVA-Peptid codierte (~ 7-12 fach). Im Rahmen weiterer GeneGun Immunisierungen mit pCI-Ovalb und pCMV-OvaP ergab sich, dass die Proliferation der Th-Zellen nach Immunisierung mit pCMV-OvaP einige Stunden eher einsetzte, und ~10% mehr Zellen anfangen sich zu teilen als nach pCI-Ovalb Immunisierung (Daten nicht gezeigt).

Die GeneGun Immunisierung erwies sich ebenfalls als spezifisch. Die immunstimulatorische Wirkung der bakteriellen Plasmid DNA, plus der lokalen Aktivierung der dendritischen Zellen durch den Beschuss mit den Goldpartikeln, plus die Anwesenheit des

irrelevanten Antigen gp120 reichte nicht aus, die spezifischen Th-Zellen zur Zellteilung anzuregen (Abb. 7 linke Spalte).

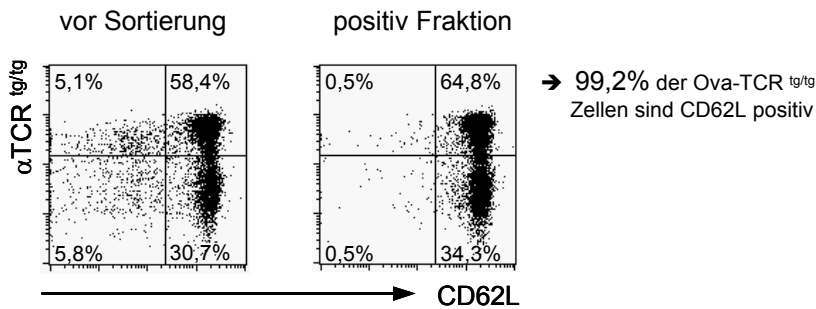
Die Stärke der Th-Zellproliferation nach GeneGun Immunisierung variierte leicht, aber auf hohem Niveau (Abb. 7, vgl. Abb. 6). Dabei lösten die beiden getesteten Antigenvektoren eine vergleichbar starke Reaktion aus. Es machte also keinen wesentlichen Unterschied, ob nur das Epitop 323-339 des Ovalbumins oder das komplette Ovalbumin exprimiert wurde.

Da im Folgenden neben der Th-Zellreaktion auch der Einfluss verschiedener DNA Koimmunisierungen auf die Antikörpertiter untersucht werden sollte, B-Zellen aber ein anderes Epitop des Ovalbumins nutzen, beschränkten wir uns in den weiteren Versuchen auf pCI-Ovalb als Antigenvektor.

#### 3.2.2 Charakterisierung der Th-Zellantwort nach GeneGun Immunisierung

##### 3.2.2.1 Isolation antigenunerfahrener Lymphozyten

In den folgenden Experimenten wurden „naiv“ sortierte Zellen eingesetzt. Daher sei hier kurz eine solche CD62L „naiv“ Sortierung exemplarisch dargestellt. Diese wurde durchgeführt um sicherzustellen, dass keine Effektorzellen, die bereits ein Zytokinedächtnis ausgeprägt haben [198], transferiert wurden. Hierzu wurden die Lymphozyten aus den transgenen Mäusen nach der Erythrozytenlyse mittels magnetischer Zellsortierung mit CD62L direkt-Beads sortiert. Die Reinheit der Sortierung wurde in einer Kontrollfärbung überprüft. CD62L ist für das „homing“ von Th-Zellen in den Lymphknoten verantwortlich und auf naiven Th-Zellen stark exprimiert. Abbildung 8 zeigt ein typisches Ergebnis einer CD62L<sup>+</sup> Sortierung. Wurden sortierte Zellen eingesetzt, geschah dies nur, wenn unter den so erhaltenen CD62L<sup>+</sup> Zellen die spezifischen Th-Zellen zu >98% CD62L<sup>+</sup> (hier 99,2%) waren. Auf diese Weise sortierte Th-Zellen produzieren keine Effektorzytokine *in vitro* [187]. Der naive Status der sortierten Zellen zeigte sich auch *in vivo* in der Abwesenheit der Produktion der Effektorzytokine IFN $\gamma$  und IL-4 in denjenigen Zellen, die an den Tagen 0, 1 und 2 nach Immunisierung aus den Empfängertieren isoliert wurden (vgl. Abb. 10).



**Abb. 8: Durchflusszytometrische Kontrolle der CD62L MACS Sortierung**

Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen wurden unter Einsatz von CD62L direkt Beads und LS-Säulen sortiert. Vor und nach der Sortierung wurde jeweils ein Aliquot abgenommen, mit  $\alpha$ CD62L Antikörper gefärbt, und im FACS analysiert. Angezeigt werden nur CD4 positive Zellen.

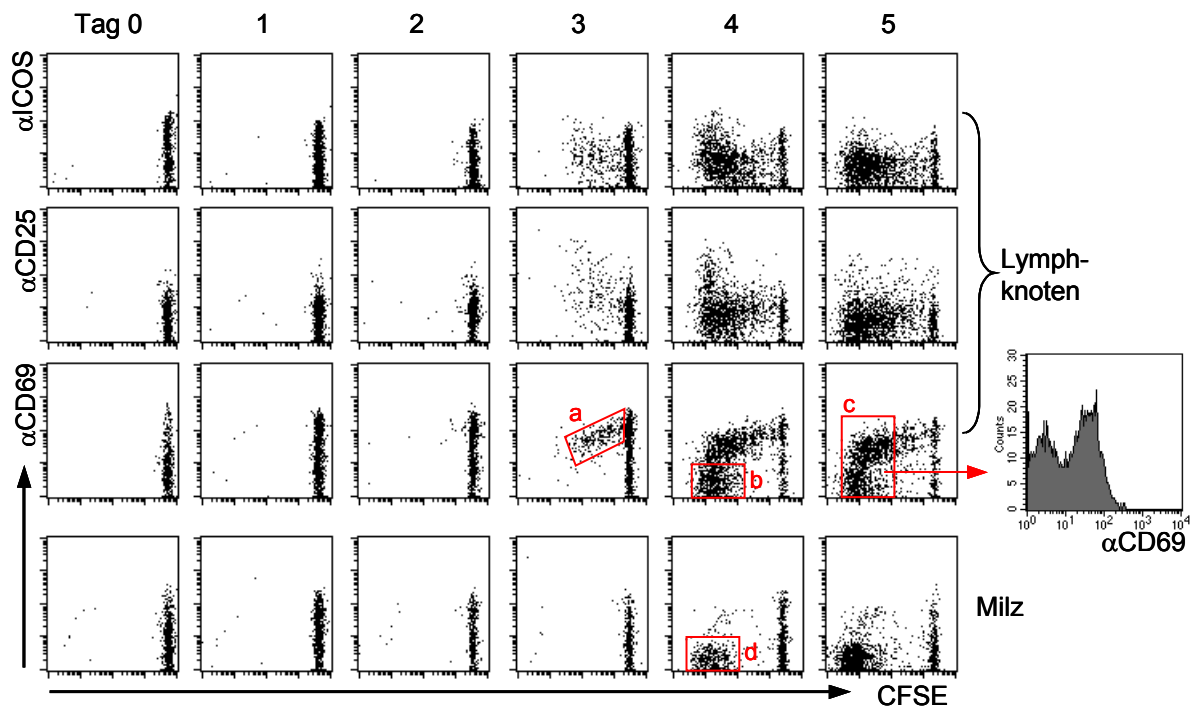
### 3.2.2.2 Kinetik und Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker nach GeneGun Immunisierung

Im ersten Teil der Charakterisierung sollte anhand einer Kinetik bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt die spezifischen Th-Zellen mit welchen aktivierungsabhängigen Merkmalen reagieren. Hierzu wurden einer Gruppe von Mäusen am Tag -1 „naïve“ Th-Zellen transferiert. Am Tag 0 wurden diese Tiere mittels GeneGun mit dem pCI-Ovalb Vektor immunisiert. Dann wurden alle 24h einer Gruppe Mäuse jeweils Milz und periphere Lymphknoten entnommen und direkt *ex vivo* analysiert. Die Zellen am Tag 0 wurden vor der Immunisierung entnommen. Es wurden jeweils Zellen von 3-4 Tieren gepoolt. Die Plots in Abbildung 9 zeigen nur OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> positive Th-Zellen.

Wie aus Abbildung 9 deutlich wird, exprimierten die spezifischen Th-Zellen am Tag 0 bereits die aktivierungsabhängigen Moleküle CD69 und ICOS stark. Naïve Th-Zellen sind CD69 und ICOS negativ (Daten nicht gezeigt). Da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch keine Immunisierung erhalten hatten, musste es sich bei dieser Aktivierung um einen unspezifischen Vorgang im Rahmen des Transfers handeln. Da diese Aktivierung jedoch nicht ausreichte, um die Zellen zur Proliferation zu bringen (vgl. Abb. 12), stellte sie kein Problem für die weiteren Fragestellungen dar.

Die erste Zellteilungen traten zwischen Tag 2 und Tag 3 auf. Zieht man *in vitro* Daten zur Th-Zellproliferation nach Antigenpräsentation als Basis zur Bestimmung der Zeit zwischen Antigenpräsentation und der ersten Zellteilung heran, so ergibt sich die erste Antigenpräsentation durch APCs nach etwa 24h. Eine starke Expansion der Zellen war ab Tag

3 zu beobachten. Im Vergleich mit einer CFA/Protein Immunisierung ist die Kinetik nach DNA Immunisierung somit um etwa  $\frac{1}{2}$  bis 1 Tag nach hinten verschoben (Daten nicht gezeigt + [194]). Dabei unterschieden sich die Th-Zellen nach DNA und Protein Immunisierung aber nicht in der Geschwindigkeit mit der sie sich teilten, sondern nur in dem Zeitpunkt an dem sie anfangen sich zu teilen und in der Anzahl der Zellen die begannen sich zu teilen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 9: Kinetik aktivierungsabhängiger Oberflächenproteine nach GeneGun Immunisierung**

CD62L positive, CFSE gefärbte Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen wurden in Balb/c Mäuse intravenös transferiert. Nach ~16 h wurden die Rezipienten mittels GeneGun mit pCI-Ovalb immunisiert. Nach 1-5 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten und Milzen von 3-4 Tieren entnommen, gepoolt, gefärbt und analysiert. Die Zellen am Tag 0 wurden vor der Immunisierung entnommen. Angezeigt werden CD4 positive, OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> positive Lymphozyten. Das Histogramm zeigt die Zellen aus Region c.

### 3.2.2.3 CD69 korreliert mit der Emigration der Th-Zellen aus dem Lymphknoten

Wie in Abbildung 9 sichtbar, exprimierten alle Th-Zellen, die im Lymphknoten zu proliferieren begannen, CD69 stark (a). Mit zunehmender Anzahl an durchlaufenen Zellteilungen nahm die CD69 Expression geringfügig ab (a). Am Tag 4 traten dann Zellen auf, die sich vielfach geteilt hatten und wieder CD69 negativ waren (b). Diese CD69

negativen Zellen grenzten sich deutlich von denjenigen Zellen ab, die sich ebenfalls mehrfach geteilt hatten, aber noch CD69 positiv waren (c, Histogramm). Genau diese proliferierten und CD69 negativen Zellen traten am Tag 4 in der Milz auf (d). Da in der Milz die Zwischenpopulationen, also Zellen, die CD69 exprimierten und sich erst ein- bis etwa viermal geteilt hatten, fehlten, sind diese Zellen wahrscheinlich in die Milz eingewandert. Eine Expansion dieser Zellen in der Milz ist aufgrund der fehlenden Zwischenpopulationen unwahrscheinlich.

Diese Daten machen es wahrscheinlich, dass Zellen die im Lymphknoten nach Immunisierung proliferieren, am Ort zurückgehalten werden so lange sie CD69 positiv sind. Erst wenn sie wieder CD69 negativ sind, können sie die Lymphknoten verlassen und in die Milz bzw. die Blutzirkulation einwandern. Unterstützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, dass im Blut ausschließlich CD69 negative Th-Zellen gefunden wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Kombination aus CD69 und CFSE Färbung erlaubt also eine Unterscheidung von am Ort aktivierten und rezirkulierten Zellen. Damit wird eine Lokalisierung der Antigenpräsentation möglich. Somit scheint die CD69 Expression in Verbindung mit der CFSE Färbung ein guter Marker zu sein, der anzeigt, in welchem Organ Th-Zellen nach Immunisierung proliferieren und in welches Organ sie nur einwandern.

