

### **4 DISKUSSION**

Eine Fehlregulierung des Immunsystems kann zu Autoimmunkrankheiten führen. Dabei spielen Th-Zellen eine zentrale Rolle. Die wichtigsten Mediatoren, mit deren Hilfe Th-Zellen den Ausgang einer Immunantwort beeinflussen, sind die Zytokine. Durch gezielte Modulation der Th-Zellreaktion kann zum einen eine Immunreaktion verstärkt werden, zum anderen können Autoimmunprozesse verhindert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels DNA Immunisierung derart in den Antigenpräsentationsprozess einzugreifen, dass es zur Differenzierung von Th-Zellpopulationen kommt, die in Autoimmunprozessen potentiell therapeutisch wirksam sind. Insbesondere sollten antigenspezifische Th-Zellen induziert werden, die die Wirkung bzw. Entstehung pro-inflammatorischer Th1 Zellen unterdrücken.

DNA Immunisierung eignet sich besonders, verschiedene potentiell immunmodulatorisch wirkende Moleküle zu testen, da die aufwendige Herstellung des Proteins wegfällt. Auch wäre eine DNA Immunisierung die antigenspezifisch Autoimmunprozesse positiv beeinflusst, ohne aber zu einer allgemeinen Immunsuppression zu führen, ein wesentlicher Therapiefortschritt.

#### **4.1 Analyse der Th-Zelldifferenzierung ex vivo**

Um die Mechanismen zu verstehen, die die Th-Zelldifferenzierung nach DNA Immunisierung beeinflussen, musste zunächst ein System geschaffen werden, welches eine direkte *ex vivo* Analyse der Th-Zellen ermöglicht. Konventionelle Techniken sind auf mehrfache Immunisierungen angewiesen und auf Grund der geringen Frequenzen der spezifischen Zellen mit Fehlern behaftet. Daher wurde hier der Weg eines Zelltransfers gewählt. Durch diesen war es möglich, die Th-Zelldifferenzierung auf Einzelzellebene *ex vivo* vom ersten Tag der Immunisierung an zu untersuchen.

Dieses System wurde bereits mehrfach verwendet, um das Verhalten von Th-Zellen *in vivo* zu studieren [25]. Es war jedoch unklar, ob alle transferierten spezifischen Th-Zellen das Antigen präsentiert bekommen würden, oder ob ein Großteil der Zellen nicht reagieren würden. Dies schien wahrscheinlich, da die Menge an Protein, die nach DNA Immunisierung produziert wird, sehr gering ist. Zusätzlich beobachteten *Gudmundsdottir et al.* [212] in einem ähnlichen Versuchsaufbau, dass etwa 30% der spezifischen Th-Zellen nach Transfer nicht mit Proliferation auf eine Proteinimmunisierung reagierten. Auf Grund der CFSE Färbung

konnten wir ebenfalls beobachten, dass nicht alle spezifischen Th-Zellen expandierten. Die Gründe hierfür sind unklar. Diesbezüglich ergeben sich verschiedene Erklärungsansätze.

*Gudmundsdottir et al.* vertreten die Ansicht, dass die Heterogenität der T-Zellrezeptor (TCR)  $\alpha$ -Kette und eine damit einhergehende Ausdifferenzierung einiger Th-Zellen verantwortlich ist. Durch diese Heterogenität kommt es in den OVATCR<sup>tg/tg</sup> Tieren zur Ausprägung endogen rearrangierter  $\alpha$ -Ketten [213]. Dies führt zur Ausbildung von T-Zellrezeptoren unbekannter Spezifität. Dadurch können die Zellen Umweltantigene erkennen und so z.B. tolerant oder anerg werden.

Wäre diese Eigenschaft der Th-Zellen die alleinige Ursache, so würde man unabhängig von der Anzahl der transferierten Zellen und unabhängig von der Stärke der Immunisierung immer eine ähnliche Prozentzahl an proliferierenden Zellen erwarten.

Die Anzahl der proliferierten Zellen war in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch auch abhängig von der Stärke der Immunisierung und der Anzahl der transferierten Zellen (Daten nicht im Detail gezeigt). Dabei galt: je stärker die Immunisierung, desto höher der Prozentsatz an Zellen, die anfangen sich zu teilen; je mehr Zellen transferiert wurden, desto niedriger der Anteil an sich teilenden Zellen.

Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass der Grund für die fehlende Proliferation einiger Zellen nach Immunisierung nicht ausschließlich in den Th-Zellen selbst z.B. in Form von Toleranz oder Anergie liegt. Vielmehr scheint das Überangebot an spezifischen Th-Zellen und damit verbunden eine nicht ausreichende Anzahl APCs bzw. deren fehlende Zugänglichkeit mit verantwortlich zu sein.

Umso wichtiger war der Einsatz der CFSE Färbung. Erst durch diesen war es möglich, nur diejenigen Zellen zu betrachten, die expandiert sind. Dies war für die durchgeführten Versuche entscheidend, da nur diese Zellen in Reaktion auf die Immunisierung differenzieren.

### **4.2 GeneGun Immunisierung ist zuverlässiger als intramuskuläre Applikation**

Die am häufigsten im Rahmen von DNA Immunisierungsstudien angewandte Applikationsroute ist die intramuskuläre Injektion. In dieser Arbeit war sie überraschenderweise am wenigsten erfolgreich (Abb. 6). Trotz mehrfacher Versuche gelang es nicht, eine mit der GeneGun Immunisierung vergleichbar starke Th-Zellreaktion zu erhalten.

Was sind die Gründe für die fehlende Th-Zellexpansion nach intramuskulärer Immunisierung? Unwahrscheinlich ist, dass expandierte Zellen auf Grund der

unterschiedlichen Lokalisation nicht erfasst wurden, da die Zellen zu den Zeitpunkten der Analyse bereits im Körper hätten rezirkulieren müssen (vgl.3.2.2.3). Es gibt ebenfalls keine Daten, die auf eine zeitliche Verschiebung um mehrere Tage nach hinten hinweisen würden. Auch für eine grundsätzlich schwächere Th-Zellantwort nach intramuskulärer Immunisierung im Vergleich zur GeneGun gibt es keine Hinweise. Vielmehr wurden für beide Routen vergleichbar starke T-Zellproliferation, ähnlich starke CTL Antworten und vergleichbar hohe Antikörpertiter gefunden [122].

Somit bleibt die Reproduzierbarkeit als Ursache. *Yoshida et al.* [214] haben die intramuskuläre und die GeneGun Immunisierung direkt verglichen und konnten die Überlegenheit der GeneGun bezüglich Reproduzierbarkeit direkt zeigen. Weitere indirekte Hinweise diesbezüglich ergeben sich aus der Abhängigkeit der intramuskulären Route von verschiedenen Parametern wie Geschwindigkeit der Injektion und Art des Puffers [215] und der Art des Antigens [216]. Die Unzuverlässigkeit spiegelt sich auch darin wieder, dass bei intramuskulärer Immunisierung meist mehrfach immunisiert wird, sehr große Mengen an DNA verwendet werden und viele Versuche unternommen wurden, die Effektivität z.B. durch Stoffe wie Cardiotoxin oder Bupivacaine zu verbessern [217-219].

