

2 MATERIAL&METHODEN

2.1 Medien und Antikörper

PBS:	8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,2g/l KH ₂ PO ₄ , 1,4g/l Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O
PBS/BSA:	PBS +2g/l Rinderserumalbumin
PBA:	PBS/BSA +0,05%NaN ₃
Saponinpuffer:	PBS/BSA +5g/l Saponin
MACS-Puffer:	PBS/BSA +1mM EDTA
„RPMI komplett“:	RPMI +10% FCS hitzeinaktiviert, +100U/ml Penicillin, +100U/ml Streptomycin, +Glutamax-I (0,3mg/ml Glutamin) +10µg/ml 2-Mercaptoethanol
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	10mMKHCO ₃ , 155mM NH ₄ CL, 0,1mM EDTA, pH 7,5
Boratpuffer:	6,2g/l Borsäure, 5g/l di-Na-tetraborat, 4,4g/l NaCl pH 8,5
Entkalkungslösung:	85ml 25%, 70ml 85% Ameisensäure, 70g AlCl ₃ •6H ₂ O ad 1000ml dest. H ₂ O

Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet, wobei folgende Konjugate an Fluorochromen und Haptenen zum Einsatz kamen:

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Indodicarbocyanin (Cy5), Peridinin Chlorophyll (PerCP) oder Allophycocyanin (APC) bzw. Biotin (Bio) oder Digoxigenen (Dig)

Epitop	Klon	Quelle
Oberflächenantikörper		
CD4	GK1.5 (204)	DRFZ
hCD4	TT1	DRFZ
CD8α	53-6.7 (205)	Pharmingen
CD11c	HL3 & N418 (207)	Pharmingen & DRFZ
CD25	7B11	Pharmingen
CD40	3/23 (214)	Pharmingen
CD62L	MEL-14 (212)	DRFZ

CD69	H1.2F3	Pharmingen
CD80	16-10A1 (215)	Pharmingen
CD86	GL1 (216)	Pharmingen
B7h		Robert Koch Institut
MHC-II	M5/114 (208)	DRFZ
OVA-TCR	KJ1-26.1 (206)	DRFZ
ICOS	12A7 (Hutloff00 EJI)	Robert Koch Institut
Ovalbumin	polyklonal	
Penta-His-Tag	KatNo. 34660	QIAGEN
Zytokinantikörper		
IFN γ	AN18.17.23	DRFZ
IL-4	11B11 (m152)	DRFZ
IL-12 p70	9A5	Pharmingen
IL-12 p40+p70	C15.6	Pharmingen
IL-6	MP5-20F3	Pharmingen
IL-2	S4B6 (m20)	DRFZ
IL-10	JES5-16E3	Pharmingen
Lap (TGF β)		
Isotypkontrollen		Pharmingen
Sekundärreagenzien		
Dig-Fab-Fragmente		Boehringer Mannheim
Streptavidin		Pharmingen
FITC		Miltenyi Biotech

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach Standardprotokollen und sind daher nicht im detail beschrieben.

Alle Klonierungsarbeiten wurden in Escherichia coli (E. coli) K12 Bakterienstämmen DH5 α [178] durchgeführt. Diese wurden elektrokompent gemacht und mittels Elektroporation transformiert. Die Anzucht von E. coli erfolgte sowohl in Flüssig- als auch auf Plattenkulturen in sterilem Luria Bertani (LB)-Medium unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) oder 30 μ g/ml Kanamycin. Plasmid DNA aus Bakterien und DNA Fragmente aus Agarosegelen wurden im Rahmen der Klonierungen mit Produkten der Firma

Qiagen aufgereinigt. Restriktionsenzyme und Ligase der Firma New England BioLabs und Boehringer Mannheim wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt. „PCR“-Klonierungen wurden unter Einsatz der Pfu-Polymerase (Diese hat mit $\sim 6.5 \times 10^{-7}$ Fehler/Base mit die geringste Fehlerrate aller gebräuchlichen Polymerasen [179;180]) durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden von TibMolBiol (Berlin) bezogen. Größere Mengen an Plasmid, welche für *in vivo* Versuche verwendet wurde, wurden mittels EndoFree Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Herstellung bzw. Herkunft der verwendeten Vektoren