#### 3.2.2.4 GeneGun Immunisierung induziert Th1 und Th2 Zellen

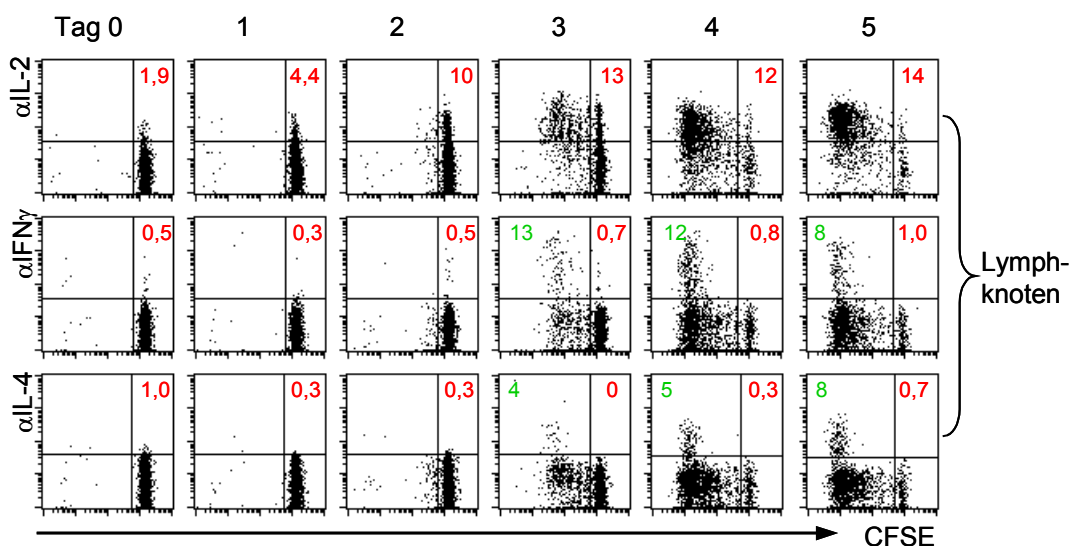
Nun wurde das Potential der Th-Zellen Zytokine zu produzieren bestimmt (vgl. 1.2.2). Zu diesem Zweck haben wir wie unter 3.2.2.2 isolierte Zellen nicht direkt gefärbt und analysiert, sondern 4 Stunden *ex vivo* stimuliert. Damit wurde ihr *in vivo* geprägtes Zytokinprofil abgerufen (vgl. 3.1.3). Nach Fixierung wurden neben IL-2 und IL-10 die beiden zentralen Th1 und Th2 definierenden Zytokine IFN $\gamma$  und IL-4 intrazellulär angefärbt.

IL-2 ist ein Zytokin, welches sehr früh von T-Zellen nach Antigenkontakt produziert wird. Auch nach DNA Immunisierung war dies der Fall (Abb. 10). 4,4% der Th-Zellen produzierten bereits am Tag 1 IL-2. Im weiteren Verlauf der Kinetik produzierten bis zu 16% der Th-Zellen, die sich nicht geteilt hatten, IL-2. Von den Zellen, die mit Expansion auf die Immunisierung reagierten, produzierten praktisch alle IL-2 (gesamte Population verschoben).

IL-10 und TGF $\beta$  sind zwei wichtige immunsupprimierende Zytokine. Derzeit besteht keine Möglichkeit TGF $\beta$  produzierende T-Zellen direkt zu färben. Daher musste auf die Analyse dieses Zytokins verzichtet werden. IL-10 als wichtiges, suppressorische Th-Zellen

definierendes Zytokin wurde in allen Experimenten, in denen andere Zytokine intrazellulär bestimmt wurden, ebenfalls gefärbt. In keinem Fall konnten IL-10 positive Zellen nach *ex vivo* Restimulation gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die benutzten Antikörper waren, wie alle anderen in der Arbeit verwendeten, auf Funktionalität getestet.

Wie bereits in der Einleitung erläutert (vgl 1.2.3), wird der Polarisierung von Th-Zellen eine zentrale Bedeutung für die weitere Entwicklung einer Immunantwort zugesprochen. Ebenfalls wurden die Rollen von IFN $\gamma$  und IL-4 als Th1 und Th2 definierende Zytokine beschrieben. Hier war nun die Frage zu klären, ob die GeneGun Immunisierung Th1- oder Th2-Zellen induziert. Die Literatur zu dieser Fragestellung deutete auf eine Th2 Polarisierung hin [157;158]. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, konnten wir dies nicht bestätigen.



**Abb. 10: Kinetik der IL-2, IFN $\gamma$  und IL-4 Expression nach GeneGun Immunisierung**

Balb/c Tiere wurden analog Abbildung 9 behandelt. Die, am entsprechenden Tag isolierten, Lymphozyten wurden CD4 MACS sortiert, mit PMA/Ionomycin restimuliert, fixiert und intrazellulär gefärbt. Angezeigt sind CD4 positive und OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> positive Zellen. Die rechten (roten) Zahlen geben die Prozente an Zytokin positiven Zellen der sich nicht geteilten Zellen an. Die linken (grünen) Zahlen beziehen sich analog nur auf die proliferierten Zellen.

Allgemein ist zu bemerken, dass nur diejenigen Th-Zellen deutlich detektierbare Mengen an IFN $\gamma$  und IL-4 produzierten, die sich geteilt hatten. Für die Th-Zellpopulationen, die sich nicht geteilt hatten, lagen die Werte der Zytokinproduzenten alle unter 1% und damit im Bereich naïver Th-Zellen. Am Tag 3, als die erste Th-Zellexpansion sichtbar wurde, produzierten 13% der expandierten Zellen IFN $\gamma$  und nur 4% IL-4. Dieses Th1 Übergewicht verringerte sich im Laufe der untersuchten Tage. So war das Verhältnis bei dem gezeigten

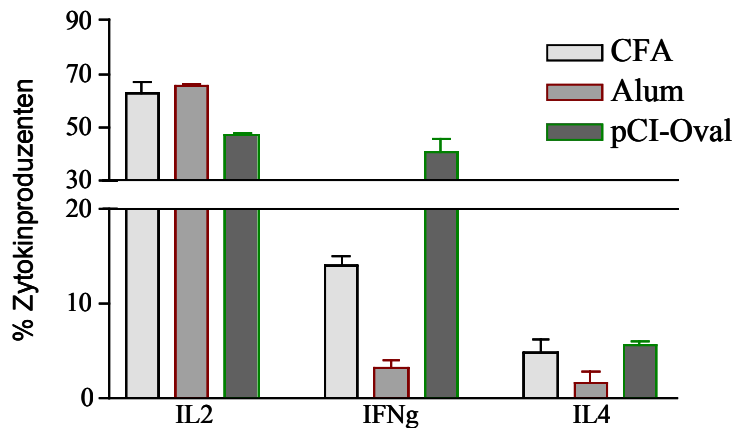
Experiment am Tag 5 ausgeglichen, wobei die Anzahl der IFN $\gamma$  Produzenten auf 8% gefallen und die der IL-4 Produzenten auf 8% gestiegen war. Gezeigt sind hier die Daten der Th-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten. Aus den selben Tieren wurden auch die Milzzellen untersucht. Dabei ergab sich ein vergleichbares Bild bezüglich des Verhältnisses von IFN $\gamma$  zu IL-4 produzierenden Th-Zellen. Im Unterschied zu den aus den Lymphknoten isolierten Zellen, waren die Werte für die spezifischen Th-Zellen aus der Milz jedoch höher.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die GeneGun Immunisierung sowohl IFN $\gamma$ , als auch IL-4 produzierende Zellen induzierte. Eine ausschließliche Th2 Verschiebung konnte nicht beobachtet werden. Die Anzahl der Zytokinproduzenten war abhängig von der Zeit nach der Immunisierung, wobei mit fortlaufender Zeit das Th1:Th2 Verhältnis abnahm.

### 3.2.2.5 GeneGun im Vergleich zu konventioneller Immunisierung

Um die Th-Zellpolarisierung nach GeneGun Immunisierung beurteilen zu können, haben wir diese mit konventionelle Immunisierungsverfahren verglichen. Dazu wurde einer Gruppe Mäusen Ovalbumin+CFA subkutan injiziert. Einer weiteren Gruppe wurde Ovalbumin+Alum intraperitoneal injiziert. CFA wurde verwendet, da es das Adjuvanz ist, welches bei einer Proteinimmunisierung am ehesten ein Th1 Profil mit erhöhten IFN $\gamma$  Werten induzieren kann. Alum induziert dagegen keine IFN $\gamma$  Produktion und gilt daher als neutrales bzw. Th2 Adjuvanz. Der Transfer der transgenen Zellen erfolgte wie in 3.2.2.2 am vorangegangenen Tag. Am Tag 5 wurden Milzen von je 3 Tieren gepoolt und wie unter 3.2.2.4 analysiert.

Da auf Grund der verschiedenen Applikationsorte jeweils unterschiedliche Lymphknoten drainieren, erfolgte der Vergleich der spez. Th-Zellen, welche zum Zeitpunkt der Analyse bereits in das zentrale Organ Milz eingewandert waren.



**Abb. 11: Vergleich der Zytokinproduktion nach CFA, Alum und GeneGun Immunisierung**

CD62L positive, CFSE gefärbte Zellen aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Tieren wurden in Rezipienten transferiert. 5 Tage nach der angegebenen Immunisierung (CFA+Ovalbumin subkutan, Alum+Ovalbumin intraperitoneal, GeneGun pCI-Ovalb) wurden CD4 positive Milzzellen mit PMA/Ionomycin restimuliert, fixiert und intrazellulär gefärbt. Angegeben sind die Prozent Zytokinproduzenten der proliferierten Zellen (analog Abb. 10 grüne Zahlen).

Nach GeneGun Immunisierung produzierten über 40% der Th-Zellen IFN $\gamma$  (Abb.11). Die Proteinimmunisierung in CFA induzierte mit ~15% IFN $\gamma$  Produzenten ebenfalls deutlich die Produktion von IFN $\gamma$ , wogegen Alum erwartungsgemäß kaum IFN $\gamma$  Produktion nach sich zog. Somit resultierte die Immunisierung mit der GeneGun entgegen den Erwartungen in einem Th1 und nicht in einem Th2 Profil.

Bemerkenswerterweise unterschieden sich die Prozentzahlen der IL-4 produzierenden Zellen kaum in Abhängigkeit der Immunisierungen. Somit ist eine „Th1 Immunisierung“ (CFA + Protein) durch erhöhte Werte an IFN $\gamma$  Produzenten charakterisiert, eine „Th2 Immunisierung“ (Alum + Protein) liegt vor, wenn die Zahl an IFN $\gamma$  Produzenten nicht verändert ist.

### **3.3 Manipulation der Immunantwort mittels DNA Koimmunisierung**

Nachdem in den vorangegangenen Teilen der Arbeit Transfersystem und Immunisierungsrouten etabliert und die Auswirkungen der GeneGun Immunisierung auf die Th-Zellantwort charakterisiert worden sind, stand nun eine gezielte Modulation der Th-Zellantwort im Vordergrund.

Zu diesem Zweck führten wir DNA Immunisierungen durch, bei denen neben dem Antigenvektor ein weiterer Vektor, welcher potentiell immunmodulatorische Proteine exprimiert, koappliziert wurde. Solche Koimmunisierungsstudien sind bereits durchgeführt



worden [122]. Unser Zelltransfersystem versetzte uns aber erstmals in die Lage, den Einfluss solcher Koimmunisierungen auf die direkte und spezifische Th-Zellantwort zu untersuchen. Damit hatten wir hier ein System in der Hand, welches auf schnelle und unkomplizierte Weise die Effekte verschiedener koapplizierter DNA Expressionsvektoren *in vivo* ermöglichte.