Als wesentliche Ursache für diese Unzuverlässigkeit ist die Lokalisation der DNA zu sehen: im Falle der GeneGun wird die DNA direkt in die Zellen geliefert, wogegen sie nach Injektion hauptsächlich extrazellulär vorliegt.

Die schwache Th-Zellantwort nach intramuskulärer DNA Immunisierung ist also auf eine kompliziertere und unzuverlässigere Handhabung zurückzuführen. Dies war mit ein Grund, uns auf die GeneGun Applikationsroute zu konzentrieren. Ein zweiter Grund war die im Vergleich zur DNA Injektion mittels Nadel vergleichsweise geringe Menge an applizierter DNA und damit Th1 polarisierenden CpG Motiven.

### **4.3 GeneGun induziert frühes Übergewicht an IFN $\gamma$ produzierenden Th-Zellen**

Welche Faktoren die Th-Zelldifferenzierung nach DNA Immunisierung steuern, ist nach wie vor umstritten. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Th-Zelldifferenzierung nach GeneGun Immunisierung an verschiedenen Tagen unmittelbar nach Induktion der Immunreaktion bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass zu Beginn der klonalen Expansion ein Übergewicht an IFN $\gamma$  Produzenten gegenüber IL-4 Produzenten herrschte (vgl.3.2.2.4). Dieser Eindruck einer Th1 Antwort wurde durch den Vergleich mit den konventionellen

Immunisierungen CFA+Protein bzw. Alum+Protein verstärkt (vgl.3.2.2.5). Im direkten Vergleich wird die CFA Immunisierung als Th1 Protokoll, die Alum Immunisierung als Th2 Protokoll angesehen. Dabei zeigte der Vergleich der verschiedenen Immunisierungsprotokolle, dass nicht die Zahl der Th2 Zellen beeinflusst wird, sondern sich vor allem die Zahl an Th1 Zellen z.B. durch den Einsatz von CFA erhöhen lässt. Die durchgeführte Kinetik (vgl. 3.2.2.4) zeigte jedoch auch, dass das Übergewicht an Th1 Zellen umso größer war, je früher die Zellen analysiert wurden. Mit der Zeit nahm die Zahl der IFN $\gamma$  Produzenten ab, die der IL-4 Produzenten nahm zu.

Dennoch war die beobachtete Th1 Dominanz zu den frühen Zeitpunkten nach GeneGun Immunisierung unerwartet, da die meisten Publikationen nach GeneGun Immunisierung ein Th2 Profil finden. Intramuskuläre DNA Injektion zieht dagegen meist Th1 Entwicklung nach sich [157-159;161;220-222].

Diese Diskrepanz wird folgendermaßen erklärbar:

Th-Zellen differenzieren bei fehlendem Th1 Trigger dem Konzept der „vorbestimmten Th2 Entwicklung“ folgend in Richtung Th2 aus [54]. Dieses Konzept geht davon aus, dass sich Th2 Zellen *in vivo* immer dann spontan entwickeln, wenn keine mikrobiellen Faktoren zur Verfügung stehen, die APCs dazu bringen IL-12 oder andere Th1 induzierende Zytokine zu produzieren. Im Falle der DNA Immunisierung kommt es also nur dann zu einer Th1 Verschiebung, wenn mengenmäßig und zeitlich genügend verfügbare CpG Motive vorhanden sind. Je mehr CpG Motive (z.B. Nadelinjektion > GeneGun) je länger (z.B. mehrfache > einzelne Immunisierung) in einer verfügbaren Form (z.B. extra- > intrazellulär) vorliegen, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit eine stabile Th1 Polarisierung zu erhalten. Die hier nach GeneGun Immunisierung beobachtete Th1 Polarisierung ist also auf den frühen Zeitpunkt der Analyse zurückzuführen.

So ergibt sich folgendes Bild: Nach GeneGun Immunisierung kommt es durch die vorhandenen CpG Motive anfänglich zu einem Überschuss an Th1 Zellen. Dabei ist das Immunsystem so austariert, dass zu Beginn einer Immunantwort bereits wenig Th1 Trigger (hier CpG) ausreicht, um Th1 Entwicklung zu erhalten. Mit der Zeit setzt sich dann aber die Th2 Entwicklung durch. Dies liegt zum einen daran, dass nur wenig DNA und damit wenig CpG vorhanden ist, und zum anderen daran, dass von residenten Zellen produziertes Antigen weiterhin präsentiert wird, während die vorhandene DNA aber intrazellulär vorliegt, und die CpG Motive so für die nachrückenden DCs nicht zugänglich sind.

Somit beobachten wir Th1 Polarisierung aufgrund des frühen Messzeitpunktes. Im Vergleich kommt es bei der intramuskulären DNA Injektion aufgrund der großen Mengen an extrazellulär vorliegender DNA (und damit CpG) zur Th1 Entwicklung. Folgende Beobachtungen stützen dieses.

*Pertmer et al.* [158] beobachten unabhängig von der Art der Immunisierung ein Rückgang der IFN $\gamma$  Produktion (bestimmt im Überstand nach Restimulation) und einen Anstieg der IL-4 Produktion mit der Zeit nach GeneGun Immunisierung. Im Vergleich zu *Pertmer et al.* untersuchen *Yoshida et al.* [214] die IFN $\gamma$  Produktion zu einem frühen Zeitpunkt, und finden nach GeneGun Immunisierung hohe IFN $\gamma$  Titer. *Barry et al.* [161] zeigen, dass wenig DNA intramuskulär injiziert Th2 Zellen induzieren kann. Die von *Leitner et al.* [223] beobachtete Zunahme an IgG2a bei mehrfacher Immunisierung mit der GeneGun könnte ihre Ursache in dem mehrfachen Th1 Trigger jeweils direkt nach der GeneGun Immunisierung haben. Schließlich ist der von zwei Gruppen beobachtete, von einem Exportsignal abhängige Th2 Shift nach intramuskulärer Injektion erklärbar [220;224]: Durch das Exportsignal liegt das Protein über die anfängliche Phase, in der viel CpG vorhanden ist, hinaus vor. Durch die weitere Anwesenheit des sekretierten Antigens in Abwesenheit von CpG kann sich dann die Th2 Antwort entwickeln. Auch weitere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe stützen diese Ansicht. So beobachteten wir eine Th1 Verschiebung, wenn die Präsentation des Antigens nur durch direkt transfizierte DCs stattfindet.

Somit scheint die Richtung der Th-Zellpolarisierung nach DNA Immunisierung im Wesentlichen von der Menge und der Verfügbarkeit der CpG Motive als zentralen IL-12 induzierenden Faktor abzuhängen. Sind nicht ausreichend und verfügbare CpG Motive vorhanden, kommt es dem Konzept der „vorbestimmten Th2 Entwicklung“ („default Th2 response“ [54]) folgend automatisch zur Th2 Entwicklung.

### **4.4 IL-4 und IL-12 DNA Koimmunisierung induzieren Th1**

#### **Verschiebung**

IL-12 bzw. IL-4 sind die beiden zentralen Th1 bzw. Th2 Differenzierung induzierenden Zytokine [204;225]. Von beiden Zytokine sind die Rezeptoren auf Th-Zellen bekannt und die intrazellulären Signalkaskaden, die zur Induktion der Effektorzytokine IFN $\gamma$  bzw. IL-4 führen, sind weitgehend aufgeklärt [226;227]. Ziel der Koimmunisierung mit IL-12 bzw. IL-4 war es, deren bekannte Th1 bzw. Th2 Differenzierung induzierenden Effekte in

einer Immunreaktion zu nutzen, und damit den Differenzierungsprozess der antigenspezifischen Th-Zellen *in vivo* zu modulieren.

Durch die Verwendung des Transfersystems konnten wir hier erstmals den Einfluss einer IL-12 bzw. IL-4 Koimmunisierung auf die Th-Zelldifferenzierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt untersuchen.

Es zeigte sich, dass pIL12 Koimmunisierung die Zahl der IFN $\gamma$  produzierenden Th-Zellen erhöhte. Gleichzeitig inhibierte es die Zahl an IL-4 produzierenden Th-Zellen stark, teilweise vollständig (vgl. 3.3.3). Dies war aufgrund folgender Literatur zu erwarten: Zum einen wurde der Th1 polarisierende Effekt von IL-12 *in vitro* [57;58;228;229] und *in vivo* [230-233] mehrfach gezeigt. Dabei verstärkt IL-12 vor allem die IFN $\gamma$  Produktion der Th-Zellen und inhibiert dadurch auch deren IL-4 Produktion [234]. Zum anderen wurden auch in DNA Immunisierungsstudien ähnliche Effekte gezeigt. So wurden erhöhte IFN $\gamma$  Werte nach IL-12 DNA Immunisierung im Serum [182;235] und in Milzzellen [182;236] gefunden. Auch in DNA Koimmunisierungsstudien führte IL-12 zu erhöhten IFN $\gamma$  und erniedrigten IL-4 Werten im Zellkulturüberstand nach Restimulation von Milzzellen [166;237].

IL-4 Koimmunisierung erhöhte ebenfalls die Zahl der IFN $\gamma$  produzierenden Th-Zellen und verringerte die Zahl der IL-4 Produzenten. Somit induzierte auch IL-4 eine Th1 Verschiebung, auch wenn der Effekt weniger stark ausgeprägt war als der des IL-12. Der Th1 polarisierende Effekt der pIL4 Koimmunisierung widersprach aber den Erwartungen: IL-4 ist das zentrale Th2 Polarisierung induzierende Zytokin [227] und die Entwicklung von Th2 Zellen hängt wesentlich von der Anwesenheit von IL-4 zu Beginn der Immunantwort ab [53;55;225]. IL-4 induziert *in vitro* [55;56] und *in vivo* [238;239] die IL-4 Produktion von Th-Zellen. Gleichzeitig inhibiert es die IFN $\gamma$  Produktion [240]. In DNA Koimmunisierungsstudien mit Antigen [166;167;205;209] und nach IL-4 DNA Koimmunisierung im Krankheitsmodell [168] wurden in Zellkulturüberständen nach Restimulation von Milzzellen erhöhte IL-4 und erniedrigte IFN $\gamma$  Werte gefunden.

Die Verstärkung der Arthritis durch IL-4 Koimmunisierung (vgl. 3.4.2) zeigte, dass die Th1 Verschiebung nicht nur ein kurzfristiges Phänomen ist, sondern dass diese auch längerfristig eine Wirkung hat. Grundlage hierfür ist, dass es vor allem Th1 Zellen sind, die die Arthritis induzieren und fördern, wie in unserer Arbeitsgruppe von Frank Hardung gezeigt. Die beobachtete Verstärkung einer Arthritis ist umso bemerkenswerter, als andere Gruppen die Th2 induzierenden Wirkung einer IL-4 DNA Koimmunisierung erfolgreich als Therapie in anderen Autoimmunmodellen einsetzten [168;171].

Somit wird am Beispiel der IL-4 DNA Koimmunisierung deutlich, dass die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht verstanden sind. Insbesondere muss berücksichtigt werden, dass nach DNA Immunisierung produziertes IL-4 nicht nur auf die Th-Zellen wirkt. Die ermittelten Antikörpertiter tragen noch zur Erhöhung der Komplexität bei. Diese passen im Falle der IL-12 Koimmunisierung zwar zur beobachteten Th1 Verschiebung, im Falle der IL-4 Koimmunisierung deuten sie aber auf eine Th2 Verschiebung hin.

Zusammengefasst kam es also nach IL-12 und IL-4 DNA Koimmunisierung zu einer Th1 Verschiebung. Diese war vor allem durch eine erhöhte Anzahl an IFN $\gamma$  produzierenden Th-Zellen charakterisiert und resultierte in einer Verstärkung einer Th1 abhängigen Arthritis. Die Antikörpertiter nach IL-4 Koimmunisierung entsprachen aber einer Th2 Verschiebung.

Somit stellen sich drei Fragen. 1.) Welcher Mechanismus führt nach pIL4 Koimmunisierung zur Induktion von Th1 Zellen? 2.) Warum finden andere Arbeitsgruppen nach pIL4 Koimmunisierung eine Th2 Verschiebung, wir aber eine Th1 Verschiebung. 3.) Warum passen die beobachtete Th-Zellpolarisierung und die Antikörperklassen nach IL-4 DNA Koimmunisierung nicht zusammen?

### 4.4.1 Antikörperklassen und Th-Zelldifferenzierung nach Koimmunisierung

Warum passen die beobachtete Th-Zellpolarisierung und die Antikörperklassen nach IL-4 DNA Koimmunisierung nicht zusammen?

Grundlage der Verknüpfung von Th-Zellpolarisierung und Antikörperisotypklasse ist die Beobachtung, dass Th-Zellen über die Sekretion von Zytokinen den Klassenwechsel kontrollieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Th2 Zellen Immunglobulin E und IgG1 Synthese verstärken und Th1 Zellen die Produktion von IgG2a fördern [75;76]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wird im Umkehrschluss häufig von erhöhten IgG1 bzw. IgE Titern auf Th2 und von erhöhten IgG2a Titern auf Th1 Differenzierung geschlossen.

Wir beobachteten nach pIL12 und pIL4 Koimmunisierung eine Th1 Verschiebung. Entsprechend der Abhängigkeiten des Klassenwechsels sollten nach beiden Immunisierungen daher erhöhte IgG2a Level und erniedrigte IgG1 und IgE Level zu finden sein. Das gefundene Bild entsprach im Falle von pIL12 zwar einer Th1 Verschiebung, im Falle von pIL4 aber einer Th2 Verschiebung. Dies bestätigt zwar in der Literatur veröffentlichte Daten, die in der Mehrzahl nach IL-4 DNA Koimmunisierungen erhöhte IgG1 bzw. verminderte IgG2a Titer

finden [166;206], passt aber im Falle von IL-4 nicht zu der hier beobachteten Th-Zellpolarisierung.

Die Gründe für diese Diskrepanz sind unklar. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Antikörpertiter nach pIL4 und pIL12 Koimmunisierung kommen die nach IL-4 Koimmunisierung noch deutlich vorhandenen IL-4 produzierende Th-Zellen in Betracht. Im Vergleich zur pIL4 Koimmunisierung waren nach pIL12 Koimmunisierung die IL-4 Produzenten erheblich stärker reduziert, teilweise sogar komplett verschwunden. Die kleine Anzahl an IL-4 Produzenten nach pIL4 Koimmunisierung könnte eventuell in Verbindung mit dem durch pIL4 direkt produzierten IL-4 ausreichen, um den beobachteten Klassenwechsel zu induzieren. Dies würde bedeuten, dass der Effekt der wenigen IL-4 Produzenten bzw. des aufgrund des pIL4 Vektors produzierten IL-4 im Bezug auf die B-Zellhilfe dominant gegenüber  $\text{IFN}\gamma$  ist. Auch die unterschiedliche Expansion der Th-Zellen bzw. deren Fähigkeit zur B-Zellhilfe könnten eine Rolle spielen.

Eine fundiertere Erklärung bleibt aber einer detaillierteren Untersuchung der Reaktion der B-Zellen auf die verschiedene Koimmunisierung vorbehalten.

### 4.4.2 Sind die Diskrepanzen zur vorhandenen Literatur durch die unterschiedliche Analysemethoden erklärbar?

Warum finden andere Arbeitsgruppen nach pIL4 Koimmunisierung eine Th2 Verschiebung, wir aber eine Th1 Verschiebung?

Die Antwort auf diese Frage muss in irgendeiner Form mit den unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zusammenhängen. In dieser Arbeit wurde die Th-Zelldifferenzierung nach DNA Koimmunisierung erstmals a) unter Verwendung der GeneGun, b) zu einem sehr frühen Zeitpunkt, c) nach einem Zelltransfer und d) mittels intrazellulärer Färbung d.h. auf Einzelzellebene untersucht.

Die Applikationsroute (GeneGun --- Nadelinjektion) kann eine Rolle spielen, da die DNA nach GeneGun Applikation lokal in der Haut vorliegt und die Antigenpräsentation im Wesentlichen in den peripheren Lymphknoten stattfindet. Nach intramuskulärer Nadelinjektion liegt die DNA vergleichsweise systemisch vor und die Antigenpräsentation geschieht wahrscheinlich durch andere Zelltypen und in anderen Organen (u.a. in der Milz). Produziertes IL-4 wirkt also je nach Route an unterschiedlichen Orten auf unterschiedliche APCs. Dies könnte zu den unterschiedlichen Ausprägungen der Th-Zellantwort führen. Nach



*Robinson et al.* (105) ist der Ort, an dem es nach DNA Immunisierung zur Antigenpräsentation kommt sogar der entscheidende die Th-Zelldifferenzierung beeinflussende Faktor.

Auch der Zeitpunkt der Analyse nach Immunisierung ist eine denkbarer Ursache. Wie bereits unter 4.3 diskutiert, verändert sich das Zytokinprofil nach einer einfachen GeneGun Immunisierung mit der Zeit. Ein anfänglicher Th1 Überschuss kann sich mit der Zeit in einen Th2 Überschuss verwandeln. Die Daten anderer Gruppen zur Th-Zellpolarisierung nach IL-4 Koimmunisierung wurden an vergleichsweise späten Zeitpunkten (Wochen nach der letzten Immunisierung) bestimmt. Es ist also denkbar, dass auch der hier beobachtete, anfängliche Th1 Shift nach pIL4 Koimmunisierung mit der Zeit „aufgebraucht“ wird, wenn kein weiterer Th1 „Trigger“ vorhanden ist. Dies würde erklären, warum wir im Gegensatz zu anderen eine Th1 Verschiebung sehen. Die von anderen beobachtete Th2 Verschiebung ist dadurch aber nicht erklärbar. Der Einfluss des Zeitpunktes scheint bei der pIL12 Koimmunisierung keine Rolle zu spielen, was durch die teils komplette Abwesenheit an IL-4 Produzenten erklärbar wird.

Der Zelltransfer und damit die transferierten Zellen spielen unserer Ansicht nach keine wesentliche Rolle. So ist es unwahrscheinlich, dass die Ursache in den transferierten Th-Zellen selbst liegt, da diese naiv sortiert waren und *in vitro* zu Th2 Zellen ausdifferenzieren konnten. Dass die transferierten Zellen tatsächlich naiv waren, zeigte sich unter anderem in der Abwesenheit an Effektorzytokinen derjenigen Zellen, die entnommen wurden, bevor sie zu proliferieren begannen (vgl. Abb.10).

Auch die Methode mit der die Th-Zellpolarisierung bestimmt wird, kann einen Einfluss haben. So haben *Creusot et al.* [196] eine Th2 Verschiebung beobachtet, wenn statt intrazellulärer Zytokinfärbung die ELISPOT Technik verwendet wurde. Da sich ein solcher Fehler aber auf alle Gruppen gleich auswirken sollte, ist dies als Ursache unserer Ansicht nach unwahrscheinlich. Die hier durchgeführte intrazelluläre Färbung hat aber den grundsätzlichen Vorteil, dass die Zytokinproduktion der Th-Zellen zweifelsfrei, direkt und auf Einzellzebene ermittelt werden kann.

Aufgrund der großen Zahl an möglichen Ursachen kann nicht befriedigend geklärt werden, welche Faktoren die entscheidenden sind. Die Art der Applikation und der Zeitpunkt der Analyse erklären unserer Ansicht nach am ehesten die Differenzen der in der Literatur gefundenen Th2 Verschiebung und der hier beobachteten Th1 Verschiebung nach pIL4 Koimmunisierung.

### 4.4.3 DCs vermitteln IL-4 induzierte Th1 Verschiebung

#### 4.4.3.1 Keine direkte Wirkung von IL-4 auf Th-Zellen

Eine direkte Wirkung von IL-4 auf die Th-Zellen schlossen wir aus, da es keine Hinweise gibt, dass IL-4 direkt Th1 Polarisierung induziert. Vielmehr ist bekannt, dass die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor auf Th-Zellen, Stat-6 und GATA-3 vermittelt, die Expression der Th2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 induziert [61;241].

Somit musste der Th1 Shift von einem anderen Zelltyp vermittelt werden. Hierfür kamen aufgrund folgender Überlegungen die DCs in Frage.

#### 4.4.3.2 DCs sind vermittelnder Zelltyp

DC sind die Zellen, die in der Haut vorhandenes Antigen aufnehmen, in den drainierenden Lymphknoten transportieren und T-Zellen präsentieren [242]. Dies gilt auch nach intramuskulärer [141-143] und nach GeneGun [144] DNA Immunisierung. Das DCs die Kapazität besitzen Th-Zellpolarisierung zu beeinflussen und insbesondere Th1 Polarisierung durch IL-12 Produktion zu induzieren, wurde vielfach gezeigt [49;211].

Die Beobachtung, dass der Th1 polarisierende Effekt von IL-4 bereits direkt nach dem Beginn der Expansion der Th-Zellen im drainierenden Lymphknoten implementiert war, schränkt den Einfluss anderer APCs aufgrund folgender Überlegung zusätzlich ein. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Th-Zellen (gezeigt nach Proteinimmunisierung) noch in den T-Zellgebieten der Lymphknoten [243]. Dort sind DCs die mit Abstand häufigsten MHC-II positiven Zellen [26]. Die beiden anderen potentiellen APCs Makrophagen und B-Zellen befinden sich außerhalb dieses Gebietes [21]. Folgerichtig konnte auch gezeigt werden, dass Th-Zellen erstmals in den Zellzyklus eintreten, während sie mit DCs in den T-Zellgebieten assoziiert sind [244].

Somit kommen im Wesentlichen die DCs als vermittelnder Zelltyp in Frage.

#### 4.4.3.3 Mechanismen der Induktion der IL-12 Produktion von DCs

Zwei Mechanismen sind denkbar, die in den hier durchgeführten Experimenten die IL-12 Produktion in DCs anregen und damit Th1 Polarisierung induzieren.

Zum einen wurde vielfach gezeigt, dass in bakterieller DNA vorkommende CpG Motive DCs aktivieren und zur Produktion von IL-12 anregen (vgl. 1.4.2.1).

Ein anderer Mechanismus wurde von *Hochrein et al.* [210] beschrieben. Diese Gruppe konnte zeigen, dass IL-4 DCs dazu bringt, die bioaktive Form (vgl. auch 4.4.3.6) des zentralen, Th1 Zytokins IL-12 zu produzieren. In ihren Augen stellt diese negative

Rückkopplung von IL-4 einen Mechanismus dar, der dazu dient dem Th2 polarisierenden Effekt von IL-4 entgegenzuwirken und so eine ausbalancierte Immunantwort sicherzustellen. *Biedermann et al.* [245] konnten zeigen, dass dieser Effekt auch *in vivo* eine Bedeutung hat.

### 4.4.3.4 CpG Motive sind nicht die Ursache der Th1 Polarisierung

Ein erster Hinweis, dass die CpG Motive keinen wesentlichen Einfluss hatten, ergab sich aus einem Vergleich der verschiedenen Koimmunisierungsvektoren. Es konnte weder eine Korrelation zwischen dem Anteil an CpG Motiven pro Base und der Th-Zellpolarisierung, noch zwischen der absoluten Zahl an CpG Motiven pro Vektor und der Th-Zellpolarisierung gefunden werden (vgl. Abb.20 und Daten nicht gezeigt).

Der zweite, entscheidende Hinweis ergab sich aus einer Inaktivierung der Transkription des IL-4 auf dem pIL4 Vektor. Dies führte zu einer Aufhebung des Effektes von IL-4. Damit war gezeigt, dass die CpG Motive alleine nicht für die pIL4 induzierte Th1 Verschiebung verantwortlich waren. Somit muss der von *Hochrein et al.* beschriebene Effekt von IL-4 auf die DCs als Ursache angesehen werden.

Es bleibt aber offen, ob *in vivo* produziertes IL-4 + Antigen + der Aktivierung der DCs durch den Beschuss mit Goldpartikeln [144] alleine ausreichen, oder ob die vorhandenen CpG Motive zusätzlich für den beobachteten Th1 Shift nötig sind. Da CpG Motive *in vitro* zusammen mit IL-4 einen deutlichen Effekt auf die IL-12 Produktion von DCs haben (vgl. 3.5.2), scheint dies wahrscheinlich.

### 4.4.3.5 Veränderte Zytokinproduktion in DCs nach IL-4 Koimmunisierung

Um den von *Hochrein et al.* beschriebenen Effekt von IL-4 auf die DCs direkt nachzuweisen, isolierten und analysierten wir DCs nach verschiedenen GeneGun Immunisierungen (pEmpty, pIL4 und pIL12). Wie gezeigt, unterschieden sich die DCs nach verschiedenen Immunisierungen weder in der Expression von CD11c noch in der von MHC-II. Auch war kein Unterschied in der Produktion von IL-12p40 sichtbar. IL-12p70 war nicht nachweisbar. Jedoch zeigte die veränderte TNF $\alpha$  Produktion der DCs nach der pIL4 Koimmunisierung, dass diese einen deutlichen Einfluss auf die DCs hat.

Das zentrale Th1 polarisierende Zytokin IL-12 liegt *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Formen vor. Die aktive und Th1 polarisierende Form ist das Heterodimer IL-12p70. Es besteht aus je einer p35 und p40 Untereinheit [246-248]. Zusätzlich zu dem Heterodimer tritt IL-12 auch noch als p40 Monomer und p40 Homodimer auf. Die beiden

letzteren Formen werden in großem Überschuss produziert [249;250]. Das Homodimer kann antagonistisch zu IL-12p70 wirken [251-253].

Es war nicht überraschend, dass der direkte intrazelluläre Nachweis von IL-12p70 in DCs *ex vivo* nicht gelang, da bisher keine solche Färbung veröffentlicht ist.

Auch die fehlenden Unterschiede in der IL-12p40 Färbung sind wenig aussagekräftig, da der Antikörper alle Formen vom IL-12 erkennt, inklusive des Homodimers. Der gleichmäßige Rückgang dieser IL-12 Färbung nach allen Immunisierungen, könnte eine Verringerung des antagonistisch wirkenden Homodimers anzeigen. Die Färbungen des Th1 Polarisierung induzierenden Zytokins IL-12 brachten also keine Erkenntnisse.

Die erhöhte TNF $\alpha$  Produktion nach pIL4 Koimmunisierung zeigte, dass IL-4 eine aktivierende bzw. maturierende Wirkung auf die DCs hatte. Reife DCs sind verstärkt in der Lage IL-12 zu produzieren [254]. Darüber hinaus verstärkt TNF $\alpha$  die aktivierungsabhängige IL-12 Rezeptorexpression auf Th-Zellen [226] und unterstützt die Reifung und Aktivierung von DCs [255]. Beides führt zu einer Verstärkung der Th1 Reaktion [256;257].

IL-4 induzierte die TNF $\alpha$  Produktion besonders in den MHC-II high DCs (vgl. Abb. 25). Diese DCs sind aufgrund der starken MHC Expression besonders potente APCs. Es sind auch diejenigen Zellen, die aus der Haut auswandern [258], und diejenigen Zellen, die nach GeneGun Immunisierung direkt transfiziert werden (vgl. 3.6.2).

### 4.4.3.6 DCs sind dominant gegenüber frei vorliegendem Zytokin

IL-4 beeinflusste die DCs. IL-12 wirkte dagegen auf die Th-Zellen. Dies wurde auch durch die zeitliche Abhängigkeit der beiden Koimmunisierungen deutlich (vgl. 3.5.4). Die Wirkung von IL-4 war maximal, wenn es zusammen mit dem Antigen appliziert wurde. Somit konnte es von Beginn an auf den Reifungsprozess der DCs in der Haut einwirken. Dagegen war der Effekt von IL-12 maximal, wenn es 24 Stunden nach dem Antigen appliziert wurde. Dies ist der Zeitpunkt, an dem die Th-Zellen im Lymphknoten das Antigen präsentiert bekommen (vgl. 3.2.2.2).

Die Mehrheit der Proteine nach GeneGun Immunisierung wird von residenten Zellen vor allem Keratinozyten exprimiert. Dies sollte auch hier für IL-4 und IL-12 gelten. Also musste in der Haut produziertes IL-12 seinen Weg in den Lymphknoten gefunden haben, um dort direkt auf die Th-Zellen zu wirken. IL-4 sollte dagegen bereits in der Haut auf die DCs wirken. Es gibt aber keinen Grund anzunehmen, dass lokal produziertes IL-4 nicht auch wie IL-12 seinen Weg in den Lymphknoten gefunden hat. Dort kann es zum einen auf die DCs wirken, und wie beobachtet Th1 Entwicklung fördern. Es sollte aber ebenfalls über den IL-4

Rezeptor direkt auf Th-Zellen wirken und so Th2 Entwicklung induzieren, wie es auch *in vitro* beobachtet wird.

Die Tatsache das pIL4 aber keine Th2 Polarisierung nach sich zog, ist umso erstaunlicher wenn man *in vitro* Daten heranzieht, die zeigen, dass der Th2 polarisierende Effekt von IL-4 dominant gegenüber dem Effekt von IL-12 ist [53]. Erklärbar ist dieser Widerspruch, wenn man, wie oben erwähnt, annimmt, dass IL-4 bereits im Gewebe den Reifungsprozess der DCs beeinflusst. Trifft die DCs dann im Lymphknoten auf die Th-Zelle, ist sie offensichtlich derart verändert, dass sie den Effekt von hier vorhandenem IL-4 ausschaltet. Dies könnte z.B. durch sehr hohe lokale Konzentrationen von IL-12 an der Immunologischen Synapse geschehen.

Die Arbeit von *Biederman et al.* [245] zeigte, dass der Effekt von IL-4 auf die DCs auch dann dominant ist, wenn rekombinantes IL-4 injiziert wird [245]. Da in diesem Fall wesentlich größere Mengen an IL-4 vorliegen, ist es also unwahrscheinlich, dass eine verstärkte Expression von IL-4 das Bild verändern würde.

Diese Überlegungen machen deutlich, dass für die Vorhersage der Wirkungen verschiedener Zytokine *in vivo* auch deren Lokalisation im Gewebe mit berücksichtigt werden muss.

### **4.5 Koimmunisierungen**

Langfristiges Ziel, in das diese Arbeit eingebettet ist, ist es, eine Möglichkeit zu finden, per DNA Koimmunisierung die Entwicklung von pro-inflammatorischen Th1 Zellen zu unterdrücken, und Th2, Tr3 oder T<sub>reg</sub> Zellentwicklung zu fördern. Dazu sollten in dieser Arbeit neben der Aufklärung der Mechanismen, die der DNA Immunisierung zugrunde liegen, auch vielversprechende Kandidatenmoleküle direkt getestet werden.

Nur wenige Koimmunisierungen zeigten jedoch die erwarteten Effekte. Insbesondere wurde in keinem Fall Th2 Polarisierung verstärkt. Dagegen hatten mehrere Koimmunisierungen einen Th1 verstärkenden Effekt. Auch konnten keine Th-Zellen induziert werden, die IL-10 produzierten. Weiterhin zeigten die membrangebundenen Moleküle im Vergleich zu den löslichen geringere Effekte.

#### **4.5.1 Membrangebundene Moleküle: B7.1; B7.2; B7h; Serrate**

Insgesamt zeigten die Koimmunisierungen mit den membranständigen Molekülen vergleichsweise schwache Effekte. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) führten zu einer leicht erhöhten Zahl an IFN $\gamma$  Produzenten. B7h (ICOS Ligand) und Serrate hatte keinen Effekt auf

die Th-Zelldifferenzierung. Keines der Moleküle dieser Gruppe beeinflusste die Expansion der Th-Zellen reproduzierbar.

Insbesondere von Serrate erhofften wir uns einen „regulatorischen“ Effekt, da gezeigt wurde, dass Serrate überexprimierende APCs die Entwicklung von T<sub>reg</sub>-Zellen induziert [201].

Für die drei Mitglieder der B7 Familie B71, B7.2 und auch B7h wurde gezeigt, dass deren Anwesenheit notwendig für die Th2 Differenzierung, aber nicht Th1 Differenzierung ist [199;200;259-261]. Eine Th2 Verschiebung wurde aber mit keiner der drei Koimmunisierungen erreicht.

### 4.5.2 „immunsupprimierende“ Zytokine: IL-10; vIL-10; TGFβ

Von den Koimmunisierungen dieser Gruppe inhibierte einzig vIL-10 die Expansion der Th-Zellen. Gleichzeitig erhöhte es die Zahl an IFNγ Produzenten. TGFβ hatte keinen Effekt. Auch IL-10 beeinflusste die Expansion der Th-Zellen nicht, erhöhte aber die Anzahl an IFNγ Produzenten.

In der Literatur wurde der inhibitorische Effekt von vIL-10 auf die Th-Zellproliferation mehrfach gezeigt [262]. Gleiches wurde auch für IL-10 [202;262;263] und TGFβ [203;264] gezeigt. Der fehlende inhibitorische Effekt von IL-10 und TGFβ ist umso überraschender, als beide bereits in DNA Immunisierungsstudien erfolgreich zur Immunsuppression eingesetzt wurden [169;172;265-267].

Der Unterschied in dem Effekt von vIL-10 und IL-10 mag dadurch erklärbar sein, dass IL-10 neben den hauptsächlich durch APCs vermittelten inhibitorischen Effekten auch stimulierend auf T-Zellen wirken kann. Diese Aktivität hat vIL-10 nicht [268;269].

### 4.5.3 „Th2 polarisierende“ Zytokine: IL-4; IL-6

Weder IL-4 noch IL-6 Koimmunisierung resultierten in einer verstärkten Th2 Antwort. IL-4 erhöhte im Gegenteil die Anzahl an IFNγ Produzenten.

Wie bereits ausführlich in 4.4 diskutiert, war der Th1 polarisierende Effekt von IL-4 völlig unerwartet. Von IL-6 wurde gezeigt, dass es als Kofaktor zu IL-4 die Th2 Zelldifferenzierung fördert [62;63;270]. Dieser Effekt von IL-6 ist jedoch umstritten.

Die beobachtete Th1 Entwicklung nach IL-4 Koimmunisierung wurde unter 4.4.3 näher erörtert und ist wahrscheinlich auf die Wirkung von IL-4 auf DCs zurückzuführen.

#### 4.5.4 „Th1 polarisierende“ Zytokine: IL-12; IFN $\gamma$

Von den als Th1 Kontrollvektoren mitgeführten Zytokinen IL-12 und IFN $\gamma$  induzierte IL-12 Th1 Polarisierung. IFN $\gamma$  zeigte dagegen keine Effekte.

Wie bereits in 4.4 diskutiert, ist IL-12 das zentrale für Th1 Polarisierung verantwortliche Zytokin. Daher entsprach der beobachtete Th1 polarisierende Effekt von pIL12 den Erwartungen. Interessanterweise unterdrückte pIL12 deutlich die IL-4 Produktion der spezifischen Th-Zellen. Dieser Effekt von IL-12 *in vivo* ist teils umstritten [10].

Im Gegensatz zu anderen DNA Koimmunisierungsstudien [166;167] konnten wir keinen Effekt von IFN $\gamma$  zeigen. Da die Anwesenheit von IFN $\gamma$  aber nicht als entscheidend für Th1 Polarisierung angesehen wird [51;52;61;271;272], war dies bedingt überraschend.

#### 4.5.4 „immunstimulierende“ Zytokine: IL-2, IL-15, IL-6

IL-15 und IL-6 verstärkten die Th-Zellexpansion, wobei IL-15 zusätzlich Th1 Zellen induzierte. IL-2 inhibierte dagegen die Expansion der Th-Zellen und deren Potential Zytokine zu produzieren.

Für IL-6 wurde in DNA Immunisierungsstudien gezeigt, dass es die Wirksamkeit der Immunisierung verstärken kann [181]. Daher lag die beobachtete verstärkte Expansion im Rahmen der Erwartungen.

IL-15 wurde als IL-2 ähnlicher Wachstumsfaktor für T-Zellen identifiziert, wobei es im Gegensatz zu IL-2 aber anti-apoptotisch wirkt und IL-2 vermittelten Aktivierungs-Induzierten-Zell-Tod (AICD) inhibiert [273-276]. Somit entspricht die pIL15 induzierte Verstärkung der Expansion den Erwartungen.

IL-2 ist ein wichtiger T-Zellwachstumsfaktor [277]. Daher wurde auch nach pIL2 Koimmunisierung eine verstärkte Expansion der spezifischen Th-Zellen erwartet. Neuere Einsichten in die Funktion von IL-2 zeigen jedoch, dass IL-2 im Gegensatz zu IL-15 auch immunsupprimierende Funktionen hat [278].

So wurde gezeigt, dass IL-2 eine wichtige Rolle beim AICD hat. IL-2 defiziente Tiere entwickeln lymphoide Hyperplasie und haben hohe Autoantikörpertiter. Neuere Daten zeigen darüber hinaus eine wichtige Rolle von IL-2 für die Funktion regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>) [279]. Diese T<sub>reg</sub>-Zellen sind unter anderem durch eine verminderten Expansion und Zytokinproduktion charakterisiert. Ob die IL-2 Koimmunisierung tatsächlich zur Expansion von T<sub>reg</sub>-Zellen geführt hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Somit deuten die beobachtete Effekte von IL-2 auf ein immunsupprimierendes Potential von IL-2 im Zusammenhang mit DNA Immunisierung hin.

## 4.6 Zusammenfassung Koimmunisierungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur die Koimmunisierung mit pIL12 und pIL15 voll den Erwartungen entsprachen. Die Mehrzahl der Koimmunisierungen hatten kaum oder teils unerwartete Effekte. Insbesondere konnte weder Th2 Polarisierung induziert werden, noch zeigten die beiden klassischen immunsupprimierenden Moleküle TGF $\beta$  und IL-10 die erwarteten Effekte. Nur die inhibierte Expansion nach pIL2 und nach pvIL10 Koimmunisierung wiesen auf potentiell immunsupprimierende Wirkungen hin. Die membranständigen Moleküle hatten vergleichsweise geringe Effekte.

Was können die Gründe für den zum großen Teil unerwarteten Ausgang der Koimmunisierungen sein?

Eine mögliche Ursache kann die geringe Anzahl direkt transfizierter DCs sein. Wie wir hier zeigen konnten, sind weniger als 30 DCs in einem drainierenden Lymphknoten zu finden, die eine detektierbare Menge an Reporterprotein produzieren. Etwa die Hälfte dieser direkt transfizierten DCs sind doppelt transfiziert (vgl. Abb.28), so dass fehlende Koexpression als Ursache ausgeschlossen werden kann. Wenn die große Mehrzahl an DCs Antigen aufnimmt und präsentiert, kommen die wenigen direkt transfizierten Zellen und deren kotransfiziertes Protein nicht zum Tragen. Dies würde in besonderem Maße die schwachen Effekte der membranständigen Moleküle erklären. Diese Hypothese wird von den Beobachtungen von *Corr et al.* [139] und *Cho et al.* [146] gestützt. Diese Arbeiten sehen in der Aufnahme von in vivo produziertem Antigen durch DCs und nicht in den direkt transfizierten DCs den für die Immunantwort entscheidenden Faktor. Diese Ansicht ist jedoch umstritten. *Porgador et al.* [144] sehen die direkt transfizierten DCs als wesentlich verantwortlich für die Induktion der Immunantwort. *Garg et al.* [280] zeigen, dass etwa 10% der DCs im drainierenden Lymphknoten nach GeneGun Immunisierung direkt transfiziert sind. Dieser hohe Wert ist darauf zurückzuführen, dass auch Zellen, die das transfizierte Gen nur transient exprimiert haben und Zellen, die sehr geringe Mengen an Protein produzieren, positiv erscheinen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass diese Zellen sich bei der Antigenpräsentation im Lymphknoten wie nicht transfizierte Zellen verhalten.

Der unerwartete Ausgang der pIL4 Koimmunisierung zeigt zusammen mit dem erwarteten Ausgang der pIL12 Koimmunisierung, dass die produzierten Zytokine sowohl lokal in der Haut, als auch im drainierenden Lymphknoten auf unterschiedliche Zelltypen wirken. Dabei sind insbesondere die möglichen Effekte auf die DCs zu berücksichtigen, wie das Beispiel IL-4 zeigte. Dennoch überraschend ist aber, dass IL-10, welches *in vitro* die Produktion von bioaktivem IL-12 durch DCs hemmt (Daten nicht gezeigt + [202]) und auch



auf Th-Zellen sicher nicht Th1 polarisierend wirkt, in unseren *in vivo* Experimenten Th1 polarisierend war. Dies macht deutlich, dass weitere, derzeit nicht bekannte Mechanismen eine Rolle spielen.

Auch die langfristigen Effekte der Koimmunisierungen sind noch nicht ausreichend verstanden. So verstärkte pIL4 Koimmunisierung die antigeninduzierte Arthritis, an deren Pathogenese Th1 Zellen bekanntermaßen beteiligt sind. Dies ist zwar durch die ebenfalls gefundene Th1 Verschiebung durch pIL4 erklärbar, passt aber weder zu den ermittelten Antikörpertitern (die auf eine Th2 Verschiebung hindeuteten) noch zu den bisher veröffentlichten langfristigen Effekten von IL-4 DNA Koimmunisierungen (die Th2 Verschiebung und gemilderte Autoimmunerkrankungen zeigen) (vgl.4.4.1). Dies macht deutlich, dass die nach DNA Koimmunisierung produzierten Zytokine neben ihrer unmittelbaren Wirkung am Beginn der Immunreaktion noch weitere Effekte z.B. auf B-Zellen haben.

### **4.7 Exkurs: Ist CD69 an der Emigration aktivierter Th-Zellen aus dem Lymphknoten ursächlich beteiligt?**

CD69 wird von T-, B-, NK-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen aktivierungsabhängig exprimiert und wird daher vielfach als Aktivierungsmarker verwendet. Über seine Funktion ist aber bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Korrelation zwischen der CD69 Expression und der Emigration expandierter Th-Zellen aus dem Lymphknoten gezeigt: 2-3 Tage nach einer Immunisierung begannen Th-Zellen sich in den drainierenden Lymphknoten zu teilen. Dabei exprimierten alle sich teilenden Zellen CD69 stark. Hatten die Zellen zwischen Tag 3-4 mehr als vier Zellteilungen durchlaufen, wurden sie zum Teil wieder CD69 negativ. Diese expandierten und CD69 negativen Zellen tauchten zeitgleich auch in der Milz auf. Zellen die sich ein- bis dreimal geteilt hatten, fehlten zu diesen frühen Zeitpunkten in der Milz. Auch wurden zu keinem Zeitpunkt CD69 positive Th-Zellen im Blut gefunden. Aufgrund des Fehlens der frühen Generationen ist eine zur Proliferation führende Antigenpräsentation in der Milz nach GeneGun Immunisierung innerhalb der ersten Tage unwahrscheinlich. Dies bedeutet, dass die in der Milz auftauchenden späten Generationen (mehr als vier Zellteilungen) nicht in der Milz expandiert sind, sondern in sie eingewandert sind. Das Auftreten dieser migrierten (CD69 negativen) Th-Zellen in der Milz korreliert also direkt mit dem Auftreten derjenigen Th-Zellen im drainierenden Lymphknoten, die nach Expansion CD69 wieder herunterreguliert hatten.

Korreliert die CD69 Expression nur zufällig mit der Emigration aktivierter Th-Zellen aus den drainierenden Lymphnoten, oder hat CD69 selbst eine Funktion?

Wie bereits erwähnt, ist wenig über die Funktion von CD69 bekannt. CD69 defiziente (CD69<sup>-/-</sup>) Mäuse haben keinen ausgeprägten Phänotyp [280]. Insbesondere sind keine wesentlichen Veränderungen in der T-Zellentwicklung zu beobachten. Auch proliferieren T-Zellen aus CD69<sup>-/-</sup> Mäusen *in vitro* nach Stimulation normal, und die zytolytische Kapazität von CD8<sup>+</sup> Zellen ist ebenfalls unverändert. CD69<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln normale Antikörpertiter nach Immunisierung. CD69<sup>-/-</sup> Mäuse unterscheiden sich jedoch geringfügig in der B-Zellentwicklung vom Wildtyp (WT). Zwei Arbeiten sind publiziert, in denen in CD69<sup>-/-</sup> Mäusen nach Induktion einer Immunreaktion ein Phänotyp gefunden wurde [281;282].

In der Arbeit von *Murata et al.* [281] waren CD69<sup>-/-</sup> Mäuse vor einer Antikörper induzierten Arthritis geschützt. Dieser Schutz ging mit der Abwesenheit von Neutrophilen im Gelenk einher. Ein verändertes Verhalten der T-Zellen konnte aber nicht gezeigt werden.

Eine direkten Zusammenhang zwischen CD69 und T-Zellverteilung fanden *Esplugues et al.* [282]. Sie beobachteten eine Anreicherung von NK- und T-Zellen am Ort der Tumordinokulation und in der Milz der CD69<sup>-/-</sup> Mäuse. Diese Anreicherung machten sie für die ebenfalls in den CD69<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtete verbesserte Tumorregression verantwortlich. Als Ursache für diese Anreicherung sahen sie jedoch nicht ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen, sondern eine verringerte Apoptoserate und eine durch fehlendes CD69 Signalling reduzierte TGFβ Produktion.

Neben diesen beiden Arbeiten mit CD69<sup>-/-</sup> Tieren gibt es eine Arbeit in der CD69 konstitutiv in Thymozyten und reifen T-Zellen exprimiert wird (CD69 Tg). *Feng et al.* [283] zeigen darin, dass CD69 eine zentrale Rolle bei der Emigration von reifen Thymozyten aus dem Thymus hat. In Tieren die CD69 konstitutiv exprimieren akkumulieren die reifen CD4 bzw. CD8 einzelpositiven Thymozyten im Thymus und fehlen gleichzeitig in der Peripherie. *Feng et al.* zeigen weiterhin, dass die Reifung der Thymozyten in den CD69 Tg Tieren normal ist. Auch haben transferierte CD4 einzelpositive Thymozyten aus CD69 Tg Mäusen nach adoptivem Transfer in WT Tiere ein normales Wanderungsverhalten, wobei sie schneller aus dem Blut verschwinden.

Die Beobachtung von *Feng et al.*, dass CD69 eine aktive Rolle bei der Emigration von T-Zellen aus dem Thymus spielt, macht einen solchen Zusammenhang auch in dem hier beobachteten Fall wahrscheinlich. Folgendes Konzept ergibt sich: Naïve, CD69 negative Th-Zellen wandern in den Lymphknoten. Erfahren sie dort keine Aktivierung, bleiben sie CD69

negativ und können den Lymphknoten wieder verlassen. Werden sie aber aktiviert, regulieren sie die Expression von CD69 hoch. Dadurch sind sie nicht mehr in der Lage, den Lymphknoten zu verlassen. Nun können sie expandieren und differenzieren. Nachdem sie sich mehrfach geteilt haben und eine erste Prägung bzw. Differenzierung durchlaufen haben, wird die CD69 Expression wieder heruntergefahren. Erst dann sind die Th-Zellen in der Lage, den Ort ihrer Aktivierung wieder zu verlassen.

Diese „Rückhaltefunktion“ von CD69 könnte einige der oben erwähnten Beobachtungen erklären. So wäre das von *Feng et al.* beobachtete schnellere Verschwinden der CD69<sup>tg</sup> Zellen aus dem Blut dadurch erklärbar, dass die Zellen nicht mehr rezirkulieren, da sie in den sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten werden. Die von *Esplugues et al.* beschriebene Anreicherung der CD69<sup>-/-</sup> T-Zellen im Tumorgewebe und in der Milz wären dadurch zu erklären, dass die T-Zellen nach ihrer Aktivierung nicht in den Lymphknoten zurückgehalten werden.

Das Fehlen eines Phänotyps in den CD69<sup>-/-</sup> Mäusen lässt die Frage nach der Funktion dieser „Rückhaltefunktion“ aufkommen.

Die von *Esplugues et al.* beobachtete Anreicherung von T-Zellen am Ort des Tumorstwachstums in den CD69<sup>-/-</sup> Tieren und die ebenfalls vorgeschlagene regulative Aktivität von CD69 könnten auf folgende Funktion hinweisen: Die „Rückhaltefunktion“ könnte ein Mechanismus darstellen, der verhindert, dass z.B. nicht ausdifferenzierte bzw. noch aktivierte Th-Zellen das Organ, in dem sie aktiviert werden, frühzeitig verlassen.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, diese Hypothesen zu validieren.

CD69 scheint also an der Emigration aus dem Lymphknoten direkt beteiligt zu sein, indem es aktivierte Th-Zellen in lymphoiden Organen zurückhält. Die vollständige Differenzierung der Th-Zellen könnte durch diese Funktion sichergestellt werden. In jedem Fall ist die CD69 Färbung im Zusammenhang mit der CFSE Färbung ein wertvolles Hilfsmittel, zur Lokalisation des Ortes der initialen Th-Zellaktivierung.