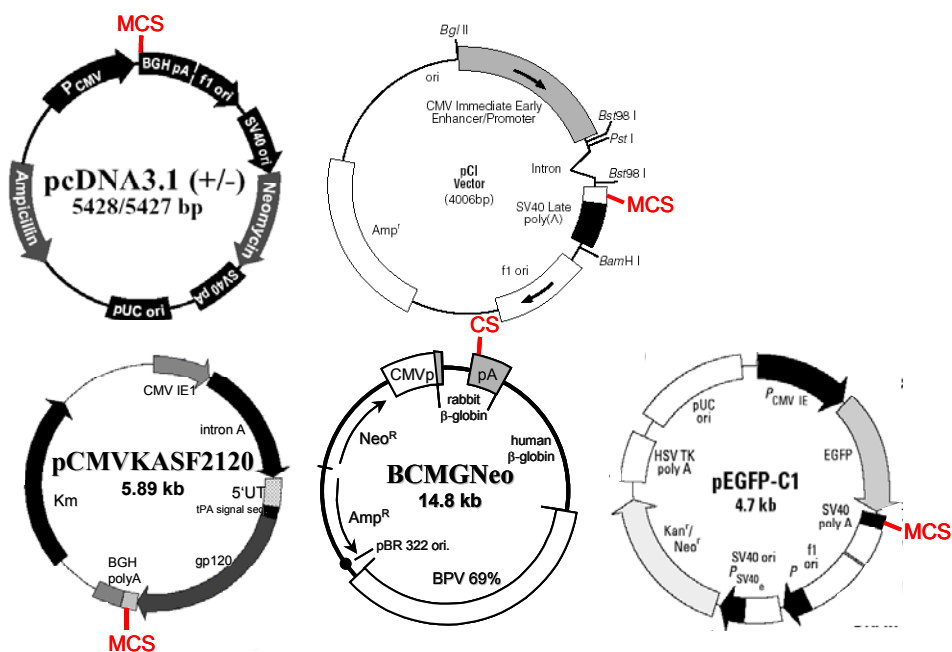


Abb.1: Expressionsplasmide

pCI basierte Vektoren: (Promega) Ovalbumin, hCD4, IL-6

Der Antigenvektor pCI-Ovalb, der die Sequenz für das komplette Hühnerovalbumin enthält, wurde uns freundlicherweise von Joachim Fensterle zur Verfügung (MPI für Infektionsbiologie Berlin) gestellt.

Der Zytokinexpressionsvektor pIL6 wurde uns freundlicherweise von Seung Woo Lee (Pohang University, Süd Korea) zur Verfügung gestellt und ist publiziert [181].

Der phCD4 Vektor enthält eine verkürzte Sequenz des humanen CD4 Moleküls, bei der die intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne fehlt. Diese wurde aus einem Vektor, der uns von der Firma Miltenyi Biotech zur Verfügung gestellt wurde, in das pCI Plasmid umkloniert.

pcDNA3.1 basierte Vektoren: (Invitrogen) IL-2, IL-4, IL-10, vIL-10, IL-15, IL-12, IFN γ , TGF β , CD80, CD86, B7h, Serrate

Ein IL-2 kodierender Vektor wurde uns freundlicherweise von Mi-Hua Tao (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) zur Verfügung gestellt und ist publiziert [166]. Aus diesem wurde die IL-2 Sequenz mittels PCR unter Verwendung folgender Primer in den pcDNA3.1 umkloniert: muIL-2 up: gat cgg atc cat gta cag cat gca gct cgc; muIL-2 down: gat cgc ggc cgc tta ttg agg gct tgt tga. Beide Vektoren wurden mit ähnlichen Ergebnissen verwendet.

Die IL-4 Sequenz wurde aus dem BCMG-IL-4 Vektor mittels PCR unter Verwendung folgender Primer in pcDNA3.1 umkloniert: muIL4 5': gat cgg atc cat ggg tet caa ccc cca g; muIL4 3': gat cgc ggc cgc cta cga gta atc cat ttg cat g

Die IL-10 Sequenz wurde uns freundlicherweise von Hyun Dong Chang (DRFZ) in einem Vektor zur Verfügung gestellt und mittels XhoI direkt in pcDNA3.1 umkloniert.

Die virale (Ebstein Barr Virus) IL-10 Sequenz wurde uns freundlicherweise von Christine Brandt (Robert Koch Institut, Berlin) im pBluescript II KS zur Verfügung gestellt und über KpnI und XbaI direkt in pcDNA3.1 umkloniert.

Der murines IL-12p70 codierende Vektor wurden uns freundlicherweise von Dr. Wiltrot (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Er exprimiert p40 und p35 unter getrennten CMV Promotoren und ist publiziert [182].

Die Sequenz für IL-15 wurde unter Verwendung folgender Primer direkt aus cDNA generiert: muIL-15 up: gat cgg atc cat gaa aat ttt gaa acc ata; muIL-15 down: gat cgc ggc cgc tca gga cgt gtt gat gaa

Die IFN γ Sequenz wurde aus dem BCMG-IFN γ Vektor mittels PCR unter Verwendung folgender Primer in pcDNA3.1 umkloniert: muIFN γ 5': gat cgg atc cat gaa cgc tac aca ctg c; muIFN γ 3': gat cgc ggc cgc tca gca gcg act cct ttt c

Der TGF β Vektor enthält den kompletten open reading frame des murinen TGF β 1, der über EcoRI und XbaI in den pcDNA3.1 kloniert wurde und wurde uns freundlicherweise von Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

Die CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) codierenden Vektoren wurden uns freundlicherweise von Thomas Gajewski (University of Chicago, USA) zur Verfügung gestellt und sind publiziert [183].

Die B7h Sequenz wurde aus einem BCMG-neo basierten Vektor, der uns freundlicherweise von Hans-Werner Mayes (Robert Koch Institut, Berlin) zur Verfügung

gestellt wurde, mittels PCR und folgender Primer in den pcDNA3.1 umkloniert: muB7h 5': gat cgg atc ccg cac cat gca gct aaa gtg; muB7h 3': gat cgc ggc cgc ggg cag agt cct gtc agg c

Die Sequenz für humanes Serrate1 wurde uns freundlicherweise von G.F. Hoyne (Edinburgh Medical School, UK) zur Verfügung gestellt und in den pcDNA3.1 umkloniert.

BCMG-neo basierte Vektoren: IL-4, IFN γ

Einige Kontrollexperimente wurden mit BCMG basierten Zytokinexpressionsvektoren durchgeführt. Das BCMG Plasmid unterschied sich als Immunisierungsvektor von den anderen eher klassischen Plasmiden. BCMG ist mit ~15kb etwa dreimal größer als die anderen Plasmide und hatte zusätzlich eine Sequenz aus dem „Bovine Papilloma Virus“. Plasmide, die diese BPV Sequenz tragen vermehren sich in vielen Fällen als extrachromosomale Elemente in transfizierten Zellen [184;185], wodurch sehr hohe Level an Genprodukt erreicht werden können.

Der BCMG basierte IFN γ Expressionsvektor wurde uns freundlicherweise von P. Lollini (Bologna, Italien) zur Verfügung gestellt .

Der die IL-4 cDNA für den BCMG-IL4 Vektor wurde aus dem pIL4 Vektor direkt umkloniert.

pEGFP (Clontech)

pCMV-OvaP

In einigen Experimenten wurde das pCMV-OvaP Plasmid als Antigenvektor verwendet. Es enthält eine Sequenz, die neben anderen für diese Arbeit nicht relevanten Bereichen das OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid codiert. Diese liegt hinter einem CMV Promotor und enthält zusätzlich Sekretionssignal. Der Vektor wurde bei Chiron Vaccines konstruiert und uns freundlicherweise von Dr. G. Grandi zur Verfügung gestellt.

2.3 Test der Immunisierungsvektoren

Die Plasmidpräparationen wurden, bevor sie für Immunisierungen eingesetzt wurden, *in vitro* getestet. Dazu wurden Zelllinien (CHO oder Phoenix) mittels Lipofectamin 2000 nach Angaben des Herstellers transfiziert und nach 24-48 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Genprodukte intrazellulär mit entsprechenden Antikörpern angefärbt und im FACS detektiert. Auf den Einsatz des Sekretionsinhibitors BrefeldinA konnte verzichtet werden. Als Kontrolle dienten jeweils mehrere Antikörper anderer Spezifität, bzw. nicht oder anders transfizierte

Zellen. Folgende Antigene konnten auf Grund fehlender Antikörper nicht in Zellen getestet werden: IL-15, vIL-10, B7h.

2.4 FACS Analyse

„Die Prinzipien der Durchflusszytometrie sind anderweitig ausführlich beschrieben [186]. In dem in dieser Arbeit verwendeten FACS Calibur (BD Bioscience) passieren die fluoreszent markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635nm Diodenlaser. Zum einen werden hierdurch geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in geringem Winkel (3° - 10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FCS), das in erster Näherung mit der Zellgröße korreliert, und das um 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht (SSC), das mit der Granularität und Membranfaltung korreliert, gemessen. Zur Messung von Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge stehen zudem 4 Systeme aus Bandpassfiltern und Photoröhren zur Verfügung. Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530nm (FL1), 585nm (FL2) und 650nm (FL3) und über die Anregung des Diodenlasers zusätzlich die Fluoreszenz der Wellenlänge 661nm (FL4) gemessen werden“ (entnommen [187]).

FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, Fluoreszenz-Signale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (BD Bioscience). Durch setzen von elektronischen Analysefenstern („gates“) wurden die gewünschten Zellpopulationen analysiert. Zelltrümmer und tote Zellen wurden über Vorwärts- Seitwärtsstreulicht und Propidiumjodid Analysefenster ausgeschlossen.

2.4.1 Oberflächenfärbung

Zur Färbung von Oberflächenstrukturen wurden $\sim 1-2 \cdot 10^6$ Zellen in $\sim 70 \mu\text{l}$ Färbemix für 10min auf Eis inkubiert. Der Färbemix enthielt die gewünschten Antikörperkonjugate in den austitrierten Konzentrationen (meist im Bereich um $1 \mu\text{g/ml}$) in PBS/BSA. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml PBS/BSA gewaschen und wenn nötig mit einem Sekundärantikörper abermals gefärbt. Abschließend wurden die Zellen in $250-500 \mu\text{l}$ PBS/BSA aufgenommen und standen zur weiteren Analyse zur Verfügung. In Fällen, bei denen es aufgrund unspezifischer Bindungen zu Hintergrundfärbungen kam, wurden die Proben 10min mit $50 \mu\text{g/ml}$ Ratten IgG und $50 \mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor (2.4G2/75) (DRFZ) Antikörper vorinkubiert.

2.4.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die Färbung intrazellulärer Strukturen wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann 20min bei RT in 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Die so fixierten Zellen konnten mehrere Tage bis Wochen in PBA im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Färbungen und Waschschrte wurden dann analog der Oberflächenfärbung durchgeführt, wobei dem PBS/BSA 0,5% Saponin zugefügt wurde. Oberflächenepitope, die nach der Fixierung nicht mehr vom Antikörper erkannt wurden (z.B. CD69), wurden vor der Fixierung gefärbt.

2.5 Mäuse und Zellpräparation

Balb/c Mäuse, die den DO11.10 OVA-TCR transgen (tg) exprimieren, wurden von Dr. Dennis Loh (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA) zur Verfügung gestellt und auf Bab/c Hintergrund gehalten. Diese wurden ebenso wie der Inzuchtstamm Balb/c unter spezifisch-pathogenfreien (spf) Bedingungen in der Versuchstierzucht des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin Marienfelde gehalten. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden weibliche und männliche Tiere im Alter von 6-12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und die entsprechenden Organe wurden entnommen.

2.5.1 Isolierung von Milz- und Lymphknotenzellen und Zelltransfer

Milzen wurden mit PBS/PSA durch ein handelsübliches Metallsieb passiert und nach einem Waschschrte 5 min in Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA wurden verbleibende Aggregate mit Hilfe eines Nylonsieb (Porengröße 70µm) entfernt. Die Einzelzellsuspension stand nun zur weiteren Verwendung zur Verfügung. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Zentrifugiert wurde 10min bei 300g. Bei Lymphknotenzellen wurde auf die Erythrozytenlyse verzichtet.

Die zu transferierenden Zellen wurden aus DO11.10 Tieren entnommen, wobei folgende Organe von Beginn an gepoolt wurden: Milz, mesenteriale & inguinale & axiale & brachiale & mandibuläre Lymphknoten (LK). Der Transfer von 150µl Zellsuspension erfolgte mittels Kanüle in die Schwanzvene unter Rotlicht erwärmter Tiere. Unmittelbar vor dem Transfer wurden die angewärmten, in PBS suspendierten Zellen ($\sim 3 \cdot 10^7$ Zellen/ml) über einen Pre-Separation-Filter (Miltenyi Biotech) gegeben. Der Transfer erfolgte „sex matched“.

2.5.2 Isolierung von Zellen aus Mausblut

Die Tiere wurden unter Rotlicht erwärmt. Anschließend wurde ihnen in einer entsprechenden Haltevorrichtung durch einen Schnitt in die Schwanzvene etwa $250\pm 50\ \mu\text{l}$ Blut entnommen. Durch die Zugabe von Heparin (Gibco) wurde die Gerinnung verhindert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen einer Erythrozytenlyse unterzogen oder die Erythrozyten wurden über einen Histopaque-1083 (Sigma) entfernt (20min 840g RT).

2.5.3 Isolierung von dendritischen Zellen aus Lymphknoten

Inguinale, axiale und brachiale Lymphknoten von 3-5 Mäusen wurden auf Eis in „RPMI komplett“ Medium, das $100\mu\text{g/ml}$ ($\sim 30\ \text{U/ml}$) Collagenase D und $100\mu\text{g/ml}$ DNase I enthielt, in einem Metallsieb mittels Einmalspritzenstempel zerkleinert. Nach 15min Inkubation bei 37°C wurden ein 5 facher Überschuss an 37°C warmen PBS/EDTA zugegeben und weitere 10min inkubiert. Dann wurden die Zellen durch kräftiges Pipettieren vereinzelt und über ein Nylonsieb (Porengröße $70\mu\text{m}$) gegeben. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS/BSA +5mM EDTA wurden die Zellen in PBS/BSA aufgenommen und standen zur weiteren Analyse zur Verfügung.

2.5.4 Isolation von CD62L und CD4 positiven Zellen

In einigen Experimenten wurden sortierte CD4+ oder CD62L+ Zellen verwendet. Dazu wurde die Einzelzellsuspension mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) unter Einsatz von CD4 oder CD62L direkt Beads auf LS-Säulen (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sortierungen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft und waren im Falle von CD4 $>97\%$, im Falle von CD62L $>98\%$.

2.5.5 Isolation CD11c positiver Zellen und *in vitro* Stimulation

Den Mäusen wurden Milz und periphere und mesenteriale Lymphknoten entnommen und in PBS/BSA +5mM EDTA mittels Metallsieb und Stempel zerkleinert und 15min bei 37°C inkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Zellen mit CD11c-FITC gefärbt und mittels anti-FITC Beads nach Angabe des Herstellers (Miltenyi Biotech) über eine LS-Säule aufgereinigt. Aus sieben Mäusen wurden $\sim 5\cdot 10^6$ Zellen isoliert. Diese waren zu $\sim 75\%$ CD11c positiv. Anschließend wurde die Zellen am FACS-Vantage (BD Bioscience) Zellsortierer sortiert. Die in der Zellzahl etwa halbierten Zellen waren zu 99% CD11c positiv.

Die Stimulation erfolgte in 96 Loch Rundbodenplatten in RPMI „komplett“ Medium unter Zusatz von 20ng/ml $\text{IFN}\gamma$, $200\ \text{U/ml}$ GM-CSF (PeproTech, USA) und wahlweise

250nM CpG 1668 (TIB MolBiol, Berlin) oder 1mg/ml LPS und 100U/ml IL-4 oder IL-10. Nach 16-20 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, und bei -70°C bis zur Analyse gelagert.

2.6 CFSE Färbung

2.6.1 Grundlagen

CFSE hat mehrere Eigenschaften, die es im Vergleich zu anderen „cell tracer“ Farbstoffen besonders geeignet machen, Proliferation zu untersuchen:

- günstiges Anregungs- & Emissionsspektrum($\sim 495/525$) => detektierbar mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen, Fluoreszenzmikroplattenlesern und Durchflusszytometern;
- gefärbte Zellen können mit Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert werden ohne dass die Färbung verloren geht;
- geringe ($<20\%$ vom Mean) Standardabweichung der Fluoreszenzintensität einer gefärbten Zellpopulation => die geringe Peakbreite ermöglicht erst die Trennung der einzelnen Zellpopulationen in Abhängigkeit ihrer Zellteilungen [188];
- hohe Stabilität der Färbung *in vivo* => CFSE wurde entwickelt, um intravenös transferierte Lymphozyten über einen langen Zeitraum detektieren zu können [189].

So können CFSE gefärbte Zellen noch nach 24 Wochen identifiziert werden [190].

Innerhalb der ersten 24h werden 99% der anfänglichen Färbung metabolisiert. Nach 24h bleiben nur Proteine mit einer relativ langen Halbwertszeit (Größenordnung Wochen bis Monate) gefärbt. Da diese auch in aktivierten (z.B. sich teilenden) Zellen nicht umgesetzt werden, ist die verbleibende Färbung in sich teilenden Zellen weitgehend stabil.

2.6.2 Protokoll

Die fertige Einzelzellsuspension wurde einmal mit PBS gewaschen, um lösliches BSA zu entfernen. Während der letzten Zentrifugation der Zellen wurde aus der 5mM CFSE (Molecular Probes) Stammlösung und PBS (in DMSO) der 2,5 μM konzentrierte Färbemix hergestellt. Das Zellpellet wurde dann zügig mit einer Menge an Färbemix resuspendiert, so dass sich etwa eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml ergab. Nach genau 4 min wurde die Färbereaktion durch Zugabe von einem Überschuss (mind. 10 fach) an Zellkulturmedium (RPMI) mit 10% FCS abgestoppt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen noch einmal mit PBS/BSA und zweimal mit PBS gewaschen und waren dann für Transfer der Zellkultur bereit.

2.7 Th2 Kulturen und Restimulation *in vitro*

Zellen wurden mit einer Dichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml in „RPMI komplett“ Medium ausgesät und bei 37°C und 5,5% CO_2 in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Die Antigenstimulation erfolgte durch Zugabe von 0,6-1 $\mu\text{g/ml}$ (=0,3-0,5 μM) OVA-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ (Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR) (Schneider-Mergener, Charité, Berlin).

Zur Induktion der Th2 Polarisierung wurden MACS sortierte CD4 und CD62L doppelt positive Zellen aus DO11.10 Mäusen mit bestrahlten APC in „RPMI komplett“ in Kultur genommen. Dem Medium wurden 20ng/ml IL-4 (R&D Systems), 5 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{IL-12}$ mAk (C17.8.6) und 5 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{IFN}\gamma$ mAk (AN18.17.24) von Beginn an zugesetzt. Nach 5-6 Tagen wurde der Erfolg der Polarisierung und der Aktivierungsstatus der Th-Zellen mittels FACS Analyse bzw. Restimulation überprüft. Zum Zeitpunkt, an dem die Mehrzahl der Zellen wieder ruhte (wenig T-Zellblasten), wurden die lebenden Zellen über einen Histopaque-1083 abgetrennt.

Um das Zytokinprofil *in vivo* oder *in vitro* primärstimulierter Th-Zellen abzurufen, wurden die Zellen *in vitro* in „RPMI komplett“ 4h bei einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml unter Zugabe von 10ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin (Sigma) im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Nach 2h wurde 5 $\mu\text{g/ml}$ BrefeldinA (Sigma) (Sekretionsinhibitor) hinzugegeben. Nach Ende der Restimulation wurden die Zellen gewaschen und fixiert.

2.8 Endotoxinbestimmung

Endotoxine sind Zellwandbestandteile von Gram-Negativen Bakterien. Ihr wesentlicher Bestandteil ist LPS. Neben der pro-inflammatorischen Wirkung scheint klar zu sein, dass LPS auch Th1 induzierend wirkt [191]. Dies geschieht wahrscheinlich über die Bindung von LPS an seinen Rezeptor CD14 auf APCs und die dadurch vermittelte IL-12 Produktion [192]. Um eine Th1 Polarisierung durch Endotoxin auszuschließen, wurden die Plasmidpräparationen auf ihren Endotoxingehalt überprüft. Dies geschah mit Hilfe des „Limulus Amebocyte Lysate Assays“ (Bio Whittaker). Die Endotoxinwerte der Plasmidpräparationen der Zytokinvektoren pIL12, pIL4, pIFN γ und pcDNA3.1 (pEmpty) waren unter 0,1 EU/ml und damit unter der Nachweisgrenze des Assays. Einzig die pCI-Ovalb Präparation war mit 0,17 EU/ml positiv. Aber auch dieser Wert ist als gering anzusehen. Dagegen lag der ermittelte Endotoxinwert für das Protein Ovalbumin (Sigma) mit über 2 EU/ml über dem Maximalwert des Assays. Dies war aber für die hier untersuchten

Fragestellungen unerheblich, da Ovalbumin nur im Zusammenhang mit CFA verabreicht wurde.

2.9 Immunisierungen

Das für die Proteinimmunisierungen eingesetzte Ovalbumin wurde zuvor dialysiert. Dazu wurde es in PBS gelöst (~50mg/ml), nicht gelöstes Protein abzentrifugiert und über Nacht in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12-14 kD) gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde es sterilfiltriert und bei -70°C gelagert.

2.9.1 Konventionelle Immunisierung: CFA + Alum

Die Immunisierung mit „Komplettes Freund's Adjuvant“ CFA (Sigma) erfolgte subkutan beidseitig der Schwanzwurzel. Dazu wurden ein Teil Ovalbumin in PBS (1-2mg/ml) mit einem Teil CFA emulgiert. Von der Emulsion wurden dann je 50 μl mittels einer 1ml Spritze und einer 24G Kanüle pro Seite injiziert, so dass jede Maus 50-100 μg Ovalbumin erhielt.

Die Immunisierung mit Ovalbumin + Alum (Pierce) erfolgte intraperitoneal. Protein und Alum wurden den Angaben des Herstellers entsprechend gemischt. Auch hier wurden pro Maus 50-100 μg Ovalbumin injiziert.

2.9.2 DNA Immunisierungen

Die intramuskuläre und intrakutane DNA Immunisierung erfolgte mittels direkter Injektion (27G Kanüle) der angegebenen Mengen an in TE Puffer gelöster DNA, wobei die Mäuse durch Inhalation von Isofluran (Forene) (Abbott) in Narkose versetzt waren. Die intramuskuläre Injektion von je 50 μl erfolgte an mehreren Stellen in den rechten und linken Tibialis anterior. Für die intrakutane Injektion wurde die selbe Menge an DNA in je 25 μl TE Puffer in beide Ohren injiziert.

Das Präzipitieren der DNA auf die Goldpartikel, das Beladen der Patronen mit den Goldpartikeln und die anschließende Immunisierung mit der GeneGun erfolgte im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (BioRad). Dazu wurden 25mg 1Micron Gold (BioRad) mit 100 μl Spermidine (0,05M in H_2O) versetzt und 10sec ins Ultraschallbad gehalten. Dann wurden 50 μg Vektor DNA in TE zugegeben. Sollte neben dem Antigenvektor noch ein weiterer Vektor kopräzipitiert werden, so wurden je 25 μg eingesetzt. Nach dem durchmischen wurden 100 μl CaCl (1M) unter ständigem vortexen tröpfchenweise hinzugegeben. Nach 15min war der Präzipitationsvorgang abgeschlossen und die Goldpartikel

wurden 4x mit 100% EtOH (wasserfrei) gewaschen. Nach Zugabe von 3,5ml PVP waren die Goldpartikel bereit für die Beschichtung der Patronen. Dazu wurden die Goldpartikel 4sec ins Ultraschallbad gehalten, gevortext und mittels angeschlossener 10ml Spritze in den dafür vorgesehenen Teflonschlauch (Tefzel-Tubing) (BioRad) gesaugt. Dieser wurde sofort in die „Tubing-Prep-Station“ eingeführt. Nach dem Absetzen des Goldes wurde die Flüssigkeit abgesaugt und der Schlauch unter Rotation mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Dabei verteilte sich das Gold gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche. Durch Stückelung des Schlauches entstanden ca. 45 Patronen. Diese konnten bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden. Die Immunisierung erfolgte, indem die Goldpartikel per Heliumdruck (400 pounds per square inch = $276,13 \text{ N/cm}^2 = 28,15 \text{ kg/cm}^2 \times 9,81 \text{ N/kg}$) auf die rasierte Bauchhaut der Mäuse „geschossen“ wurden. Dabei wurden, wenn nicht anders angegeben pro Tier zwei nicht überlappende Stellen immunisiert.

2.10 Serumantikörperbestimmung

Zur Serumgewinnung wurde den Mäusen 10 Tage nach der Boostimmunisierung (1ste Immunisierung Tag 0, Boost Tag 14) Blut durch anritzen unter Rotlicht erwärmter Mäuse entnommen. Das Blut wurde 5h bei RT unverschlossen stehen gelassen. Der entstandene Blutkuchen wurde abgenommen und in dem Serum verbliebenen Zellen wurden durch 10min zentrifugieren bei 13000U/min in einer handelsüblichen „Eppendorf“ Tischzentrifuge pelletiert. Das nun klare Serum wurde abgenommen und bei -70°C gelagert.

Die Quantifizierung der Ovalbumin spezifischen Antikörper erfolgte mit dem "Mouse Immunoglobulin Isotyping Cytometric Bead Array (CBA) Kit" (BD-Bioscience), wobei ein leicht verändertes Protokoll benutzt wurde.

Dazu wurde zunächst Biotin (Pierce) an Ovalbumin gekoppelt. Dies geschah durch Zugabe von einem 25 fachen Überschuss an Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat zu Ovalbumin in Boratpuffer pH8.5. Nach 2h wurde freies Biotin über eine Sephadex G-25M Säule (Pharmacia) entfernt.

Dieses Ovalbumin-Biotin wurde statt der Fluorochrom markierten Antikörper, die dem Kit beiliegen, verwendet. Dadurch wurde der Kit antigenspezifisch. Dem Protokoll schloss sich dann ein weiterer Inkubationsschritt an, bei dem Streptavidin-PE entsprechend einer konventionellen Sekundärfärbung eingesetzt wurde. Die Konzentration des Ovalbumin-Biotins wurde anhand von Standardseren bestimmt. Die Funktionsweise des modifizierten Kits wurde mittels konventionellem Sandwich ELISA für IgG1 und IgG2a verifiziert (Daten

nicht gezeigt). Dies war für IgE aufgrund der zu geringen Empfindlichkeit des herkömmlichen ELISAs nicht möglich.

2.11 Ovalbumin induzierte Arthritis

Das Modell der Ovalbumin induzierten Arthritis wurde im DRFZ von Frank Hardung etablierte. Nach zweifacher Koimmunisierung der Tiere mit pCI-Ovalb und einem Zytokinvektor am Tag 0 und 14 wurde am Tag 24 die Arthritis durch die Injektion von 10µl 3µg/µl kationisiertem Ovalbumin in das rechte Knie induziert. Das linke Knie diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Durch die Kationisierung des Ovalbumins wird eine längere Retentionsdauer im Knie erreicht [193].

2.11.1 Herstellung des Antigens

Die Kationisierung erfolgte nach folgendem Protokoll: Zu 10ml N,N-Dimethyl-1,3-propyldiamin (DMPA) (Acros Organics, Pittsburg USA) in PBS (pH 5,0) wurden 10ml einer 20mg/ml Ovalbuminlösung und 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) (Sigma) gegeben und 4h bei RT gerührt. Anschließend wurden der Ansatz dreimal je 6h gegen PBS dialysiert (12-14kD Ausschluss) und nach Bestimmung der Konzentration bei –70°C gelagert.

2.11.2 Analyse

21 Tage nach der Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke präpariert und 48h in 4,5% Formaldehyd/PBS Lösung bei RT fixiert. Dann wurden die Gelenke für 24-48h bei RT in Entkalkungslösung entkalkt. Dann folgte eine Entwässerungsreihe: 2x 70% EtOH für 1h, 3x in 96% EtOH für je 2h, 2x in 100% EtOH je 2h, 2h in 1Teil Xylol & 12Teile EtOH, 2h in 2 Teile Xylol & 1 Teil EtOH, 2h in 100% Xylol, 2x je 4h in Paraffin (bei 65°C). Anschließend wurden die Gelenke in Paraffin ausgegossen und es folgte die Anfertigung von 4µm dünnen Schnitten. Diese wurde nach Entparaffinisierung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, entwässert und in Kanadabalsam eingebettet.

Die Auswertung des Schweregrads der Arthritis erfolgte ohne Wissen um die Gruppenzugehörigkeit der Schnitte nach folgendem Schema:

Akute Entzündung

granulozytäre

<i>Exsudat:</i>	1 einzelne Zellen	<i>Infiltration:</i>	1 einzelne Zellen
	2 fleckig		2 kleinherdig oder diffus mäßig
	3 massiv		3 mittelgradig bis dicht

+1 wenn Fibrin deutlich nachweisbar

+1 wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen

Chronische Entzündung

Hyperplasie

1 gering, keine Aktivierung von LC oder keine Hyperplasie, nur Aktivierung

2 fleckig mit Aktivierung

3 durchgängig hyperplastisch & hypertroph

mononukleare Infiltration SM / Fibroblastenproliferation

0,5 herdförmig schütter

2 überwiegend mäßig

1 überwiegend schütter

2,5 überwiegend mäßig, herdförmig dicht

1,5 überw. schütt., herdförmig mäßig

3 überwiegend dicht

periartikuläre Strukturen (Fibrose/Infiltration)

1 geringe Fibrose/Inf.

2 mäßige Fibrose/Inf.

3 stark fibrös verbreitert/ dicht Entz. Infiltration

Zerstörung

1 einzelne Nekrosen

2 kleinere Defekte, flächenhafte Nekrosen

3 größere Defekte (10-50% einer Gelenkfläche)

4 massiver Defekt (>50% einer Gelenkfläche)