

**Antigenspezifische DNA-Immunisierung in
Kombination mitIDO-kodierenden Plasmiden zur
Therapie der experimentellen Typ I-Allergie**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

vorgelegt von

**Andrea Inga Renzing, geb. Kremer
geb. am 01.06.1978 in Basel**

Kiel, Mai 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.Oktober 2013

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden zwischen März 2004 und Juli 2007 im Rahmen der klinischen Forschergruppe Allergie an der Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erarbeitet.

Kiel, den 30. Mai 2013

Andrea Renzing

A) Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| A) Inhaltsverzeichnis | I |
| B) Danksagung | V |
| C) Veröffentlichungen | VI |
| | |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Typ I-Allergien | 1 |
| 1.2 DNA Vakzinierung..... | 4 |
| 1.3 Transkriptionelles „Targeting“ von dendritischen Zellen mittels des Fascin-Promotors | 6 |
| 1.4 Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)..... | 10 |
| 1.5 Ziel der Arbeit..... | 12 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Materialien | 13 |
| 2.1.1. Laborgeräte..... | 13 |
| 2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien (Glas und Plastikwaren) | 16 |
| 2.1.3. Chemikalien und Reagenzien | 18 |
| 2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien..... | 21 |
| 2.1.4.1 Puffer und Lösungen..... | 21 |
| 2.1.4.2 Zellkulturmedien und Zusätze..... | 23 |
| 2.1.4.3 Medien und Nährböden für die Bakterienkultur | 25 |
| 2.1.4.4 ELISA-Puffer und -Lösungen | 25 |
| 2.1.4.5 Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen | 26 |
| 2.1.5 Fertigsysteme..... | 26 |
| 2.1.6 Plasmidvektoren..... | 27 |
| 2.1.7. Antikörper für Zytokin-ELISA und IFN- γ -ELISpot | 27 |
| 2.1.7.1 Fänger-Antikörper | 27 |
| 2.1.7.2 Detektionsantikörper | 28 |
| 2.1.8 Antikörper für Immunglobulin-ELISA | 28 |
| 2.1.9 Zytokine..... | 29 |
| 2.1.10 Peptide..... | 29 |
| 2.1.11 Antigene | 29 |
| 2.1.12 Enzyme | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.1.12.1 Allgemeine Enzyme | 30 |
| 2.1.12.2 Restriktionsendonukleasen | 30 |
| 2.1.13 Primer | 31 |
| 2.1.13.1 Primer für die Realtime-PCR..... | 31 |
| 2.1.13.2 Primer für die konventionelle PCR | 31 |
| 2.1.14 Versuchstiere | 32 |
| 2.1.15 Zelllinie NIH3T3..... | 32 |
| 2.1.16 Bakterienstamm | 32 |
| 2.2. Tierversuche und zellbiologische Methoden | 33 |
| 2.2.1 DNA-Immunisierung mit der Genpistole..... | 33 |
| 2.2.1.1 Kopplung von Plasmid-DNA an Goldpartikel und Herstellung der..... Patronen für die Genpistole | 33 |
| 2.2.1.2. Durchführung der biolistischen Transfektion | 34 |
| 2.2.2 Intraperitoneale Immunisierung mit β Gal | 34 |
| 2.2.3 Serumgewinnung | 34 |
| 2.2.4 Zellbiologische Methoden | 35 |
| 2.2.4.1 Zellkulturbedingungen..... | 35 |
| 2.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl | 35 |
| 2.2.4.3 Präparation lymphoider Organe | 35 |
| 2.2.4.3.1 Präparation von Lymphknotenzellen | 35 |
| 2.2.4.3.2 Präparation von Milzzellen | 36 |
| 2.2.4.4 Antigen-spezifische Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen..... | 36 |
| 2.2.4.5 CTL-ELISpot | 36 |
| 2.2.4.6 ELISA zur Bestimmung von Zytokinen in Kulturüberständen | 38 |
| 2.2.4.7 ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline in..... Immunsereen | 39 |
| 2.2.4.8 Transfektion von NIH3T3-Zellen mit Expressionsvektoren | 41 |
| 2.2.4.9 Tryptophan- und Kynurenin-Nachweis mittels HPLC | 41 |
| 2.2.4.10 Grafik und Statistik | 42 |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden..... | 43 |
| 2.3.1 Vermehrung von chemokompetenten TOP10-Zellen | 43 |
| 2.3.2 Vermehrung von elektrokompetenten TOP10-Zellen | 43 |
| 2.3.3 Transformation und Kultivierung von Bakterien | 44 |
| 2.3.3.1 Transformation von chemokompetenten TOP10-Zellen..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.3.2 Transformation von elektrokompenten TOP10-Zellen..... | 44 |
| 2.3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA..... | 45 |
| 2.3.4.1 Schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA | 45 |
| 2.3.4.2 Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA | 46 |
| 2.3.4.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit von..... Qiagen | 46 |
| 2.3.4.4 Aufreinigung von endotoxinfreier Plasmid-DNA mit dem Plasmid..... Midi Kit von Qiagen..... | 47 |
| 2.3.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 48 |
| 2.3.6 Restriktion von Plasmid-DNA..... | 49 |
| 2.3.6.1 Restriktionskontrollen..... | 49 |
| 2.3.6.2 Restriktion zu Klonierungszwecken..... | 50 |
| 2.3.6.3 Dephosphorylierung zur Stabilisierung restringierter Plasmide..... | 50 |
| 2.3.7 Aufreinigung von restringierter DNA | 50 |
| 2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese..... | 51 |
| 2.3.9 Gel-Elution | 52 |
| 2.3.10 Ligation | 53 |
| 2.3.11 Auffüllen von überhängenden Restriktionsenden mittels Klenow-..... Behandlung..... | 53 |
| 2.3.12 RNA-Isolierung | 54 |
| 2.3.13 Reverse Transkription..... | 55 |
| 2.3.15 Quantitative („Realtime“) – PCR..... | 57 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 59 |
| 3.1 Herstellung und Funktionsanalysen vonIDO und OVA kodierenden | |
| Expressionsvektoren..... | 59 |
| 3.1.1 Herstellung vonIDO und OVA kodierenden Expressionsvektoren | 60 |
| 3.1.1.1 Klonierung von pCMV-sOVA..... | 60 |
| 3.1.1.2 Klonierung von pCMV-cOVA..... | 61 |
| 3.1.1.3 Klonierung von pFascin-sOVA | 63 |
| 3.1.1.5 Klonierung von pCMV-IDO-IRES-sOVA..... | 64 |
| 3.1.1.6 Klonierung von pCMV-IDO-IRES-cOVA..... | 66 |
| 3.1.1.7 Klonierung von pFascin-IDO-IRES-sOVA | 67 |
| 3.1.1.8 Klonierung von pFascin-IDO | 68 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.2. Analysen zur Funktionalität vonIDO und OVA kodierenden..... | |
| Expressionsplasmiden | 69 |
| 3.1.2.1 Nachweis vonIDO- und OVA-mRNA durch PCR-Analysen..... | 70 |
| 3.1.2.2 Nachweis des Tryptophanabbaus durch transfizierte NIH-3T3-Zellen | 71 |
| 3.1.2.3 In vivo-Funktionsanalysen vonIDO-Expressionplasmiden | 73 |
| 3.1.3 Einfluss einer Koexpression vonIDO auf die durch biolistische..... | |
| Transfektion induzierte transgenspezifische Immunantwort..... | 75 |
| 3.1.4 Einfluss einer Koapplikation vonIDO- und Antigen-kodierenden..... | |
| Plasmiden auf die antigenspezifische Immunantwort im Mausmodell der | 84 |
| IgE-vermittelten Typ I Allergie | 84 |
| 4. Diskussion | 91 |
| 5. Zusammenfassung | 104 |
| 6. Literatur | 106 |
| | |
| D. Anhang..... | VI |
| 1. Sequenzen der für die Klonierungen verwendeten Gene..... | VI |
| 2. pCI Vektorkarten | XI |
| E. Abkürzungsverzeichnis | XII |
| F. Lebenslauf | XIV |

B) Danksagung

C) Veröffentlichungen

Originalpublikationen:

Ludwig-Portugall, I., Montermann, E., Kremer, A., Reske-Kunz, A.B. and Sudowe, S.. *Prevention of long-term IgE antibody production by gene gun-mediated DNA vaccination.* **J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 951-7**

Bros, M., Jährling, F., Renzing, A., Wiechmann, N., Dang, N., Sutter, A., Ross, R., Knop, J., Sudowe, S. and Reske-Kunz, A.B. *A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid.* **Blood 2007; 109: 3820-3829**

Parizek M, Douglas TEL, Novotna K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarosova M, Palatinus L, Tesarek P, Ryparova P, Lisa V, dos Santos AM, Bacakova L. *Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering.* **International Journal of Nanomedicine 2012; Volume 2012:7 Pages 1931 - 1951**

Kongressbeiträge:

Kremer, A., Dang, N., Bros, M., Sudowe, S., Knop, J., Reske-Kunz, A.B. *Evaluating the tolerogenic potential of dendritic cells treated with dexamethasone.* **4th EAACI GA2LEN Davos meeting: Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology", 16.-19. Februar 2006, Garmisch-Partenkirchen**

Bros M, Jährling F, Kremer A, Wiechmann N, Dang NA, Sutter A, Ross R, Knop J, Sudowe S, Reske-Kunz AB. *Glucocorticoid-treated dendritic cells induce regulatory T cells.* **Workshop "Cellular and Molecular Mechanisms of Allergy" des SFB 548 (Analyse und Modulation allergischer und autoimmunologischer Krankheiten), 09. März 2006, Mainz**

Kremer, A., Dang, N., Bros, M., Sudowe, S., Knop, J., Reske-Kunz, A.B. *Dexamethasone treated dendritic cells exhibit tolerogenic potential.* **1ST joint meeting of European national societies of Immunology under the auspices of EFIS. 6.-9. September, 2006, Paris, France.**

M. Bros, V. Besche, C. Glowacki, N. Wiechmann, A. Renzing, N.A. Dang, S. Sudowe, J. Knop, A.B. Reske-Kunz. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone induces a tolerogenic state in murine dendritic cells.* **19. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 16./17. März 2007, Mainz. *Allergo-Journal* 16: 42 (Abstract V30).**

M. Bros, F. Jährling, A. Renzing, N. Wiechmann, N.A. Dang, A. Sutter, R. Ross, J. Knop, S. Sudowe, A.B. Reske-Kunz. *A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid.* **World Immune Regulation Meeting, 11. - 15. April 2007, Davos, Schweiz.**

V. Besche, C. Glowacki, N. Wiechmann, A. Renzing, N.A. Dang, S. Sudowe, J. Knop, A.B. Reske-Kunz, M. Bros. *Murine dendritic cells exert tolerogenic function at their immature state and upon differentiation in the presence of dexamethasone.* **37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), 05. - 08. September 2007, Heidelberg.**

S. Sudowe, H. Martin, A. Renzing, V. Besche, C- Glowacki, N. Wiechmann, A.B. Reske-Kunz, M. Bros. *Murine dendritic cells stimulated in the presence of dexamethasone induce regulatory T cells.* **8th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy**, 14. - 17. Februar 2008, Berlin.