Ziel der Koimmunisierungen war es, Th1 Polarisierung zu minimieren, da Th1 Zellen ursächlich mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen in Verbindung gebracht werden. Gleichzeitig sollten Th2 Zellentwicklung gefördert werden, da sich Th2 Zelldifferenzierung positiv in vielen Autoimmunprozessen auswirkt. Zusätzlich wurden Proteine koimmunisiert, die mit einer generellen Suppression der Th-Zellantwort, bzw. der Induktion von regulatorischen Th-Zellen in Verbindung gebracht werden und somit ebenfalls Autoimmunprozesse positiv beeinflussen.

### 3.3.1 Analyse der Effekte verschiedener Koimmunisierungen auf Th-Zellexpansion und -differenzierung

CD62L positive, CFSE gefärbte Lymphozyten wurden aus DO11.10 Mäusen in Balb/c Mäuse transferiert (vgl.3.1.1). 12-24 Stunden später wurden die Tiere dann mit der GeneGun immunisiert. Dabei wurden Goldpartikel eingesetzt, die neben dem Antigenvektor pCI-Ovalb noch mit einem der angegebenen Zytokinexpressionsvektoren beladen waren. Somit wurde ein und die selbe Zelle potentiell mit beiden Expressionsplasmiden kotransfiziert. Nach 5 Tagen wurden dann die Milzen bzw. die drainierende Lymphknoten einer Gruppe isoliert und gepoolt. Pro Gruppe wurden 4 Tiere immunisiert. Ein Teil der erhaltenen Zellen wurde direkt im FACS analysiert. Der größere Teil wurde einer CD4 Sortierung unterzogen. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden *ex vivo* für 4 Stunden restimuliert. In den anschließend mit Formaldehyd fixierten CD4-Zellen wurden dann intrazellulär Zytokine gefärbt und im FACS analysiert.

Die Proliferation der spezifischen Th-Zellen nach Immunisierung wurde anhand der direkt analysierten Zellen bestimmt. Als Wert für die Stärke der Expansion wurde jeweils der geometrische Mean derjenigen Zellen verglichen, die sich mindestens einmal geteilt hatten. Somit war die Analyse unabhängig von der Zahl der transferierten Zellen und der Stärke der Immunisierung.

Für die Ermittlung der Th1:Th2 Verschiebung wurden ebenfalls nur solche Zellen herangezogen, die sich geteilt hatten (vgl. Abb.14: jeweils nur Zellen der Quadranten oben und unten links). Die ermittelten Werte wurden jeweils mit denen des immer mitgeführten Leervektors pEmpty verglichen.

Wie bereits unter 3.2.2.1 erwähnt konnte TGFβ aus technischen Gründen nicht mitgefärbt werden. IL-10 wurde gefärbt, war aber, wie ebenfalls erwähnt, nach keiner Koimmunisierung *ex vivo* detektierbar, so dass auf eine Darstellung verzichtet wurde. Weitere Zytokine (GM-CSF, IL-13, IL-6, IL-3) wurden zum Teil ebenfalls gefärbt, erbrachten aber keine wesentlichen Erkenntnisse, so dass auch auf ihre Darstellung verzichtet wurde.

Abbildung 13 gibt einen Überblick über die erzielten Effekte.

	Verschiebung Th1---Th2	Proliferation
membrangebundene Moleküle		
pB7.1	<=	--
pB7.2	<=	--
pB7h	<=>	--
pSerrate	<=>	--
"immunsupprimierende" Zytokine		
pTGFβ	<=>	--
pIL10	<=	--
pvIL10	<<=	↓
"Th2 polarisierende" Zytokine		
pIL4	<<=	--
pIL6	<=>	↑
"immunstimulierende" Zytokine		
pIL2	<=>	↓
pIL15	<=	↑
"Th1 polarisierende" Zytokine		
pIL12	<<<=	↓
pIFNγ	<=>	--

<=> keine Th1:Th2 Verschiebung

<=           ↓           zunehmende Th1 Verschiebung

<<=

Th2 Verschiebung wurde nicht beobachtet!

---

Proliferation:

↑ verstärkt

-- unverändert

↓ vermindert

**Abb. 13: Überblick über die Wirkungen verschiedener Koimmunisierungen**

### 3.3.2 Effekte der Koimmunisierungen im Detail: Erwartungen nicht erfüllt

Die verwendeten Koimmunisierungsvektoren ließen sich gestützt auf bekannte Funktionen bzw. Lokalisation in Gruppen einteilen: membrangebunden (B7.1, B7.2, B7h, Serrate), immunsupprimierend (TGFβ, IL-10, vIL-10), immunstimulierend (IL-2, IL-15, IL-6), Th1 polarisierend (IL-12, IFNγ), Th2 polarisierend (IL-4, IL6).

Die verwendeten Immunmodulatoren wurden anhand bekannter Wirkungen *in vivo* und *in vitro* wie Th2 und T<sub>reg</sub> Zellinduktion und Th-Zellsuppression ausgewählt (Details siehe unten). Die potentiell immunstimulierenden bzw. Th1 induzierenden Moleküle wurden als Kontrollen mitgeführt, um die beobachteten Th-Zellreaktionen in unserem System beurteilen zu können.

### 3.3.2.1 Einfluss membrangebundener Moleküle

Die Entwicklung von Th2 Zellen ist im Gegensatz zu der Th1 Zellentwicklung stärker abhängig von der Stärke Kostimulation der Th-Zelle über die CD28/B7.1&B7.2 Interaktion [34]. Somit bestand die Hoffnung, durch eine Verstärkung dieses Signals eine Th2 Verschiebung zu induzieren. Auch für die ICOS/B7h Interaktion wurden ähnliche Effekte gezeigt [199;200]. Serrate hat ebenfalls immunsupprimierende Eigenschaften. Insbesondere wurde gezeigt, dass die Expression von Serrate in APCs die Entwicklung von regulatorischen Th-Zellen induzieren kann [201].

Die Koimmunisierung dieser membranständigen Vektoren brachten nicht die erwarteten Resultate. So war weder nach pSerrate, noch nach pB7h Koimmunisierung eine verminderte Proliferation oder veränderte Zytokinproduktion der Th-Zellen zu beobachten. pB7.2 verschob das Th1/Th2 Verhältnis wie auch pB7.1 in Richtung Th1, wobei die Zahl an IFN $\gamma$  Produzenten um etwa das 1,7 fache Anstieg. pB7.1 und pB7.2 hatten keinen Einfluss auf die Proliferation.

### 3.3.2.2 Einfluss „immunsupprimierender“ Zytokine

IL-10 inhibiert die Aktivierung und Effektorfunktionen von Th-Zellen. Eine wichtige Funktion von IL-10 liegt in der Begrenzung und Terminierung von Immunreaktionen [202]. vIL-10 inhibiert ebenfalls Th-Zellproliferation ohne aber die immunstimulatorischen Wirkungen von IL-10 zu haben. Auch TGF $\beta$  wirkt über die Inhibition von IL-2 anti proliferativ auf Th-Zellen [203]. Alle drei Zytokine wurden auch bereits erfolgreich in DNA Immunisierungsstudien eingesetzt [122].

Von diesen klassischen „immunsupprimierenden“ Zytokinen inhibierte einzig pvIL-10 die Proliferation der spezifischen Th-Zellen. Gleichzeitig verdoppelte sich die Zahl an IFN $\gamma$  Produzenten etwa auf ~20%, wodurch sich das Th1/Th2 Verhältnis deutlich Richtung Th1 verschob. Auch pIL-10 hatte einen Th1 polarisierenden Effekt, der etwas schwächer als der von pvIL10 ausfiel (~1,8 fach), ohne jedoch die Proliferation zu beeinflussen. pTGF $\beta$  hatte keine reproduzierbaren Effekte. Insbesondere war keine Inhibition der IL-2 Produktion zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.2.3 Einfluss „Th2 polarisierender“ Zytokine**

IL-4 ist das zentrale für Th2 Zellentwicklung verantwortliche Zytokin [54;204]. IL-6 fördert in Abhängigkeit von endogenem IL-4 Th2 Zellentwicklung und inhibiert unabhängig von IL-4 Th1 Zellentwicklung [62].

Eine reproduzierbare Th2 Polarisierung konnte auch mit diesen potentiell „Th2 polarisierenden“ Zytokinen nicht erreicht werden. Im Gegenteil wurde das Th1/Th2 Verhältnis durch eine pIL4 Koimmunisierung in Richtung Th1 verschoben (Abb. 14). Dieser Effekt von pIL4 widersprach komplett unseren Erwartungen, da verschiedene Gruppen eine Th2 Verschiebung nach IL-4 DNA Koimmunisierungen zeigen konnten [166;205]). pIL6 beeinflusste das Th1/Th2 Verhältnis nicht, verstärkte aber die Proliferation der spezifischen Th-Zellen.

### **3.3.2.4 Einfluss „immunstimulierender“ Zytokine**

Bei den potentiell „immunstimulierenden“ Zytokinen IL-2, IL-15 und IL-6 überraschte insbesondere IL-2. So war eine Inhibition der Proliferation der spez. Th-Zellen nach pIL2 Koimmunisierung zu beobachten. Diese war zusätzlich von einer insgesamt verminderten Zytokinproduktion der expandierten Th-Zellen begleitet. pIL15 und pIL6 verstärkten erwartungsgemäß die Th-Zellexpansion, wobei pIL15 zusätzlich eine Th1 Verschiebung induzierte.

### **3.3.2.5 Einfluss „Th1 polarisierender“ Zytokine**

Die mit „Th1 Polarisierung“ in Verbindung gebrachten Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$  hatten nur zum Teil die erwarteten Effekte. So führte die pIL12 Koimmunisierung zu einem dramatischen Rückgang der IL-4 Produzenten und einem ebenso starken Anstieg an IFN $\gamma$  Produzenten (Details vgl. 3.3.3). Zusätzlich verminderte pIL12 noch die Th-Zellproliferation. pIFN $\gamma$  hatte keinen weiteren Einfluss auf die Th-Zellpolarisierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur pIL12 und pIL15 Koimmunisierung die erwarteten Effekte zeigten. Die Mehrzahl der Koimmunisierungen hatten kaum oder teils unerwartete Effekte. Insbesondere konnte weder Th2 Polarisierung induziert werden, noch zeigten die klassischen immunsupprimierenden Moleküle die erwarteten Effekte. So deuteten nur die inhibierte Expansion nach pIL2 und pvIL10 Koimmunisierung auf potentiell

immunsupprimierende Wirkungen hin. Die membranständigen Moleküle hatten insgesamt vergleichsweise geringe Effekte.

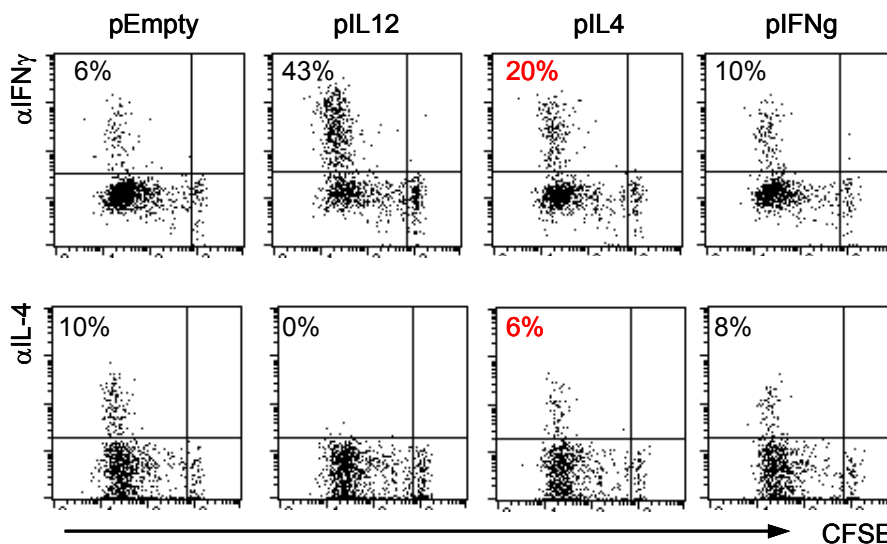
Der unerwartete Ausgang nach pIL4 und pIL10, aber auch nach pIL2 Koimmunisierung machte deutlich, dass die zugrundeliegenden Mechanismen nach DNA Immunisierung noch nicht verstanden sind, und *in vitro* beobachtete Wirkungen bestimmter Zytokinein nicht einfach *in vivo* reproduzierbar sind. Es bedarf weiterer Anstrengungen, die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, um wirkungsvolle DNA Immunisierung basierte Therapien rationell zu entwickeln.

