

## 1 EINLEITUNG

Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen von DNA Immunisierungen auf Th-Zelldifferenzierung und die Möglichkeit, diese Differenzierung gezielt zu beeinflussen. Damit soll die Arbeit dazu beitragen, Mittel und Wege zu finden, ein fehlgeleitetes Immunsystem wieder auf den „richtigen“ Weg zu bringen.

### 1.1 Immunität

Alle vielzelligen Tiere haben Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, „Selbst“ von „nicht Selbst“ zu unterscheiden und sich so vor Mikroorganismen, Parasiten und Viren zu schützen. Also besitzen im Prinzip alle Vielzeller eine Art „Immunsystem“. Diese Erkennungs- und Abwehrsysteme haben sich von den Schwämmen bis hin zu den Wirbeltieren (Vertebraten) in vielen verschiedenen Ausprägungen gebildet [1]. Trotz der unterschiedlichen Ausprägungen gibt es aber Mechanismen (z.B. Phagozytose), konservierte Signalkaskaden (z.B. NF- $\kappa$ B Signalweg) und viele Moleküle (z.B. „Toll-like-receptor“ (TLR) Familie), die in den unterschiedlichsten Entwicklungslinien einschließlich der Wirbeltiere wiederzufinden sind [2]. Im Gegensatz zu allen anderen Stämmen besitzen ausschließlich die Wirbeltiere ein adaptives oder erworbenes Immunsystem. Dessen zelluläre Basis sind T- und B-Zellen. Nach *Du Pasquier* [1] gibt es keinen überzeugenden Fall von spezifischem Gedächtnis, klonaler Expansion oder somatischer Produktion eines Rezeptorrepertoires in Invertebraten.

Der Erfolg beider Immunsysteme wird durch zwei einfache Überlegungen deutlich. Zum einen hat die große Mehrzahl aller Arten, die die Erde bevölkern, nämlich Pflanzen und alle Vielzeller außer den Wirbeltieren nur ein angeborenes Immunsystem zur Verfügung und kommt damit gut zurecht. Zum anderen erlaubte erst das Auftreten des erworbenen Immunsystems die Entwicklung so komplexer Lebensformen, wie sie unter den Wirbeltieren zu finden sind. Dabei ist das erworbene Immunsystem aber immer nur ein zusätzlicher Schutzmechanismus, der nicht ohne das angeborene System existiert und eng mit diesem verzahnt ist. Janeway&Medzhitov [3;4] postulieren, dass die Entscheidung auf ein Antigen zu reagieren auch in Wirbeltieren im wesentlichen durch das angeborene Immunsystem erfolgt.

Mit dem Auftreten des adaptiven Immunsystems sind aber auch Allergien und Autoimmunität verbunden. Diese sind das Ergebnis von Immunantworten gegen nicht pathogene Antigene. Trotz vieler Versuche ist es nicht gelungen ähnliche Effekte in Invertebraten oder Pflanzen zu induzieren [3]. Dies zeigt, dass das adaptive Immunsystem für

diese Krankheiten verantwortlich ist. Es bedeutet aber nicht, dass das angeborene Immunsystem an solchen pathologischen Prozessen nicht beteiligt ist. Ziel vieler Anstrengungen in der Immunologie ist das Verständnis der Grundlagen, die hinter diesen Immunpathologien stehen und die Möglichkeiten, mit Hilfe dieses Verständnisses diese zu behandeln.

## 1.1.1 Angeborene Immunität

Resistenz gegenüber Infektionen wird auch in Säugetieren zum großen Teil (nach Zinkernagel >95%) [5] durch angeborene Mechanismen gewährleistet. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass Defekte im angeborenen Immunsystem meist letal sind [3]. Die erste große Barriere, die Krankheitserreger durchbrechen müssen, um eine Infektion im Wirt etablieren zu können, sind die Epithelzellen, die die inneren (z.B. Gastrointestinal-, respiratorischer und Urogenitaltrakt) und äußeren Körperoberflächen (Haut) bedecken. Hat ein Erreger diese erste Barriere durchbrochen, greifen weitere Mechanismen des angeborenen Immunsystems.

Das zentrale Problem, das nun vom Immunsystem gelöst werden muss, ist das Erkennen des Erregers. Hierzu benutzt das angeborene Immunsystem eine Vielzahl an „pattern recognition receptors“ (PRR), die auf der Zelloberfläche (z.B. TLR Familie) oder intrazellulär vorliegen oder von Zellen sekretiert werden (Übersicht: [3]). Diese PRR erkennen definierte Strukturen von verschiedensten Mikroorganismen: die „pathogen associated molecular pattern“ PAMPs. PAMPs sind essentielle Strukturen von Mikroorganismen, ohne die diese nicht existieren können. Sie sind innerhalb einer Klasse von Mikroorganismen konserviert [4]. Das angeborene Immunsystem erkennt über die PRR nicht nur ob ein Eindringling vorliegt, sondern auch die Art des Erregers und kann so eine passende Immunantwort induzieren. Hat das angeborene Immunsystem einen Eindringling erkannt, so wird dieser meist in den ersten Stunden erfolgreich bekämpft. Dies geschieht durch vielerlei Mechanismen, die sowohl humoraler als auch zellulärer Natur sind.

Die PRR, die im angeborenen Immunsystem „Selbst“ von „nicht Selbst“ unterscheiden, sind im Laufe der Evolution optimiert worden. Dies hat zwei wichtige Konsequenzen. Zum einen wurden Strukturen, die fälschlicherweise „Selbst“ erkennen, negativ selektiert. Wie erfolgreich dieser Prozess war, zeigt sich darin, dass in Invertebraten keine Autoimmunprozesse nachweisbar sind. Die zweite Konsequenz ist, dass diese PRR nur konservierte Strukturen (PAMP) erkennen können. Dadurch ist zum einen die Anzahl

erkannter Strukturen begrenzt, und zum anderen können sich Erreger auf diese Abwehrmechanismen einstellen und entsprechende Gegenmaßnahmen ergreifen.