M. Bros, N. Wiechmann, V. Besche, F. Jährling, A. Renzing, N.A. Dang, A. Sutter, R. Ross, S. Grabbe, S. Sudowe, A.B. Reske-Kunz. *Induction of adaptive regulatory T cells by immature and alternatively activated murine dendritic cells.* **49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie**, 11. – 13. März 2008, Mainz. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377 (Supplement 1): 44 (Abstract 196).

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, P. Scholtes, E. Closs, S. Finotto, M. Bros, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Co-expression of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) after gene gun-mediated DNA vaccination suppresses induction of transgene-specific immune responses.* **XXVII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)**, 07. - 11. Juni 2008, Barcelona, Spanien. *Allergy* 63 (Supplement s88): 200 (Abstract 511).

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, E. Closs, M. Bros, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Inhibition of transgene-specific immune responses after biolistic DNA vaccination by co-expression of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO).* **21. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI)**, 19./20. März 2009, Mainz. *Allergo-Journal* 18: 56 (Abstract V73).

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, A. Habermeier, P. Scholtes, S. Finotto, E. Closs, M. Bros, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Concurrent production of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) after biolistic DNA vaccination inhibits initiation of transgene-specific immune responses.* **2nd European Congress of Immunology**, 13. – 16. September 2009, Berlin. *Eur. J. Immunol.* 39 (Supplement 1): S331 (Abstract WSD19/4).

Renzing, A., Brady, MA., Douglas, T. and Warnke PH. *Development of a functional nanofibrous membrane using biomolecules for bone tissue engineering.* **Bone-tec 2009, International bone- tissue-engineering congress**, 08.-10- Oktober 2009, Hannover.

S. Sudowe, Y. Höhn, A. Renzing, J. Maxeiner, E. Montermann, C. Taube, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz. *Effect of co-expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) following gene gun-mediated DNA immunization on transgene-specific immune responses.* **40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)**, 22. – 25. September 2010, Leipzig.

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, J. Maxeiner, A. Habermeier, E. Closs, C. Taube, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *DNA-based co-expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits transgene-specific immune responses after gene gun mediated DNA vaccination.* **11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology**, 26. – 30. September 2010, Lugano, Schweiz.

1. Einleitung

Allergien sind eine der wichtigsten Volkskrankheiten dieses Jahrhunderts: Fast jeder Dritte in Deutschland ist bereits betroffen, möglicherweise mit immer noch steigender Tendenz, und immer häufiger leiden Kinder und Jugendliche unter Heuschnupfen, Nahrungsmittelallergien, atopischer Dermatitis und Asthma. Oft werden diese Allergien z.B. durch Feinstaubbelastungen am Arbeitsplatz ausgelöst oder verschlimmert, so dass die schweren Symptome nicht selten zu einer Arbeitsunfähigkeit führen. Daher ist es ein wichtiges Forschungsziel, die Mechanismen der Entstehung von Allergien zu verstehen und innovative Strategien der Allergie-Prävention und -Therapie zu entwickeln und zu evaluieren.

1.1 Typ I-Allergien

Der Begriff „Allergie“ bezeichnet eine „Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird“ [Janeway *et al.*, 2002]. Bereits in den 60er Jahren haben Coombs und Gell die bis dahin bekannten krankhaften Immunreaktionen nach ihrer Krankheitsentstehung (Pathogenese) in vier verschiedene Typen eingeteilt (Abb. 1.1.1).

| | Typ I | Typ II | Typ III | Typ IV |
|--|---|---|--|--|
| Auftreten der Symptome nach Allergenkontakt | 2 - 30 min | 5 - 8 h | 2 – 8 h | > 24 h |
| Antigen | löslich | zell- oder matrixassoziiert | löslich | löslich oder zellassoziiert |
| Auslösende Immunkomponente | IgE-Antikörper | IgG-Antikörper | IgG-Antikörper | T-Zellen |
| Effektor-mechanismen | Mastzell-aktivierung | Aktivierung des Komplementsystems, Zytotoxizität | Immunkomplexe, Komplement, Phagozyten | Aktivierung von Makrophagen, zytotoxische T-Zellen |
| Krankheitsbilder (Bsp.) | Rhinokonjunktivitis Allerg. Asthma, Anaphylaxie, Nahrungsmittelallergien | Bluttransfusionsreaktion, Erythroblastosis fetalis | Serumkrankheit, Farmerlunge, Arthus-Reaktion | Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion |

Abb. 1.1.1: Einteilung der Hypersensibilitätsreaktionen nach Coombs und Gell [aus Löffler, Petrides 2003]

Sie klassifizierten die vier verschiedenen Typen allergischer Reaktionen anhand von Merkmalen wie dem zeitlichen Ablauf, der Art des Antigens, der an der Reaktion beteiligten Immunkomponenten und Effektormechanismen sowie den Krankheitsbildern.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Typ I-Allergie, auf Grund des schnellen Auftretens der Symptome nach Allergenkontakt auch bezeichnet als „Überempfindlichkeit vom Soforttyp“. Die allergische Reaktion verläuft in zwei Phasen: Während der Sensibilisierung, dem ersten Kontakt mit dem Antigen, manifestiert sich eine Th2-polarisierte Immunantwort. Sie ist charakterisiert durch eine starke Differenzierung von Th2-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen, der Bildung der entsprechenden Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 und einer daraus resultierenden starken antigenspezifischen IgE-Produktion durch die proliferierenden allergenspezifischen B-Zellen. IgE bindet an die hoch-affinen FcεRI-Rezeptoren auf Gewebemastzellen. Erst deren Kreuzvernetzung mit dem spezifischen Antigen in der Auslösungs- bzw. Provokationsphase bei einem späteren Kontakt mit demselben Allergen führt zu einer Degranulation der Mastzellen und der Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren wie Histamin und Leukotrienen, welche die klinischen Symptome wie z.B. Anschwellen der Schleimhäute, gesteigerte Mukusproduktion oder Gefäßerweiterung verursachen, sowie zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. Charakteristische Merkmale von allergischem Asthma sind die Atemwegshyperreaktivität (AHR) auf diverse spezifische und unspezifische Stimuli hin, Atemwegsentzündungen, Eosinophilie und gesteigerte Mukussektion. Patienten mit allergischem Asthma neigen außerdem dazu, nach häufiger Stimulation eine chronische Atemwegsentzündung zu entwickeln [Umetsu und DeKruyff, 1997; Wills-Karp *et al.*, 1998; Geha *et al.*, 2003].

Derzeit stellt die allergenspezifische Immuntherapie (SIT), auch bekannt unter dem Namen Hyposensibilisierung, die einzige nicht allein antisymptomatische Behandlungsform zur langfristigen Therapie von Typ I-Allergien dar. Dabei werden dem Patienten über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren ansteigende Dosen des spezifischen Allergenextrakts subkutan injiziert oder sublingual verabreicht. Die Mechanismen, die zu einer erfolgreichen SIT führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Allerdings kommt es bei erfolgreicher Therapie zu bestimmten immunologischen Veränderungen: Die saisonale Steigerung der allergenspezifischen

IgE-Produktion wird inhibiert, während eine verstärkte Produktion von IgG4-Antikörpern einsetzt, die als blockierende Antikörper fungieren. Am Entzündungsherd sind weniger Effektorzellen anzutreffen und die antigen-spezifische T-Zellproliferation wird gehemmt. Außerdem wird die T-Zellbalance von Th2 nach Th1 verschoben und regulatorische T-Zellen werden induziert [Akdis und Blaser, 1999; Lewis, 2002; Frew, 2003; Till *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2012]. Bellinghausen *et al.* beschrieben 1997 erstmals, dass die SIT mit einer gesteigerten IL-10-Produktion einhergeht. Seitdem wurde die Induktion von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen in vielen Studien beobachtet und gilt als Schlüsselereignis bei der erfolgreichen SIT [Bellinghausen *et al.*, 1997; Till *et al.*, 2004; Vissers *et al.*, 2004; Piconi *et al.*, 2007].

Van Oosterhout *et al.* beschrieben 1998 als erste ein SIT-Modell in der Maus. Sie verwendeten das Modellallergen Ovalbumin (OVA) für eine subkutane Allergen-Immuntherapie und inhibierten in den therapierten Tieren erfolgreich die AHR und die Lungen-Eosinophilie sowie die IL-4-Produktion [Van Oosterhout *et al.* 1998].