Wir haben uns entschieden, die unerwarteten Effekte von pIL4 näher zu untersuchen, da IL-4 DNA Koimmunisierung nicht nur mehrfach sein Th2 Differenzierung verstärkendes Potential gezeigt hat, sondern auch therapeutisch in Autoimmunmodellen erfolgreich eingesetzt wurde.

#### **3.4 Untersuchung der pIL4 induzierten Th1 Verschiebung**

Von den beobachteten Auswirkungen der verschiedenen Koimmunisierungen wurde nun die pIL4 induzierte Th1 Verschiebung näher untersucht. In Abbildung 14 sind exemplarisch die Originaldaten aus einem der Experimente, die zur Abbildung 13 führten, dargestellt. In diesem Experiment wurden neben dem Leervektor pEmpty und pIL4 zwei Vektoren verwendet, die Zytokine exprimierten, die in ähnlichen DNA Immunisierungsstudien Th1 polarisierende Wirkungen hatten.

Wie Abbildung 14 zu entnehmen ist, führten sowohl die pIL12 als auch die pIL4 Koapplikation zu einer verstärkten Bildung von Th1 Zellen. Im Einzelnen produzierten nach Koapplikation vom Kontrollvektor pEmpty 6% der spezifischen, expandierten Th-Zellen (im weiteren nur noch als Th-Zellen bezeichnet) IFN $\gamma$  und 10% IL-4. Damit resultierte die Koimmunisierung mit dem Leervektor in einem relativ ausgeglichenen Verhältnis von Th1 und Th2 Zellen. Die Anwesenheit des zweiten Expressionsplasmids beeinflusste die Th-Zelldifferenzierung somit kaum (vgl. 3.2.2.4).



**Abb. 14: Zytokinproduktion der Th-Zellen nach pEmpty, pIL12, pIL4 und pIFN $\gamma$  Koimmunisierung**

Tag 0: i.v. Transfer CD62L positiver, CFSE gefärbter Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Tieren in Balb/c; Tag 1: GeneGun Immunisierung mit pCI-Ovalb & dem angegebenen Zytokinvektor auf den selben Goldpartikeln; Tag 5: drainierende Lymphknoten von 3-4 Tieren gepoolt, CD4 MACS Sortierung, PMA/Ionomycin Restimulation, intrazelluläre Zytokinfärbung und Analyse im FACS. Angezeigt werden CD4 positive OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Zellen. Die Zahlen zeigen die Prozentanteile der Zytokinproduzenten unter den proliferierten Zellen.

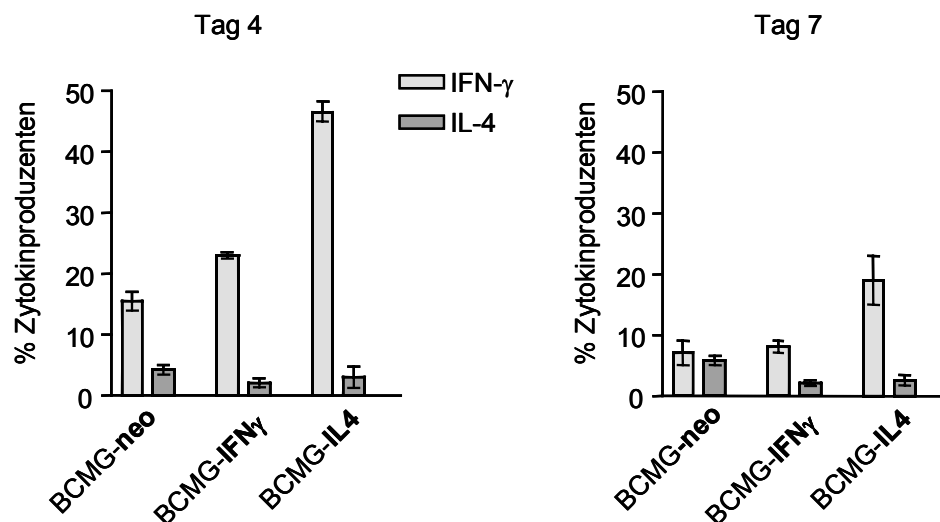
Dies veränderte sich drastisch, wenn statt pEmpty pIL12 verwendet wurde. Nach pIL12 Koimmunisierung produzierten 43% der Th-Zellen IFN $\gamma$ . IL-4 produzierende Zellen waren mit einem Wert von <1% kaum noch detektierbar. Somit unterdrückte die Anwesenheit von IL-12 deutlich die IL-4 Produktion.

pIL4 Koapplikation führte ebenfalls zu einem deutlichen prozentualen Anstieg der IFN $\gamma$  produzierenden Th-Zellen: von 6% auf 20%. Die Reduktion der IL-4 Produzenten von 10% auf 6% bei pIL4 Koimmunisierung fiel zwar geringer aus als bei pIL12, war aber doch deutlich und ebenfalls reproduzierbar.

IFN $\gamma$  DNA Koimmunisierung wurde mehrfach mit Th1 Entwicklung in Zusammenhang gebracht [166;167]). Wir führten daher auch Koimmunisierungen durch, bei denen pIFN $\gamma$  koappliziert wurde. Dies resultierte aber in keinem reproduzierbaren Effekt. Der leichte Th1 polarisierende Effekt (Abbildung 14) lag innerhalb der normalen Schwankungen unseres Assays.

### 3.4.1 Th1 Verschiebung nach pIL-4 Koimmunisierung ist nicht auf veränderte Kinetik zurückzuführen

Um zu testen ob der Th1 induzierende Effekt des pIL4 Vektors nur aufgrund einer veränderten Kinetik der Th-Zellreaktion auf die Immunisierung zurückzuführen war (vgl. 3.2.2.4), wiederholten wir die unter 3.4 durchgeführten Versuche, analysierten die Th-Zellreaktion aber zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Um zusätzlich unspezifische Effekte der verwendeten Vektoren auszuschließen, wurden BCMG basierte Zytokinexpressionsplasmide verwendet. Diese waren etwa dreimal Größer als die pcDNA3.1 basierten Vektoren und trugen die BPV-Sequenz. Diese befähigt den Vektor zur extrachromosomalen Replikation in eukaryotischen Zellen.



**Abb. 15: Zytokinproduktion der Th-Zellen an Tag 4 & 7**

Zelltransfer, anschließende Isolation und Restimulation der CD4 Zellen analog zu Abbildung 14. Statt der pcDNA3.1 basierten Zytokinvektoren wurden die BCMG basierte verwendet. Die Zellen wurden an Tag 4 und 7 entnommen. Prozentzahlen analog Abb. 14 ermittelt.

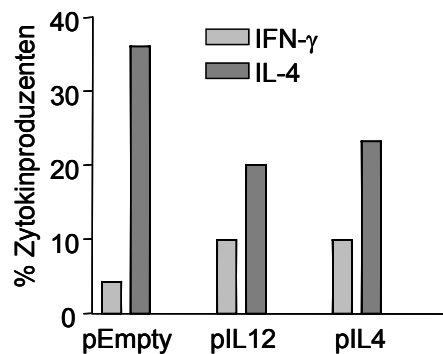
Wie Abbildung 15 zu entnehmen war auch nach Koapplikation von BCMG basierendem IL-4 Expressionsvektor eine deutliche Th1 Verschiebung im Vergleich zur Koimmunisierung mit dem leeren BCMG Vektor zu beobachten. Dabei produzierten am Tag 4 nach pBCMG-IL4 Gabe über 45% der expandierten spez. Th-Zellen IFN $\gamma$  und unter 5% IL-4. Auch wenn dieses starke Th1 Übergewicht am Tag 7 deutlich abgenommen hatte, so war es mit etwa 20% IFN $\gamma$  Produzenten und <5% IL-4 Produzenten doch immer noch deutlich.

Der Th1 polarisierende Effekt von pBCMG-IL4 war also zu unterschiedlichen Zeitpunkten sichtbar und konnte durch eine verbesserte Expression verstärkt werden.

### 3.4.2 Th1 Effekt von pIL4 und pIL12 auch sichtbar, wenn Zellen aus Th2 Kultur transferiert wurden.

Um festzustellen, ob der beobachtete Th1 polarisierende Effekt von pIL4 auch in einer Situation, in der die Mehrzahl der spezifischen Zellen bereits eine Th2 Polarisierung aufweist, sichtbar ist, wurden Th2 polarisierte Zellen transferiert.

Dazu wurden Lymphozyten aus OVATCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen für eine Woche unter Th2 polarisierenden Bedingungen mit Ovalbumin stimuliert. Nachdem die toten APCs entfernt worden waren (vgl.2.8) wurden die Zellen CFSE gefärbt und in naive Rezipienten intravenös injiziert. Diese so behandelten Tiere wurden dann mittels GeneGun immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die Milz bzw. Lymphknoten isoliert, restimuliert und mittels FACS analysiert (vgl. oben).



**Abb. 16: Zytokinprofil der Th-Zellen nach Transfer von Th2 Zellen und Koimmunisierung**

Lymphozyten aus OVA-TCR<sup>tg/tg</sup> Mäusen wurden in vitro durch Zugabe von OVA-Peptid, rekombinatem IL-4 und  $\alpha$ IL-12 Antikörper Th2 polarisiert. Nach 5-6 Tagen wurden die lebendigen Zellen mit CFSE gefärbt.  $1-2 \cdot 10^6$  dieser Zellen wurden in Rezipiententiere transferiert. Die Tiere wurden mittels GeneGun und doppelt beladene Goldpartikeln (pCI-Ovalb+Zytokinvektor) immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die peripheren Lymphknoten von 3 Tieren gepoolt, die Zellen restimuliert, gefärbt und analysiert.

Im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen naive Zellen transferiert worden waren, zeigten die spezifischen Th-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten nach Koimmunisierung mit pCI-Ovalb+pEmpty mit ~36% IL-4 und nur ~4% IFN $\gamma$  Produzenten eine deutliche Th2 Polarisierung (Abb. 16). Diese Th2 Dominanz wurde sowohl durch pIL4, als auch pIL12 Koimmunisierung deutlich abgeschwächt. So produzierten nach pIL4



Koimmunisierung nur noch ~22% IL-4, dafür aber ~10% IFN $\gamma$ . Ein ähnliches Bild zeigte sich nach pIL12 Koimmunisierung mit ~20% IL-4 und ebenfalls ~10% IFN $\gamma$  Produzenten.

Nicht aus der Abbildung 16 ersichtlich ist die deutlich verminderte absolute Zahl der transgenen Zellen, die aus den Lymphknoten wieder isoliert wurden. Waren im Schnitt nach Transfer von  $1 \cdot 10^6$  naiven OVATCR<sup>tg/tg</sup> Zellen und pCI-Ovalb Immunisierung 1-2 % der CD4 Zellen transgene Zellen, so verringerte sich dieser Wert hier deutlich auf etwa 0,1-0,2%. Diese Beobachtung war jedoch nicht unerwartet, da bekannt ist, dass Effektor-Th-Zellen verstärkt ins Gewebe und andere Organe, nicht aber in sekundäre lymphoide Organe einwandern. Auch hier wurde wie bereits in 3.2.2.1 darauf geachtet, dass sich die zu transferierenden Zellen vor dem Transfer wieder in einem ruhenden Zustand befanden.

#### 3.4.3 Langzeiteffekte nach DNA Koimmunisierung

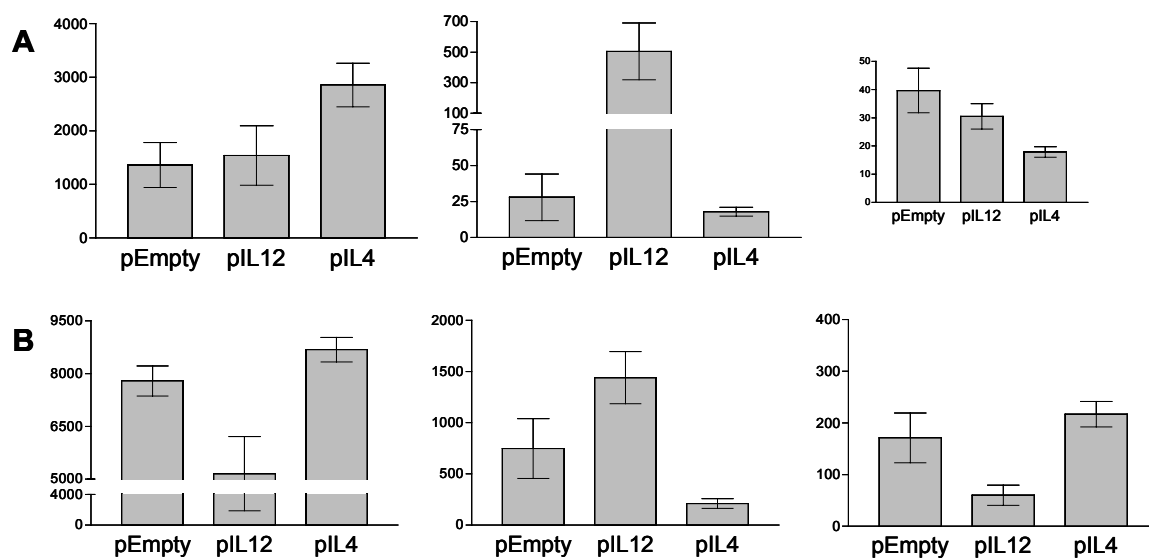
In den bisher beschriebenen Experimenten konnte dank des hier verwendeten Transfersystems erstmals die unmittelbare Th-Zellreaktion nach IL-4 und IL-12 Koimmunisierung untersucht werden. Andere bisher veröffentlichten Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von DNA Koimmunisierungen beschäftigten, konnten aufgrund der geringen Frequenzen der spezifischen Th-Zellen die Polarisierung dieser Zellen nur nach mehrfacher Immunisierung nach Wochen bis Monaten untersuchen. Darüber hinaus wurde in diesen Arbeiten die Zytokinproduktion der Th-Zellen nicht direkt intrazellulär gefärbt, sondern nach Restimulation im Überstand. Im Folgenden wurden daher längerfristige Effekte von IL-4 und IL-12 Koimmunisierung untersucht.

##### 3.4.3.1 Antikörpertiter nach pIL4 Koimmunisierung

Auf Grundlage der Beobachtungen von a) *Snapper et al.* [75], dass IL-4 den Antikörperklassenwechsel zu IgE&IgG1, und IFN $\gamma$  den zu IgG2a kontrollieren, und b) *Stevens et al.* [76], die zeigten, dass Th2 Zellen die IgE&IgG1 Synthese, Th1 Zellen aber die IgG2a Synthese unterstützten, wird auch in DNA Immunisierungsstudien vielfach im Umkehrschluss vom gefundenen Antikörpertiter auf die Th-Zelldifferenzierung zurückgeschlossen [206-208]. Nachdem wir die Th-Zelldifferenzierung direkt sichtbar gemacht hatten, sollte diese nun mit den Antikörperklassen korreliert werden.

Dazu wurden zwei einzelne Experimente durchgeführt. Zum einen (Abb.17A) wurden Balb/c Mäuse am Tag 0 und 14 mit je 2 Schuss doppelt beladenen Goldpartikeln

koimmunisiert. Diesen Tieren wurde dann am Tag 21 Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Gruppengröße betrug 8 Tiere/Gruppe (Abb. 17A). Zum anderen (Abb.17B) wurden Balb/c Mäusen „naïv“ sortierte Lymphozyten aus OVATCR<sup>tg/tg</sup> Tieren transferiert. Die so behandelten Tiere wurden ebenfalls mit doppelt beladenen Goldpartikeln immunisiert. Dies geschah an den Tagen 0 + 14 + 28 + 42. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde diesen Tieren ebenfalls Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Hier bestand eine Gruppe aus 5 Tieren. Das Vorkommen der verschiedenen, Ovalbumin spezifischen Antikörperklassen in diesen Seren wurde mittels CBA ELISA (BD Bioscience) gemessen.



**Abb. 17: Antikörpertiter im Serum nach pIL4 und pIL12 Koimmunisierung**

Balb/c Mäuse wurden mit doppelt beladenen (pCI-Ovalb+Zytokinvektor) Goldpartikeln wie angegeben immunisiert. Ovalbumin-spezifische Antikörper wurden mittels CBA ELISA bestimmt. Gezeigt sind die „mean fluorescence intensities“ MFI der FACS Analyse. **A:** ohne Zelltransfer, 2x immunisiert, Gruppengröße 8 Tiere; **B:** mit Zelltransfer, 4x immunisiert, Gruppengröße 5 Tiere. Details siehe Text.

Erwartungsgemäß waren die ermittelten Antikörpertiter im Experiment A, in dem nur 2x immunisiert wurde deutlich (~10 mal) niedriger als im Experiment B, in dem 4x immunisiert wurde. Ebenfalls erwartungsgemäß waren in beiden Experimenten insgesamt die Werte für IgG1 am höchsten, gefolgt von IgG2a und mit den geringsten Werten für IgE. IgG1 ist unabhängig von der Art der Immunisierung der dominante IgG Subtyp im Blut von Balb/c Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Erwartungsgemäß wurden nach pIL12 Koimmunisierung in beiden Experimenten im Vergleich zum Leervektor erhöhte IgG2a Titer gemessen. Der Effekt auf die IgG1 und IgE Titer war dagegen in den zwei Experimenten nicht einheitlich. In Experiment A (ohne

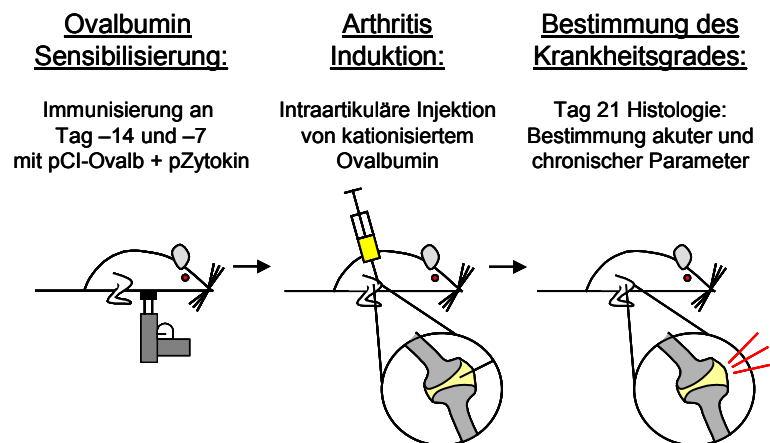
Transfer) war kein Unterschied zur Kontrolle zu sehen, in Experiment B (mit Transfer) waren IgG1 und IgE Titer reduziert. Dieser geringe Einfluss auf IgG1 und IgE überraschte angesichts der fast kompletten Inhibition der IL-4 Produktion nach pIL12 Koimmunisierung (vgl. Abb. 14). Insgesamt entsprachen die Antikörpertiter nach pIL12 Koimmunisierung im der gefundenen Th1 Verschiebung.

Nach pIL4 Koimmunisierung ergab sich ein weniger eindeutiges Bild. Die IgG1 Titer waren in beiden Experimenten erhöht (Dabei ist zu beachten, dass die IgG1 Werte in Abb. 17B nach pIL4 Koimmunisierung im Bereich der Sättigung des Kits lagen und so die tatsächlichen Werte noch höher sein dürften.). Die IgE Titer waren dagegen in Experiment B unverändert und in Experiment A erniedrigt (Hierbei ist zu beachten, dass die IgE Werte in Experiment A am unteren Detektionslimit liegen). Die IgG2a Titer waren unverändert (A) bis erniedrigt (B). Zusammengenommen entsprachen die Antikörpertiter nach pIL4 Koimmunisierung eher einem Th2 als einem Th1 Profil.

#### 3.4.3.2 pIL12 und pIL4 verstärken antigeninduzierte Arthritis

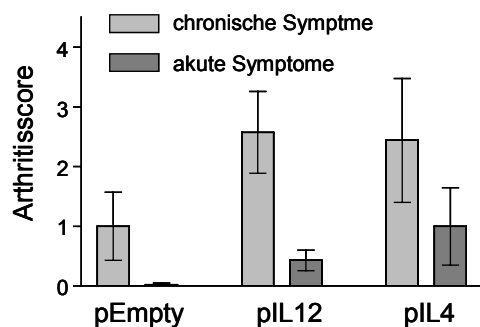
Th1 Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler entzündlicher rheumatischer Erkrankungen. Daher wurde abschließend getestet, welchen Einfluss pIL4 und pIL12 Koimmunisierung auf eine antigeninduzierte Arthritis haben.

Hierzu wurde folgendes, in unserer Arbeitsgruppe von Frank Hardung entwickeltes Krankheitsmodell verwendet (Abb. 18). In diesem Tiermodell werden die Mäuse zuerst gegenüber dem zu untersuchenden Antigen durch zweimalige Immunisierung mit Antigen in CFA sensibilisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wird kationisiertes Antigen in eines der beiden Kniegelenke injiziert. Damit wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst. Die akute Entzündung klingt nach wenigen Tagen ab und wird von einer chronischen Gelenkentzündung abgelöst. Die Stärke der antigenspezifischen Entzündungsreaktion wird nach drei Wochen in Gelenkschnitten bestimmt.



**Abb. 18: Verschprinzip Ovalbumin induzierte Arthritis**

Dieses Krankheitsmodell wurde in etwas abgewandelter Form verwendet. Dazu wurden die Tiere aus 3.6.1 Experiment A verwendet. Diese waren am Tag -14 und -7 mit pCI-Oval und einem der drei Vektoren pEmpty, pIL4 oder pIL12 immunisiert worden. Am Tag 0 wurde dann kationisiertes Ovalbumin ins rechte Knie injiziert. Die Kniegelenksschwellungen am Tag 1 waren zu gering, um gemessen werden zu können. Am Tag 21 wurden die Kniegelenke präpariert, in Paraffin eingebettet und tiefgefroren.



**Abb. 19: Verlauf einer antigen-induzierten Arthritis nach pIL12 und pIL4 Koimmunisierung**

Balb/c Mäuse wurden am Tag 0 + 7 mit doppelt beladenen (pCI-Ovalb + Zytokinvektor) Goldpartikeln immunisiert. Am Tag 14 wurden 30µg kationiertes Ovalbumin in das rechte Kniegelenk injiziert. Am Tag 35 wurden die Knie präpariert und nach Formaldehydfixierung histologisch untersucht. Akute Symptome: granulozytäre Infiltration, granulozytäres Exsudat; chronische Symptome: Hyperplasie, mononukleare Infiltration des Gelenkes und der periartikulären Strukturen. 8 Tiere pro Gruppe.

pIL4 und pIL12 Koimmunisierung verstärkten die Arthritis. Dabei waren sowohl die akuten Symptome Exsudat und granulozytäre Infiltration verstärkt, als auch verstärkte chronische Symptome wie Hyperplasie der synovialen Deckschicht, mononukleäre Infiltration und Fibrose zu beobachten.

Wie Frank Hardung (DRFZ, Berlin) zeigen konnte, sind Th1 Zellen in diesem Arthritismodell in der Lage, die Krankheit zu induzieren. Th2 Zellen aber nicht, bzw. nur in sehr geringem Maße. Somit ist die beobachtete Verstärkung der Arthritis durch die pIL4 Koimmunisierung mit der ebenfalls beobachteten Th1 Verschiebung erklärbar. Die Verstärkung der Arthritis durch pIL4 ist insofern bemerkenswert, als IL-4 DNA Koimmunisierung in anderen Autoimmunmodellen eine therapeutisch gewollte Th2 Verschiebung induzierte, durch die die Krankheit abgeschwächt wird.

### **3.5 Aufklärung der Mechanismen der pIL-4 induzierten Th1**

#### **Polarisation**

Die Beobachtung, dass pIL4 zu einer vermehrten Bildung von Th1 Zellen führte, überraschte; nicht nur weil die Anwesenheit von IL-4 am Beginn einer Immunantwort der zentrale Th2 Differenzierung auslösende Faktor ist, sondern auch weil DNA-Immunisierungsstudien Th2 Polarisierung nach IL-4 DNA Koimmunisierung gezeigt haben [166-168;171;205;209]. Somit stellte sich die Frage nach den Mechanismen, die zur pIL4 vermittelten Th1 Differenzierung führten.

Zwei indirekte, DC vermittelte Mechanismen kamen in Frage. Zum einen ist bekannt, dass CpG Motive DC zur Produktion von IL-12 anregen, welches dann für Th1 Polarisierung verantwortlich ist [150]. Zum anderen haben *Hochrein et al.* [210] gezeigt, dass DC bei Anwesenheit von IL-4 vermehrt IL-12p70 produzieren, was ebenfalls zur Th1 Polarisierung führt.

In den folgenden Experimenten sollten Unterschiede zwischen der pIL12 und der pIL4 induzierten Th1 Polarisierung, eine mögliche Beteiligung der DC und die Rolle von CpG Motiven untersucht werden.

### 3.5.1 CpG Motive sind nicht für die pIL4 induzierte Th1 Verschiebung verantwortlich

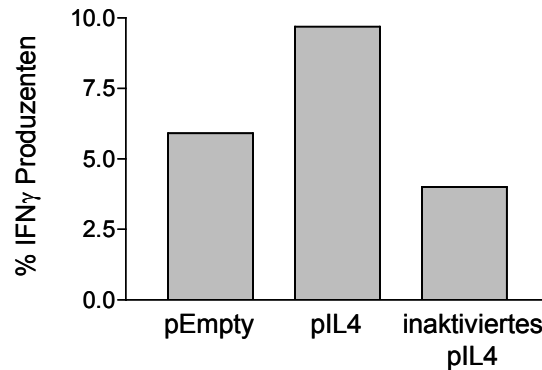
Zu Beginn galt es die Rolle unmethylierter CpG Motive zu untersuchen. Diese in prokaryotischer DNA vermehrt vorkommenden Strukturen haben *in vivo* eine stark Th1 polarisierende Wirkung (vgl.1.4.2.1) und kamen somit eine als mögliche Ursache für die beobachtete Th1 Verschiebung in Frage.

Ein erster Hinweis, dass CpG in unseren Versuchen keine entscheidende Rolle hatten, ergab sich aus einer fehlenden Korrelation von CpG Motiven auf den verwendeten Koimmunisierungsvektoren und den gefundenen Th1 Verschiebungen. Abbildung 20 zeigt die Anzahl der CpG Motive am Beispiel der näher untersuchten Koimmunisierungsvektoren IL-4, IL-12 und IFN $\gamma$ . In der nicht Th1 polarisierenden IFN $\gamma$  Sequenz finden sich drei CpG Motive, wogegen in der Th1 polarisierenden IL-4 Sequenz nur 2 zu finden sind. Auch hat die IFN $\gamma$  Sequenz mit 156 Basen pro CpG eine vergleichsweise höhere CpG Dichte als IL-4 mit 211 Basen pro CpG. Auch für die weiteren in 3.3.2 verwendeten Vektoren wurde keine Korrelation festgestellt (Daten nicht gezeigt).

	Basen	Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin										Summe CpG	Basen/CpG
		GACGCT	AGCGCT	AACGCT	GGCGCT	GACGTC	AACGTT	AACGTC	GGCGTC	AACGCC	GGCGCC		
pcDNA3.1	5428	2	0	3	4	5	2	2	3	5	1	27	201
pCI	4006	2	0	2	3	5	2	1	1	3	0	19	211
Ovalbumin	1030	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	515
IFN $\gamma$	467	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	156
IL-4	422	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	211
IL-12p40	1007	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3	336
IL-12p30	647	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	647

**Abb.20: CpG Motive in den verwendeten Sequenzen**

Um diese Möglichkeit dennoch sicher auszuschließen, führten wir Koimmunisierungen entsprechend 3.3.2 durch. Dabei wurde neben pIL4 und pEmpty noch ein modifizierter pIL4 Vektor eingesetzt. Bei diesem wurde zuvor mittels BamH1 die IL-4 codierende Sequenz vom CMV Promotor getrennt. Die geschnittene und dephosphorylierte DNA wurde mittels eines Agarosegels aufgereinigt. Damit alle Proben parallel behandelt waren, wurden die beiden ungeschnittenen Vektoren ebenfalls im selben Gel aufgereinigt.



**Abb. 21: Wirkung von inaktiviertem pIL4 auf die IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen**

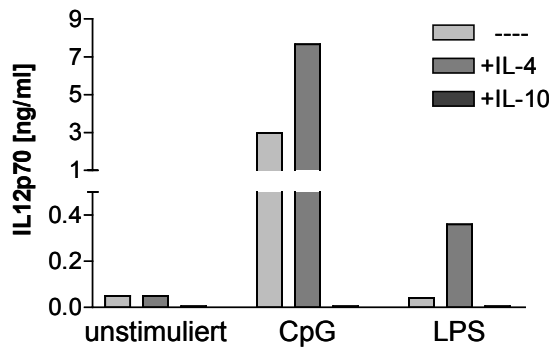
Zelltransfer, GeneGun Immunisierung und Isolation, Restimulation und Analyse der Th-Zellzytokinproduktion analog Abbildung 14. Die Lymphknoten von 4 Tieren pro Gruppe wurden gepoolt. pIL4 wurde durch Trennung der IL-4 cDNA vom Promotor mittels Restriktionsverdau inaktiviert.

Abbildung 21 zeigt, dass mit der Inaktivierung der IL-4 Translation der Th1 polarisierende Effekt (hier nur in Form der IFN $\gamma$  Produktion der spezifischen Th-Zellen dargestellt) aufgehoben wurde. Im dargestellten Experiment stieg die Zahl der Prozent IFN $\gamma$  Produzenten nach konventioneller pIL4 Koimmunisierung von ~6% auf ~10%, dagegen war sie nach Gabe von inaktiviertem pIL4 mit ~4% sogar unter dem der pEmpty Immunisierung. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht im pIL4 Vektor vorhandene CpG Motive für die Th1 Polarisierung verantwortlich waren.

### 3.5.2 IL-4 induziert IL-12 Produktion *in vitro*

*Hochrein et al.* [210] haben gezeigt, dass auf unterschiedliche Art und Weisen stimulierte DCs *in vitro* vermehrt aktives IL-12p70 produzieren, wenn IL-4 vorhanden ist. Diese Beobachtung wollten wir verifizieren, da dieser Mechanismus den Th1 induzierenden Effekt der pIL4 Koimmunisierung erklären könnte.

Zu diesem Zweck wurden DCs aus Balb/c Mäusen mittels CD11c MACS und FACS Sortierung (vgl. 2.6.5) isoliert. Diese Zellen wurden dann *in vitro* mit IS-ODN bzw. LPS unter Zusatz von rekombinantem IL-4 oder IL-10 stimuliert. Nach 20 Stunden wurde der Überstand abgenommen und IL-12p70 mittels Sandwich ELISA bestimmt.



**Abb. 22: Wirkung von IL-4 und IL-10 auf CpG bzw. LPS stimulierte DCs *in vitro***

Balb/c Mäusen wurden Milz, periphere und mesenteriale Lymphknoten entnommen. Nach MACS und FACS Sortierung zu 99% CD11c positive DCs wurden für 18-24h wie angegeben stimuliert. Anschließend wurde IL12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Die Beobachtungen von *Hochrein et al.* gut reproduziert werden. Die Anwesenheit von IL-4 sowohl bei LPS, aber insbesondere auch bei IS-ODN Stimulation führte zu vermehrter IL-12p70 Sekretion (Abb. 22). So wurde die Produktion von IL-12p70 nach IS-ODN Stimulation durch die Anwesenheit von rekombinantem IL-4 von etwa 3ng/ml auf über 7ng/ml mehr als verdoppelt. Nach LPS Stimulation ohne IL-4 war mit 0,05ng/ml IL-12p70 kein Unterschied zu unstimulierten Zellen zu erkennen; durch die Zugabe von IL-4 verzehnfachte sich die IL-12p70 Produktion etwa auf 0,4ng/ml. Die Zugabe von IL-10 inhibierte die Produktion von IL-12p70 komplett.

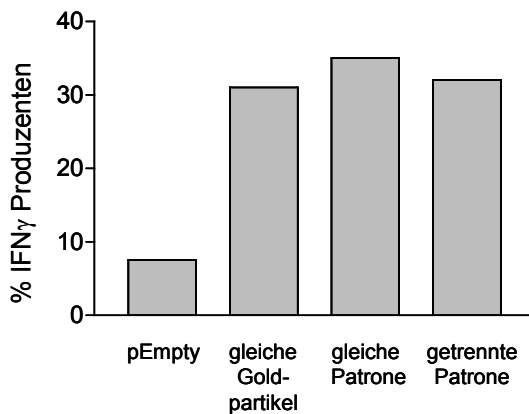
### 3.5.3 Antigen- und Zytokinvektor müssen nicht in derselben Zelle vorliegen

Unklar war, ob das Zytokin von derselben DC produziert werden musste, die auch das Antigen exprimierte. Ob der Effekt also von der Doppeltransfektion der DCs abhing, oder ob die Anwesenheit der Zytokine in der Umgebung ausreichte. Um dies zu testen, wurden Experimente wie unter 3.3.2 durchgeführt, wobei aber auf folgende Art und Weise immunisiert wurde:

- a) mit Patronen die doppelt beladene Goldpartikeln enthielten, diese waren mit pCI-Ovalb und pIL12 oder pEmpty beladen;
- b) mit Patronen die zweierlei Goldpartikel enthielten, zum einen pCI-Ovalb beladene Partikel und zum anderen pIL12 oder pEmpty beladene Partikel;



-- c) mit zweierlei einfach beladenen Patronen, dabei befanden sich Antigen- und Zytokinvektor auf unterschiedlichen Goldpartikeln, die sich in unterschiedlichen Patronen befanden.



**Abb. 23: Trennung von pCI-Ovalb und Zytokinvektor**

Zelltransfer, Isolation, Restimulation und Analyse der Th-Zellen analog Abbildung 14. Lymphknoten von 4 Tieren pro Gruppe wurden gepoolt. Details der Immunisierungen im Text.

Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass der Th1 polarisierende Effekt von IL-12 nach allen drei Immunisierungsarten in vergleichbarer Stärke auftrat. Die Variationen (a: 31%, b: 34%, c:32%) in der Prozentzahl der IFN $\gamma$  Produzenten lagen im Rahmen der unspezifischen Schwankungen unseres Assays. Es war also nicht notwendig, dass Zytokin- und Antigenvektor ein und die selbe Zelle transfizierten. Auch der Effekt von pIL4 war nicht von der direkten Doppeltransfektion einer Zelle abhängig (vgl. 3.5.4).

Somit reichte die Anwesenheit des nach pIL12 oder pIL4 produzierten Zytokins in der Umgebung aus, um effektiv zu sein. Von der einzelnen DC zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation direkt produziertes Zytokin hatte also keine detektierbare Wirkung.

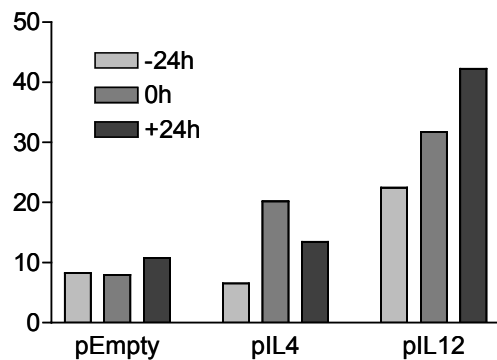
Inwieweit die Beladung der Goldpartikel mit zwei Vektoren tatsächlich zur Koexpression beider Gene führte, wurde in 3.6.3 untersucht.

### 3.5.4 Der Th1 polarisierende Effekt von pIL4 ist maximal bei gleichzeitiger Antigen Gabe, der von pIL12 maximal wenn Antigen 24h vorher appliziert

Auf Grund der bekannten Wirkungen von IL-12 bzw. IL-4 auf Th-Zellen und DCs ergibt sich die Hypothese, dass nach DNA Immunisierung produziertes IL-12 vor allem auf

die Th-Zellen im Lymphknoten, IL-4 dagegen auf die DCs in der Haut. Um diese Hypothese zu stützen, nahmen wir eine zeitliche Trennung der Immunisierung mit dem Antigenvektor von der mit dem Zytokinvektor vor. Die Anwesenheit von IL-12 sollte im Vergleich zu IL-4 erst zu einem späteren Zeitpunkt nötig sein. Nämlich dann, wenn die Antigenpräsentation im Lymphknoten tatsächlich stattfindet, also nach etwa 24h (vgl.3.2.2.2). Die Anwesenheit von IL-4 sollte dagegen bereits während des Reifungs- und Migrationsprozesses der DCs wichtig sein.

Daher wurden die wie unter 3.3.2 behandelten Tiere so immunisiert, dass der jeweilige Zytokinvektor a) 24 Stunden vor dem Antigenvektor, b) zur selben Zeit wie der Antigenvektor oder c) 24 Stunden nach dem Antigenvektor appliziert wurde. Auch im Fall b) waren Zytokin- und Antigenvektor in verschiedenen Patronen.



**Abb. 24: IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen bei zeitlicher Trennung von pCI-Ovalb und Zytokinvektor**  
Zelltransfer, Isolation, Restimulation und Analyse der Th-Zellen analog Abbildung 14. Lymphknoten von 4 Tieren pro Gruppe wurden gepoolt. Details der Immunisierungen im Text.

Der Th1 polarisierende Effekt von pIL12 verstärkte sich, je später es eingesetzt wurde. Wurde pIL12 24 Stunden vor dem Antigenvektor appliziert, produzierten ~22% der Th-Zellen IFN $\gamma$ . Dieser Wert erhöhte sich bei gleichzeitiger Gabe bereits deutlich auf ~32% und stieg bei Gabe des pIL12 24 Stunden nach dem Antigenvektor auf ~42%. Im Gegensatz zur pIL12 Koimmunisierung zeigte sich für pIL4 ein völlig anderes Bild. Wurde die pIL4 Gabe zeitlich von der pCI-Ovalb Immunisierung getrennt, so fiel der Th1 polarisierende Effekt deutlich schwächer aus. Die Frequenz lag sowohl bei dem +24h mit ~7% als auch beim -24h Wert mit ~13% deutlich unter dem Wert bei gleichzeitiger Applikation (~20%). Die pEmpty Koimmunisierung zeigte keine zeitliche Abhängigkeit.

pIL4 hatte also den stärksten Effekt, wenn es zum selben Zeitpunkt wie der Antigenvektor appliziert wurde. Somit konnte IL-4 über den gesamten Reifungsprozess der DCs auf diese einwirken. Der Effekt von pIL12 war dagegen maximal, wenn es 24h nach dem Antigenvektor appliziert wurde. Dies entspricht dem Zeitpunkt der ersten Antigenpräsentation im Lymphknoten.

Somit stützen diese Daten die Hypothese, dass IL-12 auf die Th-Zellen selbst wirkt, IL-4 dagegen den Reifungsprozess der DCs bereits in der Haut beeinflusst.

#### 3.5.5 DC unterscheiden sich nach pIL12 und pIL4 Immunisierung

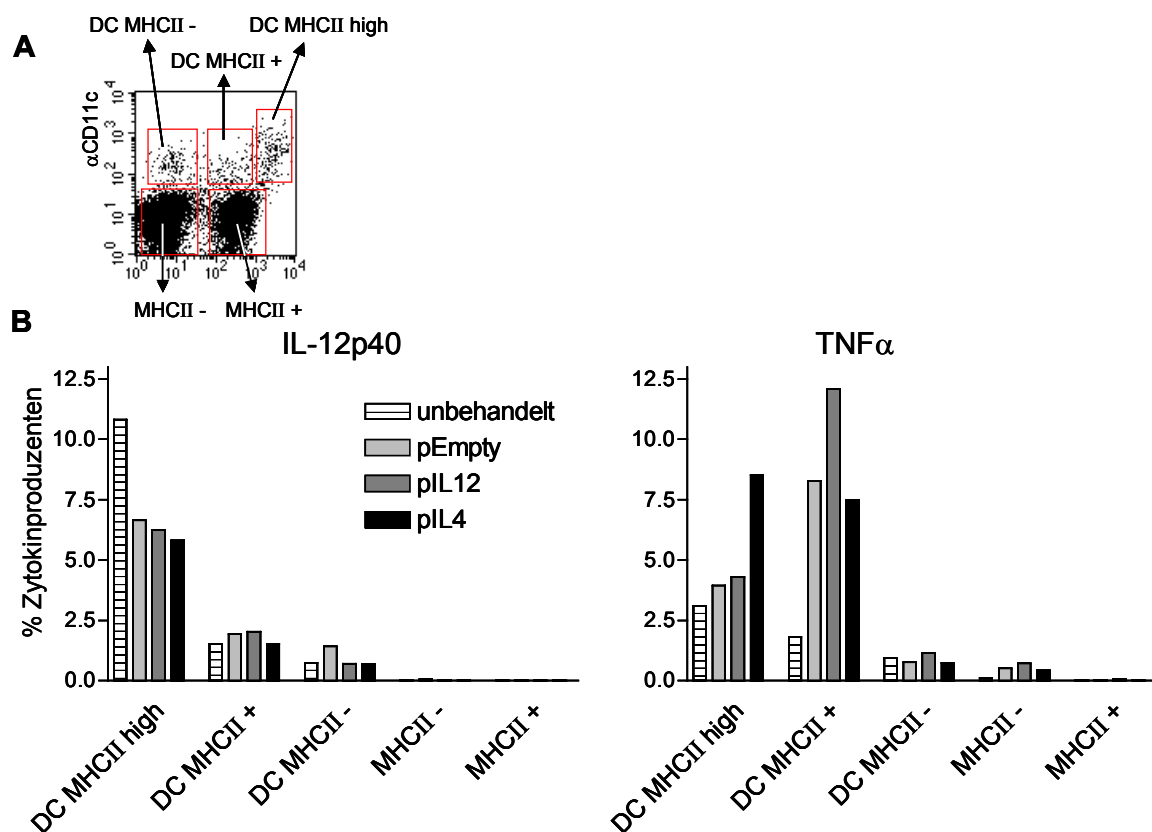
Nun sollte untersucht werden, inwiefern die Immunisierung mit pIL4 bzw. pIL12 den Phänotyp der DCs in den drainierenden Lymphknoten beeinflusst.

Dazu wurden Immunisierungen von Balb/c Mäuse ohne Zelltransfer durchgeführt. Jedes Tier wurde 6 mal beschossen, wobei die Patronen jeweils nur pEmpty, pIL4 oder pIL12 enthielten. Durch den Mehrfachbeschuss wird die Zahl der DC in den drainierenden Lymphknoten erhöht [144]. Nach 24h Stunden wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen, und eine Zellsuspensionen unter Einsatz von Collagenase, DNase und EDTA hergestellt (vgl. 2.6.3). Dieses aufwändige Zellisolationsprotokoll war nötig, da beim einfachen, für T-Zellen hinreichenden Protokoll, die Gefahr bestand, bestimmte Zellpopulationen zu verlieren. Die Zellsuspensionen wurden 20 min bei 37°C mit BrefeldinA inkubiert, um eine Anreicherung von Zytokinen in den Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen gefärbt, fixiert, intrazellulär gefärbt und im FACS gemessen.

Die Analyse erfolgte über das in der Abbildung 25A gezeigte Gating. Dabei wurden die DC über CD11c identifiziert. Die CD11c positiven Zellen wurden dann nochmals in MHC-II „high“, „+“ und „-“ getrennt. Zusätzlich wurden noch die CD11c negativen Zellen in MHC-II „+“ und „-“ aufgeteilt.

Alle Immunisierungen mit der GeneGun hatten gemeinsam, dass sie insgesamt die Zahl Zellen in den drainierenden Lymphknoten erhöhten (Daten nicht gezeigt). Damit erhöhte sich auch die Zahl der DC Zellen, wobei sich deren prozentualer Anteil an allen Lymphozyten kaum veränderte. Auch war keine Verschiebung der Anteile innerhalb der CD11c positiven Zellen zu beobachten. Die Stärke der MHC-II Expression der jeweiligen DC Populationen änderte sich ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt).

Nun stand die Analyse der zentralen, Th1 Differenzierung induzierenden Zytokins IL-12 im Vordergrund. Es gelang aber trotz unterschiedlicher Versuche nicht, dessen aktive Form IL-12p70 intrazellulär *ex vivo* nachzuweisen. Es gelang lediglich der Nachweis von IL-12p70 in sortierten und *in vitro* stimulierten DC Überständen mittels ELISA und die Anfärbung in pIL12 transfizierten Zelllinien. Es blieb also ungeklärt, ob die Mengen an IL-12p70 zu gering war oder ob IL-12p70 sich aus nicht bekannten Gründen mit dem verwendeten Antikörper *ex vivo* in DCs nicht anfärben ließ.



**Abb. 25: Ex vivo TNF $\alpha$  und IL12p40 Produktion der DCs nach pIL12 und pIL4 Immunisierung**

Balb/c Mäuse wurden mit einfach beladenen (pEmpty, pIL12 oder pIL4) Goldpartikeln mit 6 Schuss pro Tier immunisiert. Nach 20h wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert. Die erhaltenen Zellsuspension wurde 30 min unter Zugabe von BrefeldinA im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und fixiert. Die Zytokine wurden dann intrazellulär gefärbt und im FACS analysiert.

In vielen Veröffentlichungen werden die verschiedenen Untereinheiten von IL-12 nicht unterschieden. Stattdessen wird nur IL-12p40 gemessen und von IL-12 im allgemeinen gesprochen. Dies ist angesichts der wahrscheinlich gegensätzlichen Effekte von IL-12(p40)<sub>2</sub> und IL-12p70 aber problematisch (vgl.4.4.3.5). Dennoch wurde auch hier IL-12p40 intrazellulär bestimmt. Wie Abbildung 25B zu entnehmen, war keine Veränderung in der IL-12p40 Produktion nach den verschiedenen GeneGun Immunisierungen zu sehen. Einzig nahm

die Prozentzahl an IL-12p40 Produzenten unter den MHC-II „high“ DC deutlich ab, wenn überhaupt mittels GeneGun immunisiert wurde.

Zusätzlich zu IL-12 analysierten wir noch die IL-6, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  Produktion der DC. IL-6 und IFN $\gamma$  unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Immunisierungen und werden daher nicht weiter behandelt. Die Produktion von TNF $\alpha$  wurde aber deutlich durch die verschiedenen Zytokinvektoren beeinflusst. Dabei induzierten pIL4 und pIL12 jeweils in einem anderen Subset deutlich die TNF $\alpha$  Produktion. Nach pIL4 Immunisierung verdoppelte sich die Zahl der TNF $\alpha$  Produzenten unter den MHC-II „high“ DC von ~4% auf ~8%. Auf die anderen Subpopulationen hatte pIL4 dagegen keinen Einfluss. Nach pIL12 Immunisierung blieben die MHC-II „high“ Zellen dagegen im Vergleich zu pEmpty unverändert, jedoch beeinflusste pIL12 die Anzahl der TNF $\alpha$  Produzenten in der DC MHC-II „+“ Population. Diese stieg von ~8% auf ~12%.

### **3.6 Charakterisierung der nach Gene Gun Immunisierung direkt transfizierten Zellen**

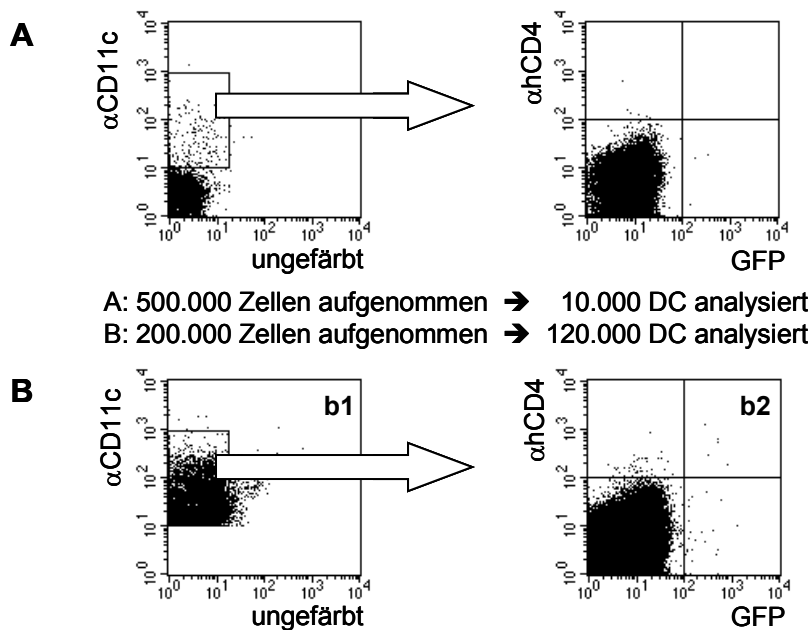
Fremdantigene, die in die Haut eindringen, werden von professionellen APC aufgenommen und in die drainierenden Lymphknoten transportiert. Im Wesentlichen sind dafür DC zuständig, deren weitere Aufgabe vor allem darin besteht, das Antigen den T-Zellen zu präsentieren. Diese gleiche zentrale antigenpräsentierende Rolle spielen DC auch nach DNA Immunisierungen (vgl. 1.4.1). Dabei konnte mehrfach gezeigt werden, dass DC, die im drainierenden Lymphknoten nach GeneGun Immunisierung auftauchen, nicht nur aufgenommenes Antigen präsentieren, sondern auch DC darunter sind, die das Antigen selbst exprimieren. Welchen Beitrag diese direkt transfizierten DC zur Immunantwort leisten, wird aber noch kontrovers diskutiert. Auf Grund ihrer geringen Frequenz wurden diese direkt transfizierten DC bisher nur in Schnitten oder mittels PCR nachgewiesen, und haben sich einer weiteren Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie entzogen.

#### **3.6.1 Analysestrategie und Quantifizierung der direkt transfizierten DCs**

Wie bereits erwähnt, ist die Frequenz der direkt transfizierten DC in den drainierenden Lymphknoten extrem gering. Bisher hat einzig eine Gruppe in einer sehr aufwendigen Arbeit mittels Auswertung von  $\beta$ -Gal Färbungen in über 300 Gewebsschnitten die Frequenz direkt transfizierter Zellen auf etwa 15 Stück pro GeneGun Schuss und drainierenden Lymphknoten

ermittelt. Der Phänotyp dieser Zellen konnte aber auf Grund der verwendeten Technik nicht näher bestimmt werden.

Um genügend Zellen für eine erfolgreiche Analyse zu erhalten, wurde bei den folgenden Experimenten jedes einzelne Tier mit 6 Schüssen immunisiert. Durch diesen Mehrfachbeschuss verdoppelte sich in etwa die absolute Zahl an Zellen der entnommenen Lymphknoten (inguinal, axial, brachial) (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich haben *Porgador et al.* [144] gezeigt, dass sich die Zahl der direkt transfizierten Zellen nach 5 Schüssen im drainierenden Lymphknoten um etwa das 2-2.5 fache erhöht. Auch in den hier dargestellten Experimenten wurden die Zellen wie bereits unter 3.5.5 erläutert unter Einsatz von Collagenase, DNase und EDTA isoliert. Pro Immunisierung wurden die Zellen von 2-3 Tieren gepoolt.



**Abb. 26: Analyse der nach GeneGun Immunisierung direkt transfizierten Zellen**

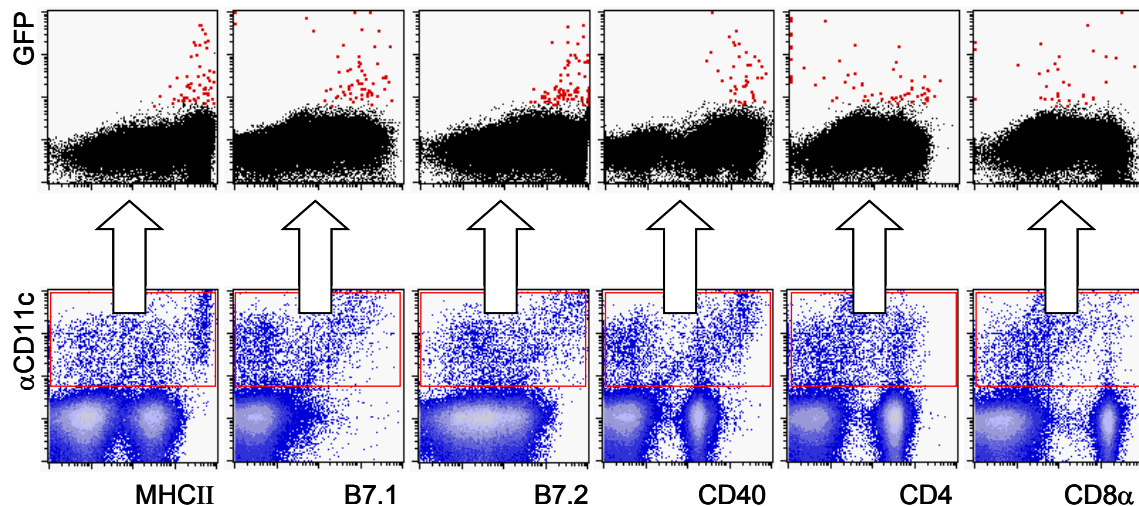
Aus Abbildung 26 wird die Analysestrategie, mit der die weitere Charakterisierung der direkt transfizierten DC erfolgte, ersichtlich. 3 Mäuse wurden mit pEGFP immunisiert. 24h später wurden die Zellen aus den Lymphknoten, wie oben beschrieben, isoliert. Die vereinzelt Zellen wurden mit  $\alpha$ CD11c gefärbt und im FACS analysiert. Abbildung 26A zeigt eine herkömmliche Analyse. In a1 sind die CD11c Färbung und das Gate für a2 zu sehen (beachte: in a1 werden nicht alle Zellen angezeigt). Insgesamt wurden 500.000 Zellen aufgenommen. Da nur etwa 2% der Zellen DC sind, bleiben für die Analyse ~10.000 Zellen übrig. Umgehen lässt sich dieses Problem, indem neben dem FSC Threshold noch ein CD11c

Threshold eingerichtet wird. Dies ist in 22B geschehen. Somit konnten von 200.000 aufgenommenen Zellen 120.000 analysiert werden. Erst bei dieser großen Zahl analysierter Zellen wird jedoch deutlich, dass es sich bei der Färbung nicht um eine Hintergrundfärbung handelt. Da nach einer wie hier durchgeführten DNA Immunisierung etwa 30.000 DC [144] in einem der drainierenden Lymphknoten zu finden sind ( $\sim 1.5 \cdot 10^6$  Lymphozyten insgesamt), folgt, dass in B die Zellen aus drei Lymphknoten analysiert wurden. Aus diesem und weiteren ähnlichen Experimenten (vgl. 3.6.2) ergibt sich also eine Zahl von etwa 10-30 direkt transfizierten Zellen pro Lymphknoten.

#### 3.6.2 Phänotyp direkt transfizierter DCs

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass es sich bei direkt transfizierten Zellen, die in den drainierenden Lymphknoten nach DNA Immunisierung auftauchen, im Wesentlichen um DC handelt (vgl. 1.4.1). Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die Strategie für die Analyse der DC vorgestellt wurde, sollten nun die direkt transfizierten DC den verschiedenen Subpopulationen zugeordnet werden. Zu diesem Zweck wurden Tiere wie unter 3.6.1 beschrieben mit pEGFP immunisiert und die Zellen 24 Stunden später isoliert. Die Analyse erfolgte dann ebenfalls wie unter 3.6.1 beschrieben. Die Daten der Plots der unteren Reihe von Abbildung 27 wurden entsprechend der Daten der Abbildung 26A aufgenommen, die der oberen Reihe entsprechend 26B.

Die nach GeneGun Immunisierung direkt transfizierten DC befanden sich innerhalb der DC Populationen, die wesentliche aktivierungsabhängige Oberflächenmoleküle maximal exprimierten. So waren sie MHC-II high, B7.1 positiv, B7.2 high und CD40 high. Im Gegensatz dazu konnten die direkt transfizierte Zellen nicht eindeutig den Untergruppen-definierenden Markern CD4 und CD8 $\alpha$  [10;211] zugeordnet werden. Direkt transfizierte DCs sind vielmehr unter den CD8 $\alpha$  bzw. CD4 positiven und negativen Zellen zu finden.



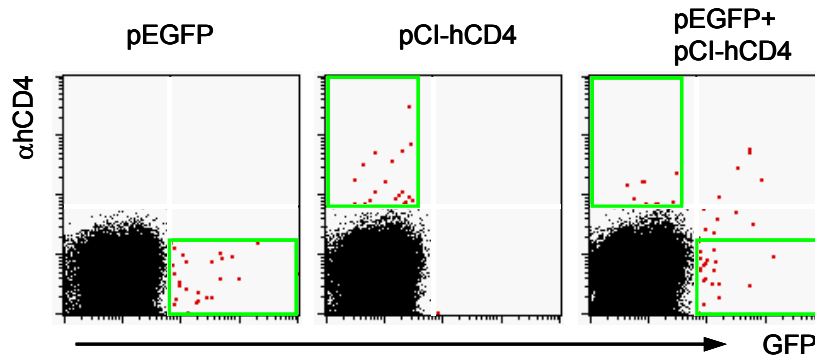
**Abb. 27: Phänotyp nach GeneGun Immunisierung**

Balb/c Mäuse wurden mit pEGFP beladenen Goldpartikeln mit 6 Schuss pro Tier immunisiert. Nach 20h wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert und die Zellen entsprechend der in Abbildung 26 angegebenen Analysestrategie aufgenommen. Die GFP positiven Zellen sind mit der „highlight“-Funktion der Auswertesoftware CellQuestPro hervorgehoben.

### 3.6.3 Koimmunisierung führt zur Koexpression

Ein weiterer Punkt, der nun untersucht werden konnte, war die Koexpression nach Koimmunisierung. Expressieren DC nach Beschuss mit zweifach beladenen Goldpartikeln tatsächlich beide cDNAs? Um dies zu testen, wurden Tiere mit pEGFP oder pCI-hCD4 oder doppelt beladenen Goldpartikeln beschossen. Im pCI-hCD4 wurde eine verkürzte cDNA des humanen CD4 Moleküls hinter den CMV Promotor kloniert. Diese cDNA codierte für ein CD4 Molekül ohne Signaltransduktionsdomäne. Das exprimierte, humane CD4 Molekül war damit auf der Oberfläche mit entsprechendem Antikörper nachweisbar, war aber aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne nicht funktionell.





**Abb. 28: Koexpressionsanalyse nach GeneGun Koimmunisierung**

Balb/c Mäuse wurden mit pEGFP (links), pCI-hCD4 (mitte) oder doppelt (pEGFP + pCI-hCD4; rechts) beladenen Goldpartikeln immunisiert. Nach 20h wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen, die Zellen gefärbt und analysiert.

Wie Abbildung 28 zu entnehmen, waren sowohl nach pEGFP, als auch nach pCI-hCD4 Immunisierung GFP bzw. hCD4 positive Zellen zu finden. Auch schien der  $\alpha$ hCD4 Antikörper relativ spezifisch zu sein, da in den beiden mit einfach beladenen Goldpartikeln immunisierten Tieren keine doppelt positiven Zellen sichtbar waren. Solch doppelt positive DC traten aber bei den mit doppelt beladenen Goldpartikeln immunisierten Tieren auf (Abb. 28 rechts). Im Schnitt waren nach GeneGun Immunisierung mit doppelt beladenen Goldpartikeln etwa  $50 \pm 20\%$  der DC Zellen doppelt transfiziert.

Somit war gezeigt, dass das Konzept, mittels doppelter Beladung der Goldpartikel auch eine doppelte Transfektion und Expression der DCs zu erreichen, funktionierte. Dies sollte auch für die Versuche gelten, bei denen Antigen und Zytokin koimmunisiert wurden, insbesondere also auch für die unter 3.3 durchgeführten Versuche.