### 1.1.2 Erworbene Immunität

Das erworbene Immunsystem, dessen Hauptspieler B-Zellen und T-Zellen sind, hat eine völlig andere Strategie, „Selbst“ von „nicht Selbst“ zu unterscheiden. Diese Strategie hat einige prinzipielle Vor- aber auch Nachteile, auf die weiter unten eingegangen wird. Zuerst sei aber das Prinzip, mit dem das erworbenen Immunsystem arbeitet, erläutert.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem werden die Spezifitäten der Rezeptoren, die für die Antigenerkennung des adaptiven Immunsystems zuständig sind, nicht vererbt, sondern vielmehr erhält jede T- und B-Zelle einen „do-it-yourself kit“. Dieser enthält zum einen viele verschiedene Bausteine, aus denen die Rezeptoren zusammengesetzt werden und zum anderen die Werkzeuge, die für diesen Zusammenbau nötig sind. Die Bausteine sind die V- (variable), die D- (diversity) und die J- (joining) Gensegmente, von denen jeweils viele verschiedene Kopien vorliegen. Diese werden mit Hilfe der entsprechenden Werkzeuge (V(D)J Rekombinasekomplex, RAG-1&2, TdT u.a.) miteinander kombiniert und ergeben so die entsprechenden Rezeptoren: Immunglobuline im Falle der B-Zellen und T-Zellrezeptoren im Falle der T-Zellen. Dabei wird eine hohe Diversität durch folgende Mechanismen erreicht: Verfügbarkeit vieler V-, D-, J-Gene; Kombinierbarkeit der V-, D-, J-Gene; junktionale Diversität, somatische Mutationen, Kombinierbarkeit der verschiedenen Rezeptorketten. Durch diese Mechanismen ergeben sich theoretisch  $>10^{12}$ , tatsächlich jedoch  $\sim 10^4$  [6] verschiedene Spezifitäten. Jede T- und B-Zelle produziert mit Hilfe dieses „Kits“ ihren eigenen Rezeptor einer beliebigen Spezifität. Da diese Prozesse ausschließlich somatischer Natur sind, werden die Rezeptorspezifitäten nicht an die Nachkommen weitergegeben. Dies hat folgende Konsequenzen.

### 1.1.3 Konsequenzen der erworbenen Immunität

Die prinzipiellen Vorteile, die dieses System so erfolgreich werden ließen, sind darin zu sehen, dass jedes denkbare Antigen und damit jeder Erreger erkannt werden kann. Des Weiteren können Erreger sich nicht durch Änderung ihres „Aussehens“ der Erkennung entziehen, da die Spezifitäten der Rezeptoren nicht vererbt werden. Sie können es aber auch diesem System schwer machen (z.B. HIV, Influenza).

Neben diesen Vorteilen hat das System auch zwei prinzipielle Nachteile, die aber elegant gelöst sind. Da ist zum einen das Problem der geringen Anzahl an Zellen einer

Spezifität. Darauf wird direkt im Anschluss eingegangen. Anschließend wird das Problem der Unterscheidung von „Selbst“ und „nicht Selbst“ erläutert.

Der erste Nachteil ist in der Zellzahl zu sehen. Wenn es auch theoretisch beliebig viele unterschiedliche Spezifitäten gibt, so ist doch jede Spezifität an mindestens eine Zelle gebunden. Da die Zellzahl im Organismus aber begrenzt ist, bedeutet dies je mehr Spezifitäten, desto weniger Zellen einer Spezifität und umgekehrt. Träfen Erreger und spezifische Zelle direkt beispielsweise in der Haut aufeinander, wäre es für den Erreger ein Leichtes, die wenigen spezifischen Zellen auszuschalten. Dieses Problem hat das adaptive Immunsystem unter Zuhilfenahme des angeborenen gelöst. Dabei ist das adaptive System darauf angewiesen, dass die Infektion in den ersten Tagen vom angeborenen System in Schach gehalten wird. Die spezifischen Zellen des adaptiven Systems befinden sich an Orten, die im Normalfall nicht sofort vom Erreger befallen werden, den sekundären lymphoiden Organen. Somit haben sie zu frühen Zeitpunkten der Infektion noch keinen direkten Kontakt zum Erreger. Um sich aber dennoch auf den Eindringling einstellen zu können, bekommen sie Peptidfragmente von Erregerproteinen auf spezialisierten Strukturen, den MHC Molekülen präsentiert. Dies geschieht zu Beginn der Immunreaktion im Wesentlichen durch Zellen des angeborenen Immunsystems, den Antigen-präsentierenden-Zellen (APC). Deren wichtigste Vertreter sind dendritische Zellen und Makrophagen. Dieser sehr komplexe Präsentationsprozess kann nach heutigem Verständnis den weiteren Verlauf der Immunreaktion entscheidend mit beeinflussen [7-11]. Für die einzelne spezifische T- oder B-Zelle bedeutet die Antigenpräsentation (im Falle einer „normalen“ Immunreaktion), dass sie aktiviert wird, ohne Gefahr zu gehen vom Erreger angegriffen zu werden. Sie hat nun die Gelegenheit, sich durch vielfache Zellteilung so stark zu vermehren, dass sie bzw. ihre Nachkommen in der Lage sind, den Erreger erfolgreich zu bekämpfen. Dieser Prozess (die klonale Expansion) ist eine fundamentale Eigenschaft des adaptiven Immunsystems.

Die zweite negative Konsequenz, die sich aus der Art und Weise ergibt, wie das adaptive Immunsystem seine Antigenrezeptoren im „do-it-yourself“ Verfahren herstellt, ist die Problematik der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „nicht Selbst“. Im angeborenen Immunsystem wurden im Laufe der Evolution, Antigenrezeptoren die potentiell „Selbst“ erkennen, aussortiert. Somit gilt für die Antigenrezeptoren des angeborenen Systems, dass alles was sie „erkennen“ sicher fremd ist. Dies ist beim adaptiven Immunsystem keineswegs der Fall. Vielmehr werden viele T- und B-Zellen Antigenrezeptoren produzieren, die mehr oder weniger gut körpereigene Strukturen erkennen. Um diese potentiell selbstreaktiven Zellen zu eliminieren oder zumindest unschädlich zu machen, hat das Immunsystem mehrere

Kontrollmechanismen eingerichtet. Diese Kontrollmechanismen führen dazu, dass der Pool an reifen T- und B-Zellen tolerant gegen „Selbst“ ist. Grob lassen sich dabei die beteiligten Mechanismen in zentrale und periphere Toleranz unterscheiden. Der größte Teil der selbstreaktiven Zellen wird im Rahmen der zentralen Toleranz eliminiert. Dies geschieht durch negative Selektion derjenigen Zellen, die an bestimmten Kontrollpunkten in ihrer Entwicklung Selbstantigene erkennen. Zellen, die diesen zentralen Toleranzmechanismen entgehen, werden über periphere Mechanismen in Schach gehalten.

Diese Mechanismen der peripheren und zentralen Toleranz zu verstehen, ist eine der großen Herausforderungen der medizinischen Grundlagenforschung. Denn wenn diese Mechanismen nicht ausreichend funktionieren, kommt es nach heutigem Verständnis zu Autoimmunkrankheiten. Es besteht die Hoffnung, dass sich mit zunehmender Erkenntnis der beteiligten Mechanismen Wege eröffnen, solche ungewollten Effekte gezielt zu beeinflussen.

## **1.2 Th-Zellen (CD4+ Zellen)**

Periphere T-Zellen lassen sich über den CD3 Komplex identifizieren. Etwa 90% dieser Zellen tragen den  $\alpha/\beta$  T-Zellrezeptor, gegenüber ~10%, die einen  $\gamma/\delta$  Rezeptor haben. Reife T-Zellen in der Peripherie lassen sich anhand der Korezeptoren CD4 und CD8 einteilen. CD8 positive T-Zellen, auch zytotoxische Zellen genannt, erkennen Antigene, die vom ubiquitär exprimierten MHC-I präsentiert werden. Ihre Hauptfunktion ist die Abtötung infizierter Zellen. Im Gegensatz dazu erkennen die CD4 exprimierenden Helfer-T-Zellen (im Folgenden Th-Zellen genannt) Antigenfragmente, die vom MHC-II Molekül präsentiert werden. Der MHC-II Rezeptor ist im Wesentlichen auf spezialisierten Zellen, den Antigen-Präsentierenden-Zellen (APC) zu finden. Th-Zellen haben eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunantwort. Dabei ist die Sekretion von Zytokinen durch die Th-Zellen ein wesentlicher Mechanismus, über den die Immunantwort moduliert wird. Th-Zellen greifen an vielen Stellen insbesondere in die adaptive Immunreaktion ein. So kontrollieren sie zum großen Teil die Antikörperproduktion durch B-Zellen, nehmen wichtigen Einfluss auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen und beeinflussen Granulozyten, Eosinophile und Makrophagen entscheidend.

### **1.2.1 Entwicklung und Aktivierung von Th-Zellen**

Im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildete T-Zell-Vorläufer wandern über die Blutbahn in die subkapsuläre Zone des Thymus ein. Dort reifen sie heran, wobei sie eine positive und eine negative Selektion durchlaufen. Die positive Selektion überstehen nur solche Zellen, die an körpereigene MHC-II Moleküle binden können

[12]. Die darauf folgende negative Selektion (klonale Deletion) filtert potentiell autoreaktive Zellen [13;14] und ist wesentlicher Mechanismus der zentralen Toleranz.

Bluestone&Abbas [15] postulieren, dass der Mechanismus der klonalen Deletion für periphere Antigene nur wenig effektiv sein kann, da diese Selbstantigene wohl nur wenig stark auf nur wenigen Epithelzellen exprimiert werden. Stattdessen wird als alternativer Weg der Selbsttoleranz die Generierung von T<sub>reg</sub>-Zellen durch Kontakt mit im Thymus exprimierten Selbstantigenen oder im Thymus von speziellen DC präsentierten Selbstantigenen vorgeschlagen [16].

Die große Mehrheit der Th-Zellen verlassen den Thymus als naive Zellen. Diese Zellen exprimieren das Selektin CD62L stark. CD62L ermöglicht es den Th-Zellen die Blutbahn zu verlassen und in die sekundären lymphatischen Organe einzuwandern [17]. Aktivierte Th-Zellen verringern die CD62L Expression. Daher wird CD62L auch als Marker für naive Zellen verwendet. Naive Th-Zellen befinden sich im Wesentlichen in den sekundären lymphatischen Organen [18-20]. Dort sind sie in den T-Zellabhängigen Regionen der Lymphknoten (und der Milz) zu finden [21]. Sie werden, wenn sie ihr spezifisches Antigen im richtigen Kontext präsentiert bekommen, aktiviert und reagieren mit klonaler Expansion. Geschieht dies nicht, verlassen sie nach etwa einem Tag den Lymphknoten und wandern in ein anderes lymphatisches Organ ein.

Die Aktivierung naiver Th-Zellen erfolgt durch APCs. Unter den APCs können dendritischen Zellen (DCs) naive Th-Zellen besonders gut stimulieren [22-24]. *In vivo* sind DCs die entscheidenden, Immunantwort initiiierenden Zellen [25]. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass DCs mit Abstand die größte MHC-II positive Population in den T-Zellabhängigen Regionen stellen [26]. Andere potentielle APCs (B-Zellen und Makrophagen) befinden sich außerhalb dieser Zone [21]. Die Aktivierung der Th-Zellen erfolgt über einen engen Kontakt zwischen T-Zelle und DC. Um eine optimale Stimulation zu erreichen, wird eine immunologische Synapse zwischen Th-Zelle und DC gebildet, in deren Zentrum T-Zellrezeptoren und kostimulatorische Moleküle konzentriert werden [27]. Neben dem Signal, das vom T-Zellrezeptor in die Zelle geleitet wird, benötigt eine naive Th-Zelle ein zweites Signal um aktiviert zu werden und als Konsequenz klonal zu expandieren [28-30]. Wichtige an diesem Prozess beteiligte kostimulatorische Moleküle sind CD80 und CD86 [31-34]. Diese binden an das von naiven Th-Zellen exprimierte CD28 und induzieren damit die Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 [35-37]. Ein weiteres wichtiges kostimulatorisches Signal erreicht die Th-Zelle über die CD40/CD40L Interaktion [38-40]. Im Rahmen dieses

Aktivierungsprozesses kann die DCs der Th-Zelle Instruktionen mit auf den Weg geben, die das Schicksal der Th-Zelle entscheidend mit beeinflussen. So kann die Präsentation von Antigen durch DCs einerseits neonatale T-Zelltoleranz [41] und periphere Toleranzen [42-44] brechen. Antigenpräsentation durch DCs kann aber andererseits auch zentrale und periphere Toleranzen induzieren [45-48]. Auch wurde vielfach gezeigt, dass DCs die Polarisierung von Th-Zellen beeinflussen (Übersicht: [10;49]; vgl. auch unten). Die Einflussnahme der DCs auf die Th-Zellen geschieht nach heutigem Verständnis sowohl mittels membranständiger Kostimulatoren (z.B. CD80, CD86, CD40 u.a.), als auch über Zytokine (z.B. IL-12, IL-10, IFN $\gamma$  u.a.). Dabei führt nach der derzeitigen Sichtweise eine „optimale“ Stimulation zu einer immunogenen Antwort, während eine unvollständige Stimulation eher eine tolerogene Antwort nach sich zieht. Somit tragen DCs wesentlich zu Immunität und Autoimmunität bei.

## 1.2.2 Polarisierung von Th-Zellen: Th1/Th2 Konzept

Seit *Mosmann et al.* 1986 [50] erstmals formal gezeigt haben, dass Th-Zellen anhand der von ihnen produzierten Zytokinen in zwei Gruppen eingeteilt werden können, hat sich das Th1/Th2 Konzept vielfach als hilfreich erwiesen. *Mosmann et al.* definierte Th1 Zellen als IL-2, IFN $\gamma$ , GM-CSF und IL-3 produzierende und Th2 als IL-4, IL-5 und IL-3 produzierende Zellen. Seit dem sind viele Zytokine den beiden Subpopulationen zugeordnet worden (Übersichten: [51-53]). Aktuell gilt IFN $\gamma$  als das Th1 definierende und IL-4 als das Th2 definierende Zytokin. IL-5 und IL-13 werden wahrscheinlich ebenfalls fast ausschließlich von Th2 Zellen produziert. Dagegen wurde vielfach gezeigt, dass IL-2 und IL-10 von beiden Th-Zelltypen exprimiert werden können. Auch andere Zytokine sind nicht eindeutig zuzuordnen. Völlig unbestritten ist, dass die Entwicklung zur Th1 bzw. Th2 Zelle nicht vorbestimmt ist, sondern beide Phänotypen Polarisations-Endpunkte darstellen, die sich aus naiven Th-Zellen entwickeln [54]. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für viele Ansätze, das Immunsystem zu beeinflussen.

Welche Faktoren neben der nötigen Aktivierung über den T-Zellrezeptorkomplex lassen eine naive Th-Zelle zu einer Th1 oder Th2 Zelle werden? Schon 1990 wurde gezeigt, dass IL-4 der entscheidende Th2 polarisierende Faktor ist [55;56]. Drei Jahre später konnte IL-12 als der Th1 polarisierende Faktor identifiziert werden [57;58]. Diese Daten wurden mit der Einführung transgener Mäuse bestätigt [59;60] und die Mechanismen, die auf transkriptioneller Ebene für die Polarisierung verantwortlich sind, sind zum großen Teil geklärt [51;61]. Neben IL-4 unterstützt IL-6 Th2 Polarisierung [62;63]. Zusätzlich zu den Zytokinen wurden viele weitere Faktoren beschrieben, die auf die Polarisierung einwirken:

Sequenz des präsentierten Peptids, Antigenmenge, Affinität des Antigens, Art der Kostimulation, MHC-Komplex (Übersicht: [64]). Th1 und Th2 sind aber nicht die einzigen beschriebenen Th-Zelldifferenzierungsmuster. So wurden Th0 Zellen als solche beschrieben, die Zytokine beider Muster produzieren [65-67]. Th3 oder Tr1 Zellen zeichnen sich durch die Produktion der suppressorischen Zytokine TGF $\beta$  und IL-10 aus [68;69].

### 1.2.3 Th1/Th2: Bedeutung *in vivo*

Die Einteilung der Th-Zellen dient aber nicht nur der Beschreibung ihrer Zytokinsekretion, sondern ist auch mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der Th-Zellen *in vivo* assoziiert. Th1 und Th2 Zellen greifen auf unterschiedliche Art und Weise in das Immunsystem ein und können somit den Ausgang einer Immunantwort entscheidend mit beeinflussen [70-72].

Die Sekretion von Th1 Zytokinen verstärkt zelluläre und inflammatorische Immunreaktionen phagozytischer Zellen. So induziert IFN $\gamma$  in Makrophagen die Produktion von IL-12, dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF $\alpha$  und die Synthese von Stickstoffmonoxid, welches der effektiven Bekämpfung von intrazellulären Parasiten dient [72-74]. Zusätzlich exprimieren IFN $\gamma$  aktivierte Makrophagen verstärkt MHC-II, was ihnen eine verbesserte Antigenpräsentation ermöglicht. Da sie gleichzeitig IL-12 ausschütten, verstärken sie somit die Th1 Polarisierung, so dass sowohl Inflammation, als auch Th1 Polarisierung weiter fortschreiten. Weiterhin kontrolliert IFN $\gamma$  den Antikörperklassenwechsel in B-Zellen zu IgG2a [75]. Folgerichtig konnte für Th1 Zellen gezeigt werden, dass sie die IgG2a Synthese induzieren [76;77]. IgG2a trägt über Komplementbindung, Opsonierung und Bindung an hochaffine Fc $\gamma$ -Rezeptoren zum phagozytischen Abbau von extrazellulären Pathogenen bei. IFN $\gamma$  verstärkt im Zusammenspiel mit TNF $\alpha$  Entzündungen durch Rekrutierung pro-inflammatorischer Leukozyten. In Kombination mit IL-2 unterstützt IFN $\gamma$  die Maturierung von zytotoxischen T-Zellen. Zusätzlich sind IFN $\gamma$  und IL-12 potente Inhibitoren der Th2 Differenzierung.

Th2 Zytokine induzieren dagegen humorale Immunreaktionen. Diese sind durch die Rekrutierung von Eosinophilen und Mastzellen und die Aktivierung von B-Zellen und damit die Produktion von Antikörpern gekennzeichnet. Solche Typ 2 Antworten spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Erregern, sowie bei der Neutralisierung von Toxinen durch Antikörper. IL-4 ist ein sehr potenter Stimulus von B-Zellen. Im Gegensatz zu IFN $\gamma$  kontrolliert IL-4 den Antikörperklassenwechsel zu den Isotypen IgG1 (Maus), IgG4 (Mensch) und IgE [75] und Th2 Zellen verstärken die Produktion dieser Antikörper [76]. Mit

IgE können Mastzellen und Basophile armiert werden, die beide hochaffine Fc $\gamma$ -Rezeptoren tragen. Deren Kreuzvernetzung führt zur Degranulation und weiterer Ausschüttung von IL-4, Histamin und anderen gefäßerweiternden und inflammatorischen Mediatoren. IL-5 ist von zentraler Bedeutung für die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen [78;79]. Über die Induktion dieser „humoralen“ Effektormechanismen hinaus haben die Typ 2 Zytokine aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Eigenschaften eine große Bedeutung bei der Begrenzung potentiell gefährlicher, Th1 dominierter Immunreaktionen. So wirken IL-4 und IL-10 der IFN $\gamma$  induzierten Makrophagenaktivierung entgegen. Zusätzlich wirkt IL-4 direkt inhibitorisch auf die Th1 Differenzierung [80-82].

Diese gegensätzlich polarisierten Immunantworten spiegeln sich auch in einigen Krankheitsbildern wieder. So kann beispielsweise eine Infektion des Menschen durch *Mycobacterium leprae* zwei verschiedene Verlaufsformen nehmen. Die mildere Verlaufsform ist so durch die Sekretion von Typ 1 Zytokinen, eine starke DTH Antwort und niedrige Antikörpertiter gekennzeichnet. Weniger kontrolliert und damit wesentlich aggressiver verläuft die Krankheit, wenn vergleichsweise hohe Antikörpertiter gemessen werden, Typ 2 Zytokine vorherrschen und eine abgeschwächte DTH Antwort beobachtet wird [83;84]. Das klassische Mausmodell ist die Infektion mit *Leishmania major*. Dieser intrazelluläre Erreger wird im C57BL/6 Inzuchtstamm gut kontrolliert und mit einer Th1 Immunantwort inklusive entsprechender Makrophagenaktivierung wirkungsvoll bekämpft. Im Balb/c Inzuchtstamm verläuft die Immunantwort dagegen Th2 dominiert mit entsprechenden (hohen) Antikörpertitern und endet meist letal [85;86].

### 1.2.4 Th1/Th2 und Autoimmunität

Gewebezerstörung bei Autoimmunprozessen ist eng verbunden mit dem Vorkommen pro-inflammatorischer Zytokinen wie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 [87;88]. Daraus ergab sich auch die Vorstellung, dass eine Th1 Verschiebung Autoimmunprozesse fördert, Th2 Zellen dagegen protektiv sind. Dieses Konzept hat sich vielfach als richtig erwiesen [89-92]. So zeigten Arbeiten am NOD Mausmodell (Typ 1 Diabetes Modell), dass die antigenspezifischen Th-Zellen Th1 Zellen sind [87]. Auch im EAE Mausmodell (multiple Sklerose Modell) werden Th1 Zellen als wesentlicher induzierender Faktor angesehen [93-95]. In beiden Modellen verstärkte der adoptive Transfer von Th1 Zellen die Krankheit im Vergleich zum Th2 Zelltransfer [92]. Der protektive Wert von IL-4 wird deutlich, wenn IL-4 in NOD Mäusen überexprimiert wird: sie entwickeln keinen Diabetes [96;97]. Eine neuere Arbeit zeigt zudem, dass IFN $\gamma$  die Rekrutierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Zellen im

Autoimmunprozess vermittelt und sich die Ausschaltung von IFN $\gamma$  positiv auswirkt [98]. Auch am DRFZ von Frank Hardung durchgeführte Arbeiten zeigten, dass der Transfer von Th1 Zellen, nicht aber der von Th2 Zellen in einem Arthritismodell die Krankheit induzierten. Ebenfalls wurde der therapeutische Effekt von IL-4 bzw. Th2 Zellen in verschiedenen Autoimmunmodellen gezeigt: Arthritis [99-101], Diabetes [96;102], EAE [103-105], Thyroiditis [106].

Es sollte aber nicht unerwähnt bleiben, dass die Prozesse *in vivo* weitaus komplexer sind und noch lange nicht vollständig geklärt (Übersicht [107]). So kann beispielsweise IFN $\gamma$  Defizienz die Entwicklung von EAE fördern [108]. Auch wurde gezeigt, dass IFN $\gamma$  die Stärke der Erkrankung im EAE Modell limitieren kann [109], wobei diese Limitierung u.a. durch IFN $\gamma$  vermittelte Apoptose der spezifischen Lymphozyten erklärt wurde [110;111]. Auch der positive Effekt von IL-4 im EAE Modell kann unter bestimmten Umständen in einen negativen umschwenken. So wurde gezeigt, dass die Gabe von rekombinantem IL-4 sich nicht nur nicht positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkte, sondern sogar den inhibitorischen Effekt von IL-10 aufhob. Dabei führte die Behandlung aber zu der erwarteten reduzierten IFN $\gamma$  Produktion [112].

### **1.3 Behandlung von Autoimmunkrankheiten**

Die derzeitige medikamentöse Behandlung von Autoimmunkrankheiten besteht neben der analgetischen Therapie im Wesentlichen noch aus einer unspezifisch immunsupprimierenden Therapie. Die Immunsuppression erfolgt dabei je nach Substanz auf verschiedenen Ebenen.

Die unspezifischste Ebene nehmen die **Proliferationshemmer** (z.B. Methotrexat, Cyclophosphamid(CYC), Azathioprin(AZT)) ein. Diese oftmals aus der Krebstherapie übernommenen Medikamente hemmen die Zellteilung in allen Zellen. Da die Zellteilung eine zentrale Eigenschaft des erworbenen Immunsystems ist, ist die Hemmung aller Zellteilungen ein wirksames Mittel der Immunsuppression. Die Wirkung der nichtsteroidalen **Antiphlogistika** (z.B. Diclofenac, Aspirin) ist ebenfalls nicht auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Sie haben ein sehr weites Wirkungsspektrum. Die gemeinsamen für die Therapie wichtigen Eigenschaften sind Entzündungshemmung und Schmerzlinderung. Sie sind aber nicht im eigentlichen Sinn immunsuppressiv.

Zu der nächsten, spezifischeren Ebene können die Derivate des Kortisons, die **Glukokortikoide** gezählt werden. Kortison und Hydrokortison gehören zu den wichtigsten endogenen Modulatoren der Immunantwort. Glukokortikoide sind die stärksten zur

Verfügung stehenden Immunsuppressiva. Sie beeinflussen viele zelluläre und humorale Mechanismen des Immunsystems.

Auf der nächsten Ebene stehen Medikamente, die selektiv bestimmte Zellpopulationen des Immunsystems beeinflussen. **Calcineurinantagonisten** (Cyclosporin, FK-506) hemmen beispielsweise die T-Zellantwort, u.a. durch die Hemmung der Zytokinproduktion. Wenn auch definierte Zellpopulationen die Hauptziele dieser Medikamentengruppe sind, so greifen sie doch in Signaltransduktionswege ein, die auch in anderen Zellen aktiv sind, so dass ihre Wirkung nicht ausschließlich auf Zellen des Immunsystems begrenzt ist.

Diese Therapieansätze wirken also unterschiedlich im Detail, aber im Prinzip wirken alle unspezifisch immunsuppressiv. Das Ziel moderner immunologischer Grundlagenforschung ist es, über das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen Therapien zu entwickeln, die nur spezifisch in bestimmte, krankmachende Mechanismen eingreifen, aber sonstige Funktionen unbeeinflusst lassen, d.h. Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen.

Ein sehr erfolgreicher Therapieansatz, der bereits in diese Richtung geht, sind anti-TNF $\alpha$  Antikörper (z.B. Infliximab). Diese haben die Therapie einiger chronisch entzündlicher Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Psoriasisarthritis, Spondylitis ankylosans) teils erheblich verbessert. Andere Antikörper werden getestet [113]. Aber auch die Wirkung von anti-TNF $\alpha$  Antikörpern ist unspezifisch immunsuppressiv.

Neuere Ansätze versuchen, selektiv nur diejenigen Zellen auszuschalten, die ursächlich für die Autoimmunreaktionen verantwortlich sind. Dies ist prinzipiell möglich, wie Experimente zeigen, bei denen das Immunsystem zerstört wird, um es anschließend mittels einer definierten Zellpopulation (CD34<sup>+</sup> Stammzellen) wiederherzustellen [114].

Weniger invasive Ansätze, basieren auf dem Versuch sich die Funktion bestimmter Th-Zellpopulationen zunutze zu machen. Dabei wird versucht, die Balance derjenigen Th-Zellen, die der Abwehr von Pathogenen bzw. Tumorzellen dienen, die aber auch für Autoimmunprozesse verantwortlich gemacht werden, und derjenigen Th-Zellen, die solche Immunreaktionen begrenzen, wiederherzustellen [107]. Dies kann z.B. durch den Einsatz rekombinanter Zytokine (z.B. IL-4, IL-10, TGF $\beta$ ) geschehen. Diese kann auch durch die Manipulation entnommener Zellen *in vitro* geschehen, die dem Patienten wieder gespritzt werden. Da die Th-Zellen eine zentrale Rolle in der Regulation und Steuerung der adaptiven Immunantwort spielen, sind sie ein besonders geeignetes Ziel für solch immunmodulatorische Ansätze.

In dieser Arbeit wurde ein solcher Ansatz, genauer die Möglichkeit der Einflussnahme auf die Differenzierung der Th-Zellen mittels DNA Immunisierung, *in vivo* im Mausmodell getestet. Das Konzept das Immunsystem mittels einer solchen DNA Immunisierung wieder „zurechtzurücken“ ist besonders attraktiv, da eine solche Immunisierung einfach und kostengünstig durchzuführen wäre.

## **1.4 DNA Immunisierung**

(auch: Genetische oder Plasmid Immunisierung bzw. Vakzinierung)

Bereits aus vor 1990 durchgeführten Experimenten, bei denen verschiedene DNA Präparationen zu Effekten führten, die nur durch Proteine erklärbar waren, ergaben sich Hinweise, dass die Applikation von DNA in Versuchstiere zur Expression der codierten Proteine führen musste [115-117]. Mit dem direkten Nachweis der Expression verschiedener Reportergenen in Muskelzellen nach intramuskulärer (i.m.) Injektion einfacher Expressionsplasmiden durch *Wolff et al.* [118] wurde das Feld der „DNA Immunisierung“ eröffnet. Kurz darauf konnten *Tang et al.* [119] zeigen, dass es nach einer solchen DNA Immunisierung zur Bildung von Antikörpern gegen das codierte Protein kommt. *Ulmer et al.* [120] und *Robinson et al.* [121] waren dann unter den ersten, die zeigten, dass eine solche Immunisierung Versuchstiere gegen eine folgende Virusinfektion schützte. Dabei zeigten sie bereits, dass sowohl eine zytotoxischen T-Zell-, als auch eine Antikörperreaktion induziert wurden.

Dieser Art der Immunisierung hat einige Vorteile, die das Feld der DNA Immunisierung schnell zu einem sehr intensiv bearbeiteten werden ließen. So imitiert die DNA Immunisierung eine Immunisierung mit abgeschwächtem Erreger insoweit, als das Antigen intrazellulär produziert wird und somit direkt in den MHC-I Weg gelangt, ohne dabei aber die Gefahren einer Lebendimpfstoff-Immunisierung zu haben. Dies bedeutet, dass die *in vivo* produzierten Proteine post-translationell modifiziert werden können, was ihre Authentizität gegenüber Virusproteinen verbessert. Dies ist ein konzeptioneller Vorteil gegenüber einer Immunisierung mit Protein in Adjuvanz. Ein weiterer Vorteil der DNA Immunisierung liegt in der einfachen Herstellung und Lagerung von DNA im Vergleich zu Proteinimpfstoffen. Ebenso sind die Manipulation des Antigens, die Kombination verschiedener Antigene und die Einflussnahme auf den Antigenpräsentationsprozess wesentlich vereinfacht. DNA Immunisierungen wurden vielfach und in vielen verschiedenen Krankheitsmodellen erfolgreich getestet (Überblick: [122-124]).

Ein großer Teil der vorhandenen Literatur beschäftigt sich mit den Möglichkeiten der Optimierung des Immunisierungsplasmids, mit dem Ziel eine maximale Immunantwort zu

induzieren. Dies kann durch die Wahl des Antigens, des Promotors, durch unterschiedliche „prime boost“ Protokolle [125], durch aktive Sekretion des Antigens [126;127] und andere Maßnahmen geschehen. Bezüglich der Maximierung der Immunantwort sei hier auf Reviews zu diesem Thema hingewiesen (Übersichten: [122;128-131]).

Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion der Th-Zellen auf eine DNA Immunisierung und die Möglichkeit der Manipulation dieser Reaktion zu untersuchen. Da die Antigenpräsentation die Th-Zellantwort wesentlich mit beeinflusst, sind im Folgenden die Mechanismen diskutiert, die nach DNA Injektion zur Präsentation des Antigens führen. Dies führt dann zu Mechanismen, die die Th-Zellpolarisierung nach DNA Immunisierung beeinflussen. Unmittelbar damit verbunden sind die Effekte verschiedener Immunisierungsrouten. Abschließend folgt ein Überblick über DNA Immunisierungsstudien, die mittels gleichzeitiger Gabe von Antigenplasmid und potentiell immunsystem-modulierendem Plasmid die Immunantwort lenken zu suchten.

Bevor die möglichen Präsentationswege erläutert werden, seien kurz die wichtigsten **Immunisierungsrouten** genannt.

Die am häufigsten in DNA Immunisierungsstudien verwendete Route ist die Injektion in den Muskel (i.m.). Dabei werden 10-100µg DNA in Lösung mit einer Nadel direkt in den Muskel injiziert. Zwei ebenfalls häufig verwendete Routen sind die sub- oder intrakutane Nadelinjektion (s.c. o. i.c.) und die GeneGun Immunisierung. Die kutane Injektion erfolgt analog zur i.m. Route, wobei meist weniger Volumen, aber die gleiche µg Menge DNA eingesetzt werden. Bei der GeneGun handelt es sich um eine Vorrichtung, mittels Heliumdruck Goldpartikel zu beschleunigen. Diese vorher mit DNA beladenen Goldpartikel (Durchmesser etwa 1µm) dringen in die obersten Hautschichten ein. Hierbei wird in etwa 1µg DNA appliziert.

### **1.4.1 Mechanismen der Antigenpräsentation**

Es sind im Wesentlichen drei Mechanismen denkbar, die nach einer DNA Immunisierung über die Produktion und Präsentation von Antigen zu einer Immunreaktion führen. Bei der ersten denkbaren Möglichkeit werden somatische Zellen (Keratinocyten, Myozyten oder jede andere MHC-II negative Zelle) direkt transfiziert und präsentieren selbst das Antigen. Die zweite denkbare Möglichkeit ist die direkte Transfektion von APCs und die anschließende Präsentation des Antigens durch eben diese. Der dritte Weg liegt in der Aufnahme und Präsentation von Antigen durch eine APCs, wobei das Antigen von somatischen und/oder anderen APCs produziert und freigesetzt wurde.

Die frühen Experimente zur DNA Immunisierung hatten gezeigt, dass die Injektion von nackter DNA in den Muskel zur Induktion einer Immunantwort führte [118;120]. Weitere Experimente mit Knochenmarkschimären und Experimente, in denen der Muskel unmittelbar nach der Injektion entfernt wurde, zeigten jedoch, **dass Muskelzellen alleine nicht ausreichen, um eine Immunantwort zu initiieren** [132-134]. Weitere Experimente zeigten, dass Zellen, die vom Knochenmark abstammten (also APCs), **in der Lage waren, eine Immunantwort auszulösen** [135-137].

Im Gegensatz zum Muskel ist die Haut reich an APCs (den Langerhanszellen). Folgerichtig haben einige Studien gezeigt, dass nur dann eine optimale Immunantwort gewährleistet war, wenn die Haut intakt gelassen wurde [134;138;139]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass migrierende APCs, die direkt transfiziert wurden und/oder Antigen aufgenommen haben, die Immunität induzierten [138-140]. Residente Zellen beeinflussten die Stärke der Immunantwort, wahrscheinlich indem sie als Antigenreservoir dienten [138]. **Zusammengenommen zeigen diese Arbeiten, dass APCs den entscheidenden Beitrag zur Immunantwort nach DNA Immunisierung tragen, somatische Zellen aber zur Stärke der Antwort beitragen können.**

Weiterhin konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass nach intradermaler DNA Immunisierung [141;142], nach DNA Immunisierung in den Muskel [143] und nach GeneGun Immunisierung [144;145] **DCs eine, wenn nicht die zentrale Rolle in der Induktion der Immunantwort nach DNA Immunisierung haben, und dass sie zumindest zum Teil direkt transfiziert werden.**

Die Gesamtzahl an direkt transfizierten Zellen im drainierenden Lymphknoten nach GeneGun Immunisierung wurde auf etwa 50-100 Stück bestimmt [144].

Welche Rolle direkt transfizierte DCs bei der Induktion der Immunantwort nach DNA Immunisierung spielen ist noch kontrovers. *Porgador et al.* [144] zeigten eine **dominante Rolle von direkt transfizierten Zellen**. Zwei andere, überzeugende Arbeiten kamen dagegen zum gegenteiligen Ergebnis. *Corr et al.* [139] und *Cho et al* [146] zeigten in aufwendigen Arbeiten *in vivo*, **dass der Transfer von Antigen, welches von nicht APCs produziert wurde, den entscheidenden Beitrag zur Immunantwort leistet.**

### 1.4.2 DNA Immunisierung und Th1/Th2 Polarisierung

Wie bereits erwähnt, kann die Reaktion des Immunsystems auf eine DNA Immunisierung auf vielerlei Weise beeinflusst werden. Viele denkbare Wege der Einflussnahme wie z.B die Wahl des Antigens, die Entscheidung über die intrazelluläre

Lokalisation des Antigens, die Restriktion des Antigens auf bestimmte Zelltypen, die Stärke der Expression, aber auch Möglichkeiten der Koimmunisierung (vgl. unten) sind frei wählbar. Zwei Mechanismen, die insbesondere die Th-Zelldifferenzierung beeinflussen, spielen jedoch automatisch eine Rolle und müssen daher berücksichtigt werden. Das ist zum einen die immunstimulatorische Wirkung von Bakterieller DNA und zum anderen die Immunisierungsrouten.

### 1.4.2.1 CpG Motive

Schon früh war bekannt, dass bakterielle DNA im Gegensatz zu eukaryotischer DNA immunaktivierend wirkt [147]. Den Grund hierfür fanden *Krieg et al.* [148] in bestimmten Sequenzen, CpG Motive genannt, die in prokaryotischer DNA im Wesentlichen unmethyliert, in eukaryotischer DNA dagegen weitgehend methyliert vorkommen. Wie mittlerweile ausreichend gezeigt, kann diese Eigenschaft von bakterieller DNA als PAMP (vgl. 1.1.1) bezeichnet werden, die von dem PRR TLR9 erkannt wird [149]. Der Nachweis der Existenz der CpG Motive hat ein weiteres Feld der immunologischen Forschung aufgetan, auf das hier nicht im Detail eingegangen wird (Übersicht: [150]). Da Plasmide, die für DNA Immunisierungsstudien eingesetzt werden, in der Regel in Bakterien vermehrt werden, und mindestens in den gängigen Resistenzgenen Ampicillin und Kanamycin solche CpG Motive vorhanden sind, sind die Auswirkungen dieser CpG Motive auf das Immunsystem bei DNA Immunisierungen jedoch von Bedeutung. CpG Sequenzen verstärken nicht nur die Immunreaktion nach DNA Immunisierungen [151;152] sondern wirken auch indirekt Th1 polarisierend [153-155]. So haben *Chu et al.* [156] gezeigt, dass eine Th2 dominierte Immunantwort durch den Einsatz von IS-ODN (CpG-reiche Oligonukleotide) in eine Th1 Antwort umgewandelt werden kann.

### 1.4.2.2 Route

Auch die Applikationsroute beeinflusst das Th-Zellprofil nach DNA Immunisierung. So führt die intramuskuläre DNA Injektion meist zu einer Th1 Antwort mit erhöhtem IgG2a:IgG1 Verhältnis im Serum und vermehrter IFN $\gamma$  bzw. verminderter IL-4 Produktion von Lymphozyten nach *in vitro* Restimulation. GeneGun Immunisierung in die Haut induziert dagegen meist [157-159], aber nicht immer [159] eine Th2 Antwort, mit erniedrigtem IgG2a:IgG1 Verhältnis, weniger IFN $\gamma$  und mehr IL-4. Intradermale Nadelinjektion führte sowohl zu einer Th1 [157;160], als auch zu einer Th2 [158] Antwort. Eine Arbeit untersuchte GeneGun Immunisierung in den Muskel und fand ein Th2 Profil

[157]. Die Gründe für diese unterschiedlichen Polarisierungstendenzen der einzelnen Routen sind nicht ganz verstanden. Mit eine Ursache dürfte in der Menge der applizierten DNA und der damit verbundenen Th1 polarisierenden CpG Motive liegen. Wie oben erwähnt, wird bei der Nadelinjektion 10-100 mal mehr DNA als mit der GeneGun appliziert, was für den beobachteten Th1 Shift verantwortlich sein könnte. Es gibt sowohl Daten, die dies stützen [161;162], aber auch Daten, die dagegen sprechen [157]. *Robinson et al.* [123] vertreten die Ansicht, dass nicht die Menge an DNA, sondern der Ort und damit die Art der APCs entscheidend ist. So sagen sie, dass nach i.m. Immunisierung die Antigenpräsentation hauptsächlich in der Milz, nach GeneGun Immunisierung dagegen in Lymphknoten stattfindet.

### 1.4.3 Koimmunisierung als Mittel der Th1/Th2 Manipulation

Die Idee DNA Koimmunisierung einzusetzen, um die Richtung der Immunantwort zu beeinflussen, wurde bereits mehrfach getestet (Übersichten: [122;163;164]). Dabei wird neben der Antigen-DNA weitere DNA koappliziert, die ein potentiell immunmodulatorisches Molekül kodiert. *Kim et al.* [165] und *Chow et al.* [166] haben den Einfluss verschiedener Zytokinplasmide auf die Antikörpertiter und die Th-Zellantwort direkt verglichen und im wesentlichen die „erwarteten“ Polarisierungen gefunden. So zeigten *Chow et al.* einen deutlichen Th1 Shift nach IL-12 und IFN $\gamma$  Koimmunisierung und einen ebenso deutlichen Th2 Shift nach IL-4 Koimmunisierung. Dies spiegelte sich auch in einer entsprechenden Verschiebung im IgG2a:IgG1 Verhältnis wieder. *Kim et al.* berichteten erhöhte spezifische Antikörpertiter nach IL-4, IL-5, IL-2 und IL-18, aber auch nach IL-10 Koimmunisierung. IL-2 und TNF $\alpha$  führten zu einem starken Anstieg der spezifischen Th-Zellproliferation, IL-2 und IFN $\gamma$  zur Th1 Polarisierung [167] und TNF $\alpha$  und IL-15 verstärkten die CTL Antwort. Solche Koimmunisierungen wurden ebenfalls in verschiedenen Krankheitsmodellen getestet. Dabei wurden pro-inflammatorische bzw. Th1 Zytokine wie IL-12, IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , IL-15 meist verwendet, um eine Immunantwort im Infektions- und Tumormodell zu verstärken. Zytokine mit bekannten immunsupprimierenden bzw. Th2 polarisierenden Eigenschaften wie IL-4, IL-10 und TGF $\beta$  wurden dagegen erfolgreich in Autoimmunmodellen eingesetzt [168-172]. Der Einsatz von DNA Immunisierung kann aber auch zu unerwarteten Effekten führen, die mangels ausreichender Erkenntnisse der Prozesse *in vivo* nicht erklärbar sind. So kann beispielsweise die Koimmunisierung mit IL-4 im häufig genutzten EAE Modell sowohl vor dem Ausbruch der Krankheit schützen [168], aber auch die Krankheit verstärken [173].

## 1.4.4 Immunisierungsvektoren

DNA Immunisierungsvektoren kodieren üblicherweise das zu untersuchende Antigen, wobei das entsprechende Gen in einem bakteriellen Plasmid vorliegt. Dabei ist das Plasmid meist optimiert auf maximale Expression des Antigens in eukaryotischen Zellen. Solche Immunisierungsplasmide haben in der Regel a) ein Replikationsursprung (ORI), der das Wachstum in Bakterien ermöglicht, b) eine Antibiotikaresistenz für die Positivselektion in der Bakterienkultur, c) einen starken Promotor für optimale Genexpression in Säugetierzellen und d) eine Polyadenylierungssequenz, die der Stabilisierung der mRNA dient [122].

## 1.5 Analyse der spezifischen Th-Zellantwort ex vivo

Die Anzahl der für ein Antigen spezifischen Zellen liegt im immunisierten Probanden (Bsp. Tetanus), bestimmt durch LDA bei etwa  $10^{-5\pm 2}$  [174]. Die Frequenzen für Antigene, denen das Immunsystem nicht ausgesetzt war, liegen noch 10-100 fach darunter [175]. Dies bedeutet, dass insbesondere im nicht immunisierten Tier die Analyse dieser spezifischen Zellen aufgrund ihrer geringen Frequenz nur sehr begrenzt möglich ist. Zusätzlich besteht das Problem der Identifikation der Zellen einer bestimmten Spezifität. Herkömmliche Methoden zur Analyse der spezifischen Zellen ( $^3\text{H}$ -Thymidineinbau, Zytokinassay) sind indirekter Natur und identifizieren die Zellen über ihre Aktivierung *in vitro*. Damit sind sie von Zellkulturbedingungen abhängig. Um diese Probleme zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein von *Jenkins et al.* [25] eingeführtes Zelltransfersystem verwendet.

Dabei werden Lymphozyten aus transgenen Mäusen isoliert und in kongene Rezipienten transferiert. Die Donortiere sind transgen für den  $\alpha/\beta$ -TCR des T-Zellhybridohms DO11.10, der das Peptid323-339 des Ovalbumins des Huhns (OVA) erkennt [176], sofern 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 klontypspezifischen Antikörper KJ1-26 anfärben [177]. Durch den Transfer der Lymphozyten aus den transgenen Tieren wird die Zahl der ovalbuminspezifischen Th-Zellen im Rezipienten derart erhöht, dass die Zellen einer weiteren Analyse zugänglich sind. Wird das Rezipiententier nun mit Ovalbumin immunisiert, so kann die Reaktion der in dieser Immunantwort spezifischen T-Zellen verfolgt und charakterisiert werden (vgl.3.1.1).

### **1.6 Ziele**

Fehlregulationen des Immunsystems können zu Autoimmunkrankheiten führen. Dabei spielen die Th-Zellen als integrierende und steuernde Zellpopulation eine zentrale Rolle. Es besteht die Hoffnung, durch Manipulation der Th-Zellen Autoimmunprozesse positiv beeinflussen zu können. Dabei wird versucht Th2 bzw. T<sub>reg</sub> zu induzieren, da diese der Entwicklung pro-inflammatorischer Th1 Zellen entgegenwirken.

Auch diese Arbeit hatte zum Ziel, in den Prozess der Th-Zelldifferenzierung in der eben genannten Form einzugreifen. Dies sollte mit Hilfe der DNA Immunisierung geschehen. Dabei sollte die Th-Zelldifferenzierung nicht nur beeinflusst werden, sondern es war auch Ziel, die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um damit in Zukunft Immunisierungsstrategien rationell entwickeln zu können.

Im einzelnen sollte folgendes untersucht werden:

- Etablierung eines Systems, welches eine detaillierte Analyse der frühen, antigenspezifischen Th-Zelldifferenzierung nach DNA Immunisierung ermöglicht.
- Etablierung eines DNA Immunisierungsprotokolls und Charakterisierung der Th-Zellreaktion nach DNA Immunisierung.
- Manipulation der Th-Zelldifferenzierung durch Koimmunisierung mit Zytokinen und Kofaktoren.
- Test vielversprechender Kandidaten im Krankheitsmodell.