Die SIT hat sich am Menschen vor allem für die Therapie von bestimmten Heuschnupfenarten und der Bienengiftallergie bewährt. Sie ist allerdings nicht so effektiv bei der Bekämpfung von allergischem Asthma. Problematisch ist auch, dass die SIT nicht in allen Patienten effektiv ist und dass die Behandlung einen langen Zeitraum von 3-5 Jahren umfasst [Lewis, 2002; Frew, 2003; Till *et al.*, 2004]. Des Weiteren sind starke Nebenwirkungen wie anaphylaktische Reaktionen nach der Injektion der Allergenmischung aus Haupt- und Nebenallergenen möglich [Greineder, 1996; Weber, 1997]. Aus diesem Grund wurde und wird stets an Möglichkeiten gearbeitet, die SIT zu vereinfachen und zu verbessern bzw. andere wirksame Therapiestrategien zu entwickeln.

Ein relativ neuartiges Verfahren zur Therapie von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen basiert auf einer Anti-IgE-Antikörperbehandlung. Der humanisierte monoklonale Anti-IgE-Antikörper, der unter dem Namen Omalizumab auf dem Markt vertrieben wird, bindet allergen-unspezifisch vor allem frei zirkulierendes IgE, aber auch zellständiges IgE und verhindert damit dessen Bindung an die FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen und die Degranulation dieser Zellen [Busse, 2001; Casale, 2001; Sarinho und Cruz, 2006]. Außerdem wird durch die Verminderung des freien IgE im Serum ein Rückkopplungsmechanismus ausgelöst, der zu einer reduzierten Expression von hoch-affinen FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen führt [Sarinho und Cruz, 2006]. Der Anti-IgE-Antikörper

wird den Patienten alle zwei bis 4 Wochen subkutan injiziert. Die Therapie mit Omalizumab führte in Testpatienten mit allergischem Asthma oder allergischer Rhinitis zu einer deutlichen Abnahme der Empfindlichkeit im Allergenprovokationstest und zu einer reduzierten Methacholinempfindlichkeit. Außerdem war die Sputumeosinophilie reduziert. In Testpatienten mit allergischer Rhinitis waren außerdem die Reizungen von Augen und Nase signifikant vermindert. Diese Effekte korrelierten mit dem Abfall der IgE-Titer in den Seren [Busse, 2001; Casale, 2001; Morjaria *et al.*, 2007]. Für Asthmatiker bietet diese Form der Therapie besondere Vorteile, da allergisches Asthma bisher hauptsächlich mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wird, die bei milder oder moderater Ausprägung der Krankheit wirksam sind, zur Behandlung von schwerem Asthma jedoch häufig nicht ausreichen. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Omalizumab auch in Patienten mit schwerem Asthma, deren Symptome nicht durch Kortikosteroide behandelbar sind, zu einer signifikanten Verminderung der Symptome führt [Busse, 2001; Sarinho und Cruz, 2006; Morjaria *et al.*, 2007]. Andererseits führt Omalizumab jedoch auch zu unerwünschten Nebenwirkungen wie lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen. Des Weiteren warnt die US Food and Drug Administration (FDA) vor der vermehrten Entstehung von malignen Tumoren unterschiedlichster Art unter der Therapie mit Omalizumab [FDA 2009]. Daher ist die Entwicklung neuer, verbesserter Therapieoptionen, die grundlegende allergenspezifische Änderungen im immunologischen Geschehen induzieren, dringend nötig.

1.2 DNA Vakzinierung

In den 90er Jahren wurde die DNA Vakzinierung erstmals als eine vielversprechende Methode zur Immunisierung von Nagetieren beschrieben, die sowohl eine robuste Aktivierung CD8⁺ T-Zellen als auch eine effektive humorale Immunantwort induziert [Tang *et al.*, 1992; Ulmer *et al.*, 1993]. Dabei werden somatische Zellen *in vivo* mit antigenkodierender DNA transfiziert, was sowohl eine effektive MHC Klasse I-restringierte CTL-Antwort als auch eine MHC Klasse II-restringierte Aktivierung von T-Helferzellen zur Folge hat [Donnelly *et al.*, 1997]. Die DNA-Immunisierung wird daher inzwischen für zahlreiche protektive und therapeutische Zwecke in verschiedenen präklinischen Tiermodellen für virale, bakterielle und parasitäre

Infektionen angewandt, sie ist aber auch als neue Form der Immuntherapie gegen Krebs, Autoimmunerkrankungen und Allergien etabliert [Reyes-Sandoval *et al.*, 2001]. In den meisten Studien wird nackte DNA als nicht-viraler Gen-Vektor verwendet. Am häufigsten wird die DNA intramuskulär oder intradermal mittels einer Nadel injiziert, alternativ ist auch die sogenannte biolistische Transfektion der Haut mit Hilfe der Genpistole eine populäre Methode der DNA-Applikation. Dabei wird nackte DNA an Goldpartikel gekoppelt, welche mit Hilfe von starkem Helium-Druck auf die Haut geschossen werden. Sowohl die intramuskuläre bzw. intradermale Injektion der DNA als auch die biolistische Transfektion induzieren eine stark ausgeprägte CTL-Immunantwort. Die humorale Immunantwort nach intramuskulärer bzw. intradermaler Injektion ist durch eine prädominante Produktion von spezifischen IgG2a Antikörpern charakterisiert, was eher für eine durch Th1-Zellen dominierte Immunantwort spricht, wohingegen eine Immunisierung mit der Genpistole eher zu einer auf der Aktivierung von Th2-Zellen basierenden Immunantwort mit der Sekretion von überwiegend IgG1-Antikörpern führt [Feltquate *et al.*, 1997]. Der Vorteil der biolistischen Transfektion gegenüber der intramuskulären oder intradermalen Injektion der DNA ist der, dass die DNA bei der Immunisierung mittels Genpistole direkt in epidermale Zellen eingeleitet wird und die Plasmide nicht erst aktiv durch Muskel- oder Hautzellen aufgenommen werden müssen, so dass 10- bis 100-fach geringere Mengen an DNA benötigt werden, um eine antigenspezifische Immunantwort auszulösen [Fynan *et al.*, 1993; Pertmer *et al.*, 1995]. Aus ersten klinischen Studien zur Sicherheit und Immunogenität von DNA-Immunisierungen kann man als Fazit ableiten, dass die biolistische Transfektion, auch bezeichnet als PMED („particle-mediated epidermal delivery“), als Transfektionsmethode *in vivo* der Injektion von nackter Plasmid-DNA in Bezug auf die Effizienz bei der Induktion von transgenspezifischen Immunantworten überlegen zu sein scheint [Fuller *et al.*, 2006; Ulmer *et al.*, 2006].

Die Transfektion somatischer Zellen mit allergenkodierenden DNA-Vektoren wird als „Allergen-Gentransfer“ bezeichnet. Einige Studien in verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass der Allergen-Gentransfer zu einer äußerst effektiven Suppression der spezifischen IgE Produktion, welche für die Pathogenese von allergischen Erkrankungen entscheidend ist, führt [Raz *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Maecker *et al.*, 2001; Jilek *et al.*, 2001; Adel-Patient *et al.*, 2001; Hochreiter *et al.*, 2003; Sudowe

et al., 2002; 2006; Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. In den meisten dieser experimentellen Studien wurde die DNA intramuskulär oder intradermal injiziert. In unserer Arbeitsgruppe konnte das erste Mal gezeigt werden, dass die biolistische Transfektion mit Plasmiden, die für das Modellallergen β -Galaktosidase (β Gal) kodieren, im Mausmodell der Typ I-Allergie eine Sensibilisierung verhindert und die Ausbildung einer systemischen Th2 Immunantwort beeinträchtigt [Sudowe *et al.*, 2006; Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. Außerdem verhinderte die therapeutische biolistische Transfektion von vorsensibilisierten Mäusen eine starke IgE-Produktion nach Provokation mit dem Antigen [Sudowe *et al.*, 2006]. Intrinsische Eigenschaften von Allergenen können jedoch den Behandlungserfolg mit Hilfe der DNA-Immunisierung mittels der Genpistole beeinträchtigen. So zeigten Scheiblhofer *et al.* [2007], dass eine biolistische Transfektion mit den Allergenen Bet v 1 (Birkenpollen) bzw. Phl p 5 (Grasspollen) im Gegensatz zu der Immunisierung mit dem Modelallergen β Gal zu einer Th2 basierten Immunantwort und zu keinem Schutz vor einer IgE Produktion führten [Scheiblhofer *et al.*, 2007]. Zudem kann die durch die DNA-Vakzinierung induzierte Immunantwort nach entsprechender pulmonaler Provokation zu einer starken Neutrophilie in der Lunge führen und schädliche lokale inflammatorische Reaktionen auslösen sowie eine Atemwegsüberempfindlichkeit induzieren [Zindler *et al.*, 2007].

1.3 Transkriptionelles „Targeting“ von dendritischen Zellen mittels des Fascin-Promotors

Dendritische Zellen (DCs) nehmen als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige regulatorische Wächterfunktion im Immunsystem ein, da sie sowohl Immunität als auch Toleranz induzieren können. So spielen die DCs auch bei der transgenspezifischen Induktion der Immunantwort nach DNA-Vakzinierung eine zentrale Rolle. Takashima *et al.* [1999] fassen die Rolle der DCs bei der genetischen Immunisierung in drei Aufgaben zusammen: 1. MHC Klasse II-restringierte Präsentation von exogenen Antigenen, welche von transfizierten somatischen Nachbarzellen der DCs freigesetzt werden, wodurch eine Immunantwort mit Aktivierung von vorrangig CD4⁺ T-Zellen ausgelöst wird. 2. MHC Klasse I-restringierte Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen, z.B. als „apoptotic bodies“, die von transfizierten Nachbarzellen abstammen und somit das exprimierte

Genprodukt als Protein enthalten, wodurch CD8⁺ zytotoxische T Zellen (CTLs) aktiviert werden. 3. MHC Klasse I-restringierte Präsentation von durch direkt transfizierte DCs endogen produziertem Antigen, wodurch ebenfalls eine CTL-Antwort induziert wird. Aufgrund ihrer herausragenden Stellung bei der Induktion von Immunantworten stellt die gezielte Beladung von DCs mit Antigen *in vivo*, auch bezeichnet als „DC-Targeting“, eine erfolgsversprechende Strategie für die Auslösung von spezifischen Immunantworten dar und steht im Fokus einer Reihe von präklinischen Studien [Tacke *et al.*, 2007]. So werden beispielsweise bei der Immuntherapie von Krebspatienten Antigene an Moleküle gekoppelt, die über spezifische Oberflächenmoleküle auf DC erkannt und gebunden werden, wodurch eine starke humorale Immunantwort ausgelöst wird [Tacke *et al.*, 2007]. Für die Immuntherapie von Typ-I-Allergien hingegen wäre eine vorrangig zelluläre Immunantwort wünschenswert. Sie kann durch eine primär auf DC begrenzte endogene Antigenproduktion erreicht werden, welche durch gezielte, direkte Transfektion von DC ausgelöst wird und als „transkriptionelles Targeting“ von DC bezeichnet wird [Ross *et al.*, 2003]. Um eine auf DCs fokussierte endogene Antigenproduktion zu gewährleisten, werden verschiedene eukaryotische DC-spezifische Promotoren eingesetzt, deren Effizienz in Bezug auf die Induktion einer Immunantwort nach einer entsprechenden biologischen DNA-Immunisierung stark variiert [Lauterbach *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2001]. So zeigen Cho *et al.*, dass die biologische Transfektion mit Plasmiden, die ein Antigen unter der Kontrolle des CD11b-Promotors kodieren, zu einer moderaten antigenspezifischen CTL-Antwort führt, jedoch zu keiner Antikörperproduktion [Cho *et al.*, 2001]. Weiterhin beschreiben Lauterbach *et al.*, dass die biologische Transfektion mit Plasmiden, die über den CD11c-Promotor verfügen, zu keiner optimalen T-Zell-Antwort führt. Sie schlussfolgern daraus, dass die Antigenpräsentation von nicht-DC essentiell für die komplette T-Zell Antwort nach DNA-Immunisierung mittels Genpistole ist [Lauterbach *et al.*, 2006]. Der in dieser Arbeit verwendete Fascin-Promotor ist dagegen für das transkriptionelle „Targeting“ von kutanen DC mittels der biologischen Immunisierung uneingeschränkt verwendbar, da er selektiv eine auf DCs der Haut limitierte Transgenexpression und daraus folgernd eine potente transgenspezifische Immunantwort vermittelt [Sudowe *et al.*, 2003; 2009]. Das Aktinbündelungsprotein Fascin ist für die Ausbildung der Dendriten in reifen DCs nötig und wird in frisch isolierten LCs nicht exprimiert [Ross *et al.*, 1998]. Das hat zur Folge, dass die

Transgenexpression zunächst nur auf die maturaen DCs und somit T-Zell-aktivierenden DCs beschränkt bleibt und eine möglicherweise toleranzinduzierende Antigenpräsentation durch immature DCs nicht stattfinden kann. Der Promotor des Gens dieses Proteins eignet sich daher besonders für das transkriptionelle „Targeting“ von DCs, da er neben DCs lediglich in neuronalen Geweben funktional ist [Ross *et al.*, 1998; 1999]. Des Weiteren ist die Expressionsrate der Gene unter der Kontrolle des Fascin-Promotors vielversprechend hoch [Ross *et al.*, 1998; 1999].

In früheren Arbeiten von Sudowe *et al.* [2003, 2006, 2009] wurden die Immunantworten, die durch biolistische DNA-Immunisierung mit den das Modellallergen β -Galaktosidase (β Gal) kodierenden Plasmiden pFascin- β Gal (β Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors) und pCMV- β Gal (β Gal unter der Kontrolle des Promotors des Cytomegalievirus) induziert wurden, vergleichend untersucht und detailliert charakterisiert. Wie zuvor dargelegt hat der Fascin-Promotor gegenüber dem ubiquitär aktiven CMV-Promotor den Vorteil, dass von allen transfizierten Hautzellen nur ausreifende Langerhanszellen und dermale DCs das Transgen exprimieren. Somit ist die Auslösung einer Immunantwort nach biolistischer Transfektion mit pFascin- β Gal einzig von den direkt transfizierten DCs abhängig, eine etwaige Präsentation von Antigen durch DCs, die freigesetztes Protein von transfizierten und transgenexprimierenden Keratinozyten aufgenommen haben, findet nicht statt. Die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit pFascin- β Gal induzierte eine ausgeprägte Th1-Antwort, charakterisiert durch eine starke IFN- γ -Produktion durch T-Helferzellen in der Milz und den Lymphknoten sowie einer vorherrschenden Produktion von IgG2a durch antigenspezifische B-Zellen [Sudowe *et al.* 2003; Sudowe *et al.*, 2009]. Die DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal führte dagegen eher zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort mit der Produktion von sowohl IgG1 als auch IgG2a. Die gemischte Th1/Th2-Antwort zeichnete sich dadurch aus, dass die drainierenden Lymphknotenzellen nach Restimulation *in vitro* bedeutende Mengen an IL-4 und IL-5 produzierten [Sudowe *et al.*, 2003; 2009], während in Milzzellkulturen die IFN- γ Produktion dominierte [Sudowe *et al.* 2003]. Die biolistische Transfektion sowohl mit pFascin- β Gal als auch mit pCMV- β Gal führte zu einer potenten Induktion von zytotoxischen T-Zellen [Sudowe *et al.*, 2003; 2009].

In einem gut etablierten Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie wurde gezeigt, dass die prophylaktische Vakzinierung mit dem Plasmid pFascin- β Gal mittels Genpistole zu einer signifikanten Inhibition der β Gal-spezifischen IgE-

Synthese führte [Sudowe *et al.*, 2006]. Diese Suppression der IgE-Produktion war sowohl mit einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer Th1-Antwort assoziiert, als auch durch die Rekrutierung einer großen Anzahl von CD8⁺ CTLs gekennzeichnet [Sudowe *et al.*, 2006]. Durch einen adoptiven Transfer der Milzzellen von BALB/c Mäusen, die zuvor mit pFascin-βGal biolistisch immunisiert worden waren, ließen sich die inhibitorischen Eigenschaften auf naive Empfängertiere übertragen [Sudowe *et al.*, 2009]. Der adoptive Transfer von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen allein, isoliert aus den mit pFascin-βGal vakzinierten Mäusen, führte ebenfalls zu den beschriebenen Effekten, jedoch in einer geringeren Ausprägung, was vermuten lässt, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen für eine effiziente Suppression der IgE-Immunantwort benötigt werden [Sudowe *et al.*, 2009]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibition der IgE-Synthese von der Produktion von IFN-γ abhängig ist, welches in großen Mengen von den CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen sekretiert wird [Sudowe *et al.*, 2009].

Durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal kam es zwar zu einer Inhibition der allergischen Immunantwort, die nachfolgend durch Sensibilisierung (intraperitoneale Injektion) mit βGal als Protein ausgelöst wurde, die die Th2-Antwort verändernden starken Th1- und CTL-Antworten hatten jedoch lokale immunpathologische Effekte zur Folge. In einem Mausmodell für allergische Atemwegserkrankungen wurde nämlich gezeigt, dass nach intranasaler Provokation der sensibilisierten Tiere eine prophylaktische Vakzinierung zwar zu einer Verringerung der Eosinophilenzahl in der Lunge und zu einer Reduktion der Th2-Immunantwort in den Atemwegen führte, dass gleichzeitig aber, bedingt durch die lokale Th1/CTL-Immunantwort, eine pulmonale Entzündungsreaktion induziert wurde, die durch eine ausgeprägte Infiltration mit Neutrophilen in der Lunge und funktionell durch das Auslösen einer schädlichen Atemwegshyperreaktivität (AHR) gekennzeichnet ist [Zindler *et al.*, 2008].

Um diese negativen Effekte zu umgehen, wird in dieser Arbeit ein alternatives Konzept verfolgt. Grundsätzliches Ziel dabei ist es, mittels DNA-Immunisierung eine effiziente Inhibition allergenspezifischer T-Zellen hervorzurufen und nicht eine Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen präferenziell in Th1-Zellen zu induzieren. Dabei soll in weiterführenden Arbeiten zudem überprüft werden, ob anstelle der Th1-Zellen regulatorische T-Zellen induziert werden.

Die Grundlage der *in vivo*-Studien dieser Arbeit stellt die Arbeitshypothese dar, dass die antigenspezifische Immunantwort durch die Applikation einer

Kombinationsvakzine, bestehend aus pFascin- β Gal bzw. pCMV- β Gal und einem Vektor, der das Gen für die Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), welche im nächsten Abschnitt näher erläutert wird, kodiert, inhibiert wird, so dass die oben beschriebenen negativen Effekte der biologischen DNA-Immunisierung umgangen werden könnten.

1.4 Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)

Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) ist ein Enzym aus dem Tryptophan-Stoffwechsel, welches den initialen Schritt des Abbaus dieser essentiellen Aminosäure zu Kynurenin sowie einer Reihe weiterer Katabolite katalysiert. Die Aktivität dieses Enzyms führt in der Mikroumgebung zur Tryptophan-Depletion und zur Akkumulation der proapoptotischen Abbauprodukte. IDO wird von verschiedenen Zelltypen wie DCs, Makrophagen, Monozyten, Eosinophile und Epithelzellen exprimiert, wobei in dieser Arbeit der Fokus auf die DCs gelegt wird [Johnson *et al.*, 2009]. Die IDO-Expression fungiert als lokaler immunsuppressiver Mechanismus und ist in verschiedenen Situationen mit der Induktion peripherer Toleranz assoziiert [Mellor und Munn, 2004].

So konnten beispielsweise Munn *et al.* [2002] nachweisen, dass Tumorzellen vermehrt IDO produzieren und den daraus resultierenden lokalen Tryptophanmangel als „Immune-escape“-Mechanismus nutzen [Munn *et al.*, 2002]. Seit dieser Zeit beschäftigt sich ein weites Forschungsfeld mit der Rolle der IDO in tumorinduzierter Toleranz, wobei auch klinisch ein großes Augenmerk auf IDO-Inhibitoren wie 1-Methyl-Tryptophan (1MT) gelegt wird [Liu und Wang, 2009]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die IDO zum Beispiel während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz spielt, damit der Fötus nicht abgestoßen wird [Munn *et al.*, 1998; Zhu, 2010]. In dieser Arbeit wird jedoch der Schwerpunkt auf die Rolle der IDO im Zusammenhang mit der Suppression von allergen-induzierten Immunantworten gelegt.

Der inhibitorische Effekt der IDO auf T-Zell-Antworten wird direkt dadurch vermittelt, dass der Tryptophanmangel im Mikromillieu einer IDO-produzierenden Zelle die Proliferation von T-Zellen supprimiert [Frumento *et al.*, 2001] und gleichzeitig die Kynurenin-Derivate die Apoptose insbesondere auch von aktivierten T-Zellen induzieren [Fallarino *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002]. Darüber hinaus haben sich Hinweise verdichtet, dass die IDO-Expression von DC *in vivo* mit der Induktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) korreliert [Park *et al.*, 2008]. Die IDO-vermittelte

Induktion von Tregs wird auch durch Untersuchungen, in denen das Enzym gezielt überexprimiert wurde, unterstützt [Yu *et al.*, 2008]. Allerdings ist der detaillierte Mechanismus der Expansion oder Aktivierung von Tregs durchIDO nicht bekannt. DieIDO-Produktion vonDCs wird durch verschiedene inflammatorische Mediatoren, vor allem durch Interferone, induziert [von Bubnoff *et al.*, 2003]. Der stärksteIDO-Stimulator inDCs ist das von T-Zellen während einer Immunantwort sekretierteIFN- γ , aber auch Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien induzieren dieIDO-Expression sehr potent [Fujigaki *et al.*, 2001] (Abb.1.3.1 Teil A). Des Weiteren führt auch die Bindung vonCTLA-4 auf T-Zellen anCD80/CD86-Moleküle aufDCs zur Generierung vonIFN- γ durch dieDCs selbst, wodurch wiederum eine erhöhteIDO-Produktion induziert wird [von Bubnoff *et al.*, 2003] (Abb. 1.3.1 Teil C). Zudem wird diskutiert, dass in klinisch asymptomatischen Atopikern eine distinkte Population vonFc ϵ RI⁺ Monozyten existiert, die nach Ligation des Rezeptors große Mengen anIDO produzieren und somit eine regulatorische Funktion für die allergenspezifische T-Zell-Antwort besitzen [von Bubnoff *et al.*, 2003, 2004] (Abb. 1.3.1. Teil B).

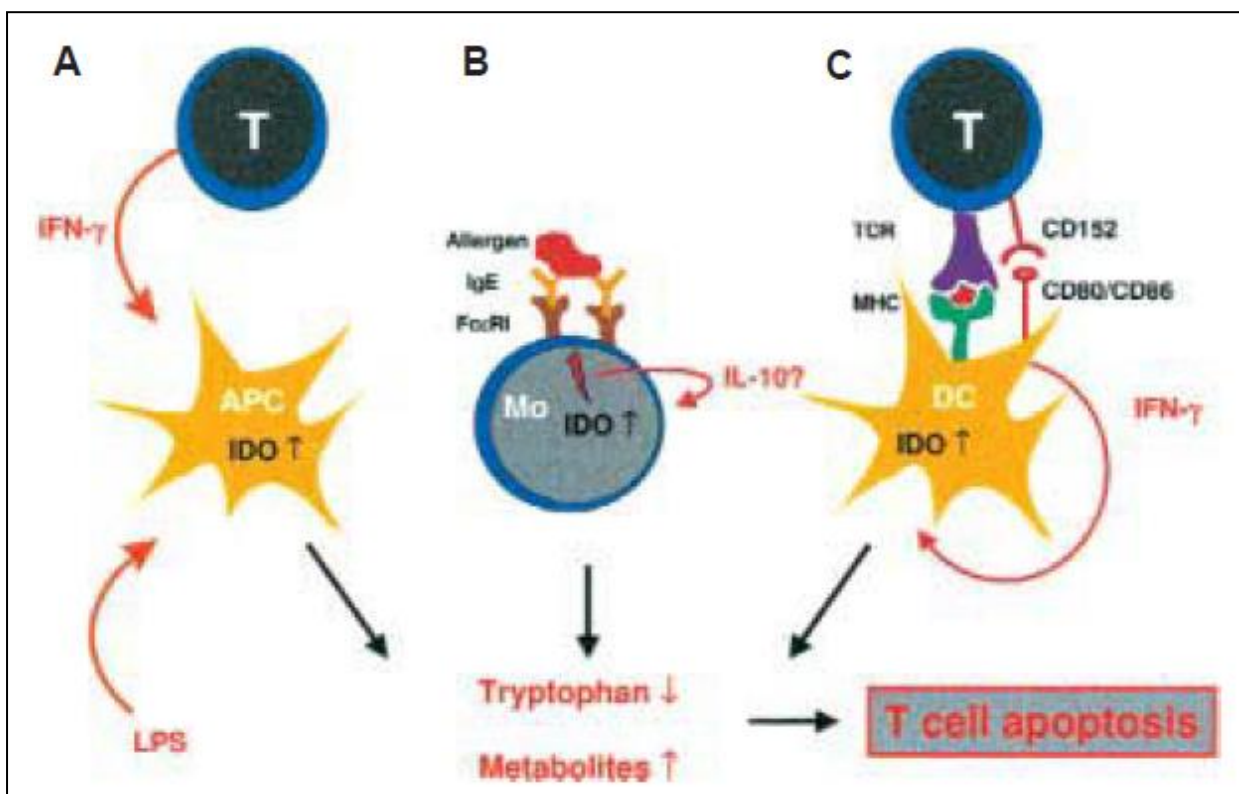


Abb. 1.3.1. Mechanismen der Induktion derIDO-Expression in APC [von Bubnoff *et al.* 2003]

A, IFN- γ von aktivierten T-Zellen und LPS von Bakterien induzierenIDO in APC sehr potent.

B, Stimulation von atopischen Monozyten durch Kreuzvernetzung desFc ϵ RI lässt eine Induktion vonIDO zu. Wahrscheinlich sind Faktoren wieIL-10 in die Runterregulation der allergischen Immunantwort involviert. **C**, von T-Zellen und anderen Zellen exprimiertesCTLA-4 (CD152) agiert als Ligand für B-7 (CD80 und CD86) Moleküle aufDCs. Der Signalweg überCD80/CD86 verursacht die Induktion vonIFN- γ in diesen Zellen, was wiederum zurIDO Induktion führt.

Die grundsätzliche Funktionalität des Konzeptes der Inhibition von allergenspezifischen T-Zell-Antworten durchIDO-Induktion wurde bereits in einem tierexperimentellen Asthma-Modell demonstriert, in dem dieIDO-Aktivität in Zellen der Lunge durch Aktivierung über den Toll-like-receptor 9 (TLR9) gesteigert wurde, was zur Abnahme pulmonaler inflammatorischer Symptome sowie zur Suppression der AHR führte [Hayashi *et al.*, 2004]. Darüber hinaus wurde ebenfalls in einem murinen Asthmodell gezeigt, dass die tolerogene Eigenschaft CD8 α^+ DC in diesem System partiell auf der Wirkung derIDO beruht [Gordon *et al.*, 2005].

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Evaluierung einer Strategie zur Therapie von Typ I-Allergien mittels biolistischer DNA-Immunisierung mitIDO-kodierenden Expressionsplasmiden in Kombination mit allergenkodierenden Vektoren. Das Konzept, das dabei verfolgt wird, ist eine durch DNA-Immunisierung induzierte konstitutiveIDO-Expression spezifisch durch allergen- (β Gal bzw. OVA) präsentierende DCs. Durch die Aktivität des Enzyms sollen die mit den DCs interagierenden allergenspezifischen T-Zellen direkt supprimiert werden. Da gezeigt wurde, dass Kynurenine, die Abbauprodukte des Tryptophans, neurotoxisch sind und dass eine systemische Überproduktion dieser Abbauprodukte im Zusammenspiel mit einer Tryptophan-Depletion zu neurodegenerativen Nebenwirkungen führen kann [Wichers *et al.*, 2004], soll durch die Verwendung des Fascin-Promotors dieIDO-Produktion primär auf allergenpräsentierende DCs beschränkt sein und somit eine Kontrolle der Transgenexpression gewährleistet werden. Dabei soll zunächst *in vitro* und anschließend auch *in vivo* im Mausmodell der Typ I-Allergie die neue genetische Vakzinierungsstrategie evaluiert werden. Grundsätzliches Ziel dabei ist, mittels DNA-Immunisierung eine effiziente Inhibition allergenspezifischer T-Zellen hervorzurufen und nicht eine Polarisierung von CD4 $^+$ T-Zellen präferenziell in Th1-Zellen zu induzieren, da daraus, wie unter 1.3 ausführlich beschrieben, lokale immunpathologische Effekte resultieren können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Laborgeräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|---------------------------|---|--|
| Analysenwaage | Precisa 120 A | Oerlikon AG, Zürich, Schweiz |
| Autoklav | V-150 | Systec GmbH, Wettenberg |
| Bakterienschüttler | RBI-112 Benchtop Incubator Shaker Áerotron | Infors, Bottmingen, Schweiz |
| Bestrahlungsgerät | Gammacell 2000 | Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark |
| Brutschrank | Heraeus KB 600 | Heraeus, Hanau |
| | Heraeus B 5061 EK-CO ₂ | Heraeus, Hanau |
| | CB 150 | Binder GmbH, Tuttlingen |
| Digitalwaage | Basic Typ 1202 | Sartorius, Göttingen |
| Dispenser | Multipette® 4780 | Eppendorf, Hamburg |
| Durchflusszytometer | FACScan | BD, Heidelberg |
| Elektrophorese-Netzgeräte | Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| | Electrophoresis Power Supply- EPS 3500 XL | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Elektrophorese-Kammern | Horizon™ 11-14 | Gibco BRL, Eggenstein |
| Elektroporator | Gene Pulser™ | BioRad |
| ELISA-Waschgerät | Ultrawash plus | Dynex, Chantilly, USA |
| ELISpot-Auswerteeinheit | ELISpot Lesesystem AID | AID (Autoimmun Diagnostika GmbH), Strassberg |
| Folien-Einschweiß-Gerät | Heat Sealer 1295-012 | Audion Elektro, Kleve |

Material und Methoden

| | | |
|------------------------|---|--|
| Gel-Auswertungs-System | E.A.S.Y. enhanced analysis system | Herolab GmbH, Wiesloch |
| Gen-Pistolen-System | Helios™ Gene Gun, Modell 297BR0078: Cartridge-Kit (Nr.165-2440). Präparierstation (Nr. 165-2418), Schneidegerät für Patronen (Nr. 165-2422) | BioRad, München |
| iCycler IQ® | Thermal Cycler | Bio-Rad, München |
| Kamera | Fotoapparat SC 35, Typ 12 | Olympus, Hamburg |
| | BX-FLA Mikroskopkamera | Olympus, Hamburg |
| Magnetrührer | MR 3001 | Heidolph, Kelheim |
| Mehrkanalpipette | Finnpipette, 12-Kanalpipette 50-300 µl | Labsystems, Helsinki, Finnland |
| | m 300, 12-Kanalpipette, 30 – 300 µl | Biohit, Helsinki, Finnland |
| Mikroskop | Labormikroskop CH-2 (4-40x) | Olympus, Hamburg |
| | Inverses Routinemikroskop CK-2 (4-20x) | Olympus, Hamburg |
| Mikrowellengerät | Micromat 241 | AEG |
| pH-Meter | PH 538 Multical® | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW) GmbH, Weilheim |
| Pipetten | Eppendorf-Reference®-Pipetten: 1-10µl, 10-100µl, 200-1000µl | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfen | Pipetus®-akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| | Pipetboy plus | Tecnomara, Zürich, Schweiz |
| Präparierbesteck | | Hammacher, Solingen |
| Reaktionsgefäß-Rüttler | Vortex Genie 2™ | (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) |

Material und Methoden

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Spannungsgerät | Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Spektralphotometer | Ultrospec 1100 pro E _{max} precision micro plate reader | Biochrom Ltd., Cambridge, UK Molecular Devices, Sunnyvale, USA |
| Sterilwerkbank | Heraeus Lamin Air [®] HB 2448 | Heraeus, Hanau |
| Stickstofftank | BT 40 | Láir liquid, Wiesbaden |
| Szintillationszähler | 1205 Betaplate | LKB Wallac, Freiburg |
| Thermocycler | DNA Thermocycler 480 | PerkinElmer, Zaventem, Belgien |
| | 7900 HT Fast Real-Time PCR System | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Trocken- und Wärmeofen | T6030 | Heraeus Instruments, Hanau |
| Ultraschallbad | Transsonic T570 | Elma, Singen |
| UV-Tisch | N90 MW 312 NB | Faust, Schaffhausen, Schweiz |
| Wasserbad | GFL Typ 1012 | Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL), Burgwedel |
| Wasserdeionisierungsanlage | Purelab Classic DI | ELGA, Bucks, Großbritannien |
| Zählhilfe | Laboratory Counter | Clay Adams, Becton Dickinson, Heidelberg |
| Zählkammer | Neubauer Improved Bright Line; 0,1mm | AO; Buffalo, USA |
| Zellerntegerät | 1205-001 Cell Harvester | LKB Wallac, Freiburg |
| Zentrifugen | Sorvall RC5C Plus Sigma 112 Sigma 1-14 Galaxy Mini | Du Pont, Bad Homburg VWR |
| Zytospin-Zentrifuge | Cytospin 3 | Shandon, Frankfurt |

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien (Glas und Plastikwaren)

| Material | Größe/Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|---|
| Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten | - | Abgene, England |
| Bakteriologische Petrischalen | Ø 94mm, Höhe 16mm (Nr. 633161) | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Braunüle | 1,3 x 45 mm, Vasofix® (Plastikkatheter für BAL) | B/Braun, Melsungen |
| Deckgläser | Ø 18 mm | Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen |
| | 18 x 18 mm | Vertrieb durch Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| | 24 x 50 mm | Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Einmal- Feindosierungsspritze, zweiteilig | Injekt-F 1 ml 0,01 ml / 1,0 ml (für BAL) | B/Braun, Melsungen |
| | Omnifix®-F 1ml 0,01 ml / 1,0 ml (für i.p. Injektion) | B/Braun, Melsungen |
| Einmalkanülen | 0,4 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektion) | B/Braun, Melsungen |
| | 0,5 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektion) | B/Braun, Melsungen |
| Einmalspritzen | 10 mL, Discardit™ II | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Einschweißfolien | 102 x 258 mm | Wallac, Turku, Finnland |
| ELISA-Platten | 96-Loch-Flachbodenplatte, Microlon, high binding | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| ELISpot-Platten | MultiScreen 96- Vertiefungenplatte | Millipore Corporation, USA |
| Eppendorfreaktionsgefäße | 0,5ml, 1,5ml und 2ml | Eppendorf, Hamburg |

Material und Methoden

| | | |
|-------------------------|--|---|
| Glaspipetten | Pericolor 5, 10 und 25 ml | Hilgenberg GmbH, Malsfeld |
| | Techcolor 5, 10 und 25 ml | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| | Silberbrand Eterna 5, 10 und 25 ml | Brand GmbH & Co.KG, Wertheim |
| Handschuhe | Sempercare® | Semperit, Österreich |
| Küvetten | Einmal-Küvetten, 1,5 ml | Brand GmbH & Co.KG, Wertheim |
| Kulturflaschen | 25 cm ² -TC Kulturflasche | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| | 75 cm ² -TCKulturflasche | |
| Kulturplatten (steril) | Costar 24-Loch Platte (Flachboden) | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| | Costar 48-Loch Platte (Flachboden) | |
| | Cellstar 96-Loch Platte (Flachboden) | |
| | 96 well Cell Culture Cluster, Half-Area (A/2) | Costar, Cambridge, USA |
| MACS® Separationssäulen | MS-Säulen | Miltenyi-Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| | LS-Säulen | |
| Objektträger | 76 x 26 cm mit Mattrand | Vertrieb durch Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Pasteurpipetten | 150 mm | VWR GmbH, Darmstadt |
| PCR-Platten | Thermo-Fast® 96, 0,2ml | Abgene, Hamburg |
| Pipettenspitzen | gelbe Spitzen: bis 200 µl | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| | blaue Spitzen: bis 1000 µl | Roth, Karlsruhe |
| Plastikpetrischalen | 6 cm (Nr. 628161) | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |

| | | |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Plastikpipetten (steril) | 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Polypropylen-Röhrchen | 15 ml und 50 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Präzisions Dispenser-Tips | 0,5 ml (10µl Einheiten) und 2,5 ml (50 µl Einheiten) | Brand GmbH & Co.KG, Wertheim |
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| Schlauch für Gen-Pistolen-Patronen | Tefzel Tubing | Bio Rad, München |
| Sterilfilter | 0,45 µm | Schleicher & Schuell, Dassel |
| | 0,2 µm | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| Thermo-96-Loch-Platten | 96-Loch-Mikrotestplatte, Thermowell® GOLD | Corning Incorporated, Corning, USA |
| Zellsieb | Cell Strainer: Ø 40 µm | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| 2-β-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| 2,2,2 Tribromoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-Methyl-2-butanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Tabletten | Sigma, Deisenhofen |
| ³ H-Thymidin (³ HTdR) | Amersham Biosciences GmbH, Freiburg |
| Agarose, NEEO, Typ II | Sigma, Deisenhofen |
| Albumin, Hühnerei (Ovalbumin) | Calbiochem, La Jolla, USA |
| Alkopharm 70 (70%iger Alkohol) Haut- und Händedesinfektion | Brüggemann, Heilbronn |
| Aluminiumhydroxid, Imjekt® Alum | Perbio, Wien, Österreich |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S) | Ratiopharm, Ulm |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Riedel-de-Haën, Seelze |
| β-Galaktosidase (# G-3153) bei Antigene | Sigma, Deisenhofen |
| β-Galaktosidase gelistet | Roche |
| Borsäure (H ₃ BO ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | PAA Laboratories, Cölbe |
| Bromphenolblau, Na-Salz (C ₁₉ H ₃₇ BrNa) | Roth, Karlsruhe |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Roth, Karlsruhe |
| Diethylether (C ₄ H ₁₀ O) | Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken |
| Dimethylformamid (DMF) | Sigma, Deisenhofen |
| DNase I | Roche, Mannheim |
| Essigsäure 100%ig (C ₂ H ₄ O ₂) | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol 96 %ig (C ₂ H ₅ OH) | Martin und Werner Mundo OHG, Mainz- Kostheim |
| Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5- phenylphenantridiumbromid) 1 % (w/v) Lösung | Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ x Na ₂ x 2 H ₂ O) | Roth, Karlsruhe |
| Glukose | Sigma, St. Louis |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Gold-Trägerpartikel (1,6 µm) | BioRad, München |
| Harnstoff (CH ₄ N ₂ O ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Hefe-Extrakt | Gibco BRL, Erlangen |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol (2-Propanol) (C ₃ H ₈ O) | Heidinger, Stuttgart |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogencarbonat | Roth, Karlsruhe |

Material und Methoden

| | |
|---|-----------------------------|
| Kollagenase Typ 2 | Worthington, St. Katharinen |
| L(+)-Glutamin ($C_5H_{10}N_2O_3$), 200mM | Roth, Karlsruhe |
| L-Tryptophan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) | Sigma, Deisenhofen |
| Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) | Merck, Darmstadt |
| $MnCl_2$ | Merck, Darmstadt |
| Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder Plus, 0,5 mg DNA/ml, 250-10000 Bp) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| MOPS | Roth, Karlsruhe |
| Natrium-Acetat ($CH_3COONa \times 3H_2O$) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN_3) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid ($NaCl$) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid ($NaOH$) | Roth, Karlsruhe |
| Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD), ($C_6H_8N_2 \times 2 HCl$) | Sigma, Deisenhofen |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Polyvinylpyrrolidon-Ethanol-Lösung (PVP) | BioRad, München |
| $RbCl_2$ | Sigma, Deisenhofen |
| RNase-freie DNase (1500 U) | Qiagen, Hilden |
| RNase-freies Wasser | Qiagen, Hilden |
| Roti®-Quant | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCl), 37 %ig | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure (H_2SO_4), 95 Vol.%ig | Roth, Karlsruhe |

Material und Methoden

| | |
|---|-------------------------------|
| Spermidin | Sigma, Deisenhofen |
| Streptavidin-Peroxidase | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix | ABgene, Hamburg |
| Szintillationsflüssigkeit | Perkin Elmer, Turku, Finnland |
| Tri-Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$) | Roth, Karlsruhe |
| Tris ($C_4H_{11}NO_3$) | Roth, Karlsruhe |
| Tris/HCl ($C_4H_{11}NO_3HCl$) | Roth, Karlsruhe |
| Triton-X 100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol, $C_{34}H_{62}O_{11}$) | Sigma, Deisenhofen |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Tween [®] -20 (Polyoxyethylensorbitan- Monolaurat) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Wasser, pyrogenfrei, steril | Aqua B. Braun, Melsungen |
| Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %ig | Merck KGaA, Darmstadt |

2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurden mit entsalztem Wasser aus der hauseigenen Deionisierungsanlage angesetzt und soweit nicht anders angegeben bei 4°C gelagert.

2.1.4.1 Puffer und Lösungen

AEC-Lösung

Eine AEC-Tablette wurde in 2,5 ml DMF gelöst und 525 µl dieser Stammlösung in 10 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5) gegeben. Durch 30 minütiges Rühren mittels Magnetrührer wurde die Gebrauchslösung vermischt, durch einen 0,45 µm Filter filtriert und kurz vor der Färbereaktion mit 1 µl H_2O_2 / ml AEC-Lösung versetzt.

Avertin-Stammlösung

In 10 ml tert. Amylalkohol (2-Methyl-2-butanol) wurden 10 g 2,2,2-Tribromoethanol durch ausgedehntes Vortexen gelöst.

Avertin-Gebrauchslösung (zur Sedierung der Versuchsmäuse)

Die Gebrauchslösung wurde 2,5%ig aus der Stammlösung durch Verdünnen in sterilem 1 x PBS (pH 7,2) angesetzt. Dazu wurden 250 µL Avertin-Stammlösung in 9,75 ml 1 x PBS bei RT durch starkes Vortexen vermischt.

Bromphenolblaulösung (Puffer zum Auftragen von DNA auf Elektrophoresegele)

42 g Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_3$), 50 g D(+)-Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 0,0037 g Na_2EDTA und 0,1 g Bromphenolblau wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Gey'scher Lysepuffer

0,25 g KHCO_3 , 2,07 g NH_4Cl und 0,0093 g EDTA wurden in 250 ml deionisiertem Wasser aufgelöst, auf pH 7,5 eingestellt und durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

Glycerinlösung zum Einfrieren von Bakterien

Glycerin und 2 x LB-Medium wurden zu gleichen Teilen gemischt und autoklaviert.

HBSS (Hank' s balanced salt solution)

In diesem Puffer, der von Gibco, Paisley, UK bezogen wurde, wurde die Kollagenase Typ 2 gelöst und auf eine Konzentration von 5,9 mg/ml eingestellt.

1 x PBS (Phosphate buffered saline)

40,2 g NaCl und 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 5 l deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

10 x PBS

402 g NaCl und 78 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 5 l deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 6,6 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

TBE-Puffer

18,6 g Na₂EDTA, 432 g Tris, 222,4 g Borsäure wurden mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt und ein pH-Wert von 8,5 eingestellt. Dieser Puffer wurde 1:10 verdünnt für die Gelelektrophorese eingesetzt.

Trypanblau-Lösung

Von einer Stammlösung (0,1% (w/v)) Trypanblau und 0,01% (w/v) NaN₃ (gelöst in H₂O) wurde eine Gebrauchslösung in einem Verhältnis von 9:1 in 10 x PBS hergestellt.

2.1.4.2 Zellkulturmedien und Zusätze

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit frisch isolierten Zellen aus Mäusen gearbeitet, die *ex vivo* oder nach Kultivierung *in vitro* getestet wurden. Außerdem wurden Tests mit der Zelllinie NIH3T3 durchgeführt. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde den Puffern, Kultur- und Waschmedien fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum) zugesetzt, welches als Nährstoffquelle mit größtenteils noch unbekanntem, aber essentiellen Wachstumsfaktoren dient. Das Kälberserum wurde steril und mykoplasmenfrei bezogen und portioniert bei -20°C gelagert. Manchen Medien wurden zusätzliche Nährstoffquellen wie Glutamin oder Natriumpyruvat zugefügt. Zum Schutz vor Verkeimung wurde allen Medien die Antibiotikamischung Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

2-Mercaptoethanol (5 mM)

40 µl 2-Mercaptoethanol von Roth (Karlsruhe) wurden in 114 ml IMDM verdünnt und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Den Kulturmedien wurde diese Lösung einprozentig (v/v) zugegeben.

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

Dieses Medium wurde mit weiteren Zusätzen als Waschmedium für Lungen-, Lymphknoten- und Milzzellen verwendet und von Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien) bezogen.

Fötales Kälberserum (FCS)

FCS wurde dem Kulturmedium für Lymphknoten- und Milzzellen 10% (v/v) und dem Waschmedium 2% (v/v) zugegeben. Es wurde von PAN Biotech GmbH, Aidenbach, bezogen.

Glutamin (200 mM)

5,84 g L(+)-Glutamin (Roth, Karlsruhe) wurden in 200 ml 1 x PBS gelöst und durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Diese Lösung wurde den Kulturmedien 1% (v/v) zugegeben.

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

IMDM diente als Grundmedium mit weiteren Zusätzen zur Kultivierung von Lymphknoten-, Lungen- und Milzzellen und wurde von PAA Laboratoires GmbH (Pasching, Österreich) bezogen.

Penicillin/Streptomycin (Pen / Strep)

Eine Antibiotikamischung aus 10^4 I.U./ml Penicillin und 10^4 µg/ml Streptomycin wurde den Kultur- und Waschmedien 1% zugegeben, um sie vor Verkeimung zu schützen.

Kulturmedium für Lymphknoten-, Milz- und Lungenzellen

Zur Kultivierung von Lymphknoten- und Milzzellen wurde IMDM mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

Kulturmedium für NIH3T3-Zellen

Zur Kultivierung der NIH3T3-Zellen wurde IMDM mit 5% (v/v) FCS, 1mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

Waschmedium

Zum Waschen frisch isolierter Milz- und Lymphknotenzellen sowie kultivierter Zellen wurde EMEM mit 2% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

2.1.4.3 Medien und Nährböden für die Bakterienkultur

LB (Luria Bertani)-Agar

15 g Agar-Agar wurden in einem Liter LB-Medium gelöst. Die Nährflüssigkeit wurde autoklaviert, auf 45°C abgekühlt und dann in Petrischalen gegossen. Nach dem vollständigen Erkalten der Agarplatten wurden die Petrischalen verschlossen und über Kopf gelagert bei 4°C aufbewahrt.

LB (Luria Bertani)-Medium (flüssig)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden in 1 l Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,2 – 7,4 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert. Dem Medium wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (100 µg/ml) als Selektionsmarker zugesetzt, dann wurde es zur Anzucht von Bakterien- Kulturen verwendet.

2.1.4.4 ELISA-Puffer und -Lösungen

0,1 M NaHCO₃-Puffer (Beschichtungspuffer)

In einem Liter deionisiertem Wasser wurden 8,401 g NaHCO₃ gelöst, der pH Wert dieser Lösung ist 8,2. In diesem Puffer wurden die Fänger-Antikörper zur Beschichtung der Vertiefungen in den Mikrotiterplatten auf die geeignete Konzentration verdünnt.

Blockierungs- und Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA)

Zur Absättigung freier Valenzen auf der Mikrotiterplatte, welche nicht durch die Fänger-Antikörper blockiert wurden, wurde PBS/1%BSA benutzt. Dazu wurde 1 g BSA (Bovines Serum Albumin) in 100 ml 1 x PBS gelöst. In diesem Puffer wurden außerdem Detektionsantikörper, Enzym und Probenmaterial/Standard für den ELISA verdünnt.

OPD-Substratpuffer

15,6 g NaH₂PO₄ x 2H₂O und 14,7 g tri-Na-Citrat x 2H₂O wurden in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit HCl konz. auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. In diesem Puffer wurde das Substrat OPD gelöst und kurz vor der Entwicklung des ELISAs wurde als Kosubstrat 30% H₂O₂ in einer Konzentration von 1 µl/ml zugesetzt.

Stop-Lösung (1 M H₂SO₄)

In 947 ml entionisiertes Wasser wurden 53 ml konzentrierte Schwefelsäure (H₂SO₄) gegeben. Mit dieser Lösung wurde der Substratumsatz beim ELISA abgestoppt.

ELISA-Waschpuffer

500 ml 10 x PBS (pH 6,6) und 5 ml Tween 20 wurden mit 4,5 l deionisiertem Wasser gemischt. Der Puffer wurde zum Waschen der ELISA-Platten zwischen den einzelnen Inkubationsschritten verwendet.

2.1.4.5 Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen

1M CaCl₂

147,02 g CaCl₂ wurden in einem Liter Aqua dest.(endotoxinfrei) gelöst. Diese Lösung (1 M) wurde zum Koppeln von DNA an Goldpartikel verwendet.

Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Ethanol-Lösung

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 20 mg PVP pro ml absolutem Ethanol angesetzt. Für die Gebrauchslösung wurde diese auf eine Konzentration von 0,075 mg/ml in absolutem Ethanol verdünnt. Die PVP-Lösung musste stets frisch angesetzt verwendet werden.

Spermidin-Lösung (0,05 M)

7,26 mg/ml Spermidin wurden in endotoxinfreiem Aqua dest. gelöst.

2.1.5 Fertigsysteme

Für die Aufreinigung von RNA und Plasmid-DNA sowie der DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurden Fertigsysteme von Qiagen und Macherey-Nagel benutzt.

| System | Hersteller |
|---|-----------------------|
| NucleoSpin® RNAII Total RNA Isolation Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| Plasmid Midi Kit | Qiagen, Hilden |
| Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |

2.1.6 Plasmidvektoren

| System | Hersteller |
|----------|-------------------------------|
| pCI | Promega, Mannheim |
| pZero™-2 | Invitrogen™ life technologies |

2.1.7. Antikörper für Zytokin-ELISA und IFN- γ -ELISpot

2.1.7.1 Fänger-Antikörper

| Fänger-Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Einsatzkonzentration) und Puffer | Hersteller (Referenz) |
|---------------------------------------|------------|--------|---|---------------------------------------|
| Anti-Maus IFN- γ (für ELISpot) | Ratte-IgG1 | R4-6A2 | 1 mg/ml (2 μ g/ml) in sterilem 1x PBS | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus IFN- γ (für ELISA) | Ratte-IgG1 | R4-6A2 | (1:1000 verdünnt) in 0,1 M NaHCO ₃ | (Spitalny und Havell, 1984) |
| Anti-Maus/ Mensch IL-5 | Ratte-IgG1 | 11B11 | 0,5 mg/ml (1 ng/ml) in 0,1 M NaHCO ₃ | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |

2.1.7.2 Detektionsantikörper

| Detektions-Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Einsatzkonzentration) und Inkubationsbedingungen | Hersteller (Referenz) |
|--|-------------|------------|---|---------------------------------------|
| Anti-Maus IFN- γ , biotinyliert | Ratte-IgG1 | AN18.17.24 | (1:5000 verdünnt für ELISA; 1:500 für ELISpot) 60 min, 37°C | (Cherwinski <i>et al.</i> , 1987) |
| Anti-Maus IL-5, biotinyliert | Ratte-IgG2a | TRFK4 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 60 min, 37°C | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |

2.1.8 Antikörper für Immunglobulin-ELISA

| Antikörper | Klon bzw. Artikelnummer | Konzentration (Einsatzkonzentration) | Hersteller (Referenz) |
|---|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ziege-anti-Maus IgG1, biotinyliert | 1070-08 | 1 mg/ml (0,2 μ g/ml) | Biozol, Eching |
| Ziege-anti-Maus IgG2a, biotinyliert | 1080-08 | 1 mg/ml (0,2 μ g/ml) | Biozol, Eching |
| Ratte-anti-Maus IgE | EM95-3 | (1:1000) | Baniyar und Eshar, 1984 |
| Maus-anti-Ratte IgG, F(ab'), biotinyliert | 212-065-106 | 2,2 mg/ml (2,2 mg/ml) | Dianova, Hamburg |

2.1.9 Zytokine

Die im Folgenden aufgeführten murinen Zytokine wurden als Standard im Zytokin-ELISA mitgeführt, um die Konzentration der entsprechenden Zytokine in den Überständen von Lymphknoten- und Milzzellkulturen bestimmen zu können.

| Zytokin | Artikelnummer | Konzentration (Startkonzentration) | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------|------------------------------------|---|
| rekombinantes murines IFN- γ | #19301T | 2 $\mu\text{g/mL}$ (5 ng/ml) | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| rekombinantes murines IL-5 | #14-8051-62 | 10 $\mu\text{g/mL}$ (2 ng/mL) | NatuTec, Frankfurt |

2.1.10 Peptide

| Peptid | Hersteller |
|---|--------------------|
| $\beta\text{Gal}_{876-884}$ (TPHPARIGL) | Sigma, Deisenhofen |

2.1.11 Antigene

| Antigen | Hersteller |
|------------------------|--------------------|
| β -Galaktosidase | Sigma, Deisenhofen |
| β -Galaktosidase | Roche, Mannheim |

2.1.12 Enzyme

2.1.12.1 Allgemeine Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--|--------------------------------------|
| Kollagenase Typ 2 (50 mg/ml) | Worthington, St. Katharinen |
| DNase I (10 mg/ml) | Roche, Mannheim |
| „ExtrAvidin“, Streptavidin-Peroxidase Konjugat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |

2.1.12.2 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Die hier aufgeführten Restriktionsenzyme wurden für die unten beschriebenen Klonierungen und Testverdaue verwendet.

| Enzym | Erkennungssequenz | Hersteller |
|---------------|-------------------|---------------------|
| BamHI | G/GATCC | Fermentas |
| Bgl II | A/GATCT | Fermentas |
| Cla I | AT/CGAT | Fermentas |
| EcoRI | G/AATTC | TaKaRa |
| EcoRV | GAT/ATC | Fermentas |
| Nco I | C/CATGG | New England BioLabs |
| Nhe I | G/CTAGC | Fermentas |
| Not I | GC/GGCCGC | Fermentas |
| Sca I | AGT/ACT | Fermentas |
| SnaB I | TAC/GTA | New England BioLabs |
| Spe I (Bcu I) | A/CTAGT | Fermentas |
| Xba I | T/CTAGA | Fermentas |
| Xho I | C/TCGAG | Fermentas |
| Xmn I (Pdm I) | GAANN/NNTTC | New England BioLabs |

Die 10 fach konzentrierten Reaktionspuffer für die Enzyme wurden von den jeweiligen Herstellern bezogen.

2.1.13 Primer

2.1.13.1 Primer für die Realtime-PCR

| Murines Zielgen | Primer-Sequenz |
|-----------------|--|
| UBC | Sense: 5'-GTCTGCTGTGTGAGGACTGC- 3' Antisense: 5'-CAGGGTGGACTCTTTCTGGA- 3' |
| IDO | Sense: 5'- AAG GGC TTC TTC CTC GTC TC-3' Antisense: 5'- AAA AAC GTG TCT GGG TCC AC-3' |

2.1.13.2 Primer für die konventionelle PCR

| Murines Zielgen (Primernamen) | Primer-Sequenz |
|----------------------------------|--|
| pci SV40 | Antisense: 5'-CATAGTTGTGGTTTGTCC-3' |
| pl-5int-s | Sense: 5'-GAAGTTGGTGGTGAGGCACT-3' |
| Fascinpromoter (Isis fas 1) | Sense: 5'-CGGGCTGGCTTTGTGGAG-3' |
| IRES | Sense: 5'-GTGCACATGCTTTACATGTG-3' Antisense: 5'-GGGTTGTGGCAAGCTTATCATC-3' |
| OVA | Sense: 5'-CTTGCCAGTAGACTTTATGC-3' Antisense: 5'-CGAATCCTGGAAGTTTATC-3' |
| HPRT | Sense: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' Antisense: 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3' |

Zur Amplifikation von IDO wurden die selben Primer benutzt wie in der Realtime PCR.

2.1.14 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden weibliche Inzuchtmäuse vom Stamm Balb/c J, Genotyp H-2^d, verwendet, die in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gezüchtet und von pathogenen Organismen isoliert gehalten wurden. Die Mäuse hatten bei Versuchsbeginn ein Alter zwischen 6 und 10 Wochen.

2.1.15 Zelllinie NIH3T3

Bei der NIH3T3-Zelllinie handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie, die für die ersten Funktionsanalysen der unten beschriebenen Expressionskonstrukte pCMV-IDO, pFas-IDO, pCMV-IDO-IRES-sOVA, pCMV-IDO-IRES-cOVA und pFas-IDO-IRES-sOVA als Zielzellen verwendet wurde. Diese Zellen lassen sich effizient transfizieren und können sowohl den CMV- als auch den Fascinpromoter transkribieren.

Die NIH3T3-Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml Kulturmedium (Vgl. 2.1.4.2) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche wurde der Kulturüberstand abgenommen und 10 ml frisches NIH3T3-Medium auf die Zellen gegeben. Waren die Zellen konfluent, wurden sie mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst und mit einer Glaspipette resuspendiert. 2 ml der Zellsuspension wurden mit 8 ml frischem NIH3T3-Kulturmedium in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche pipettiert und bei 37°C und 10% CO₂ weiter kultiviert.

2.1.16 Bakterienstamm

Für die molekulargenetischen Arbeiten wurde der Bakterienstamm *Escherichia Coli* TOP10 mit dem Genotyp mcrA Δ (mrr-hsd RMS-mcrBC) φ 80 lac Z Δ M 15Δ lac X 74 deo R rec A I ara B 139 Δ (ara-lac) 7697 gal U gal K rpsl (strR) end AI nup G in chemo- oder elektrokompetenter Form verwendet.

2.2. Tierversuche und zellbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Immunisierung mit der Genpistole

Die DNA-Immunisierung mit der Genpistole dient dazu, Hautzellen *in vivo* zu transfizieren. Bei dieser sogenannten biolistischen Transfektion wird an Goldpartikel gekoppelte DNA durch Heliumdruck mittels der Genpistole auf die rasierte Bauchhaut lebender Versuchstiere geschossen.

2.2.1.1 Kopplung von Plasmid-DNA an Goldpartikel und Herstellung der Patronen für die Genpistole

Für die biolistische Transfektion epidermaler Zellen wurde endotoxinfreie Plasmid-DNA an Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1,6 μM gekoppelt. Eine Patrone enthält jeweils 1 mg Gold mit 2 μg DNA. Nach Berechnung der benötigten Anzahl an Patronen und damit der benötigten Menge an Gold und DNA wurde die entsprechende Goldmenge in ein endotoxinfreies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen, in 100 μl 0,05 M Spermidinlösung kurz gevortext und diese Suspension dann für zehn Sekunden im Ultraschallbad verfeinert. Dann wurde die berechnete DNA-Menge hinzugefügt und durch erneutes Vortexen gemischt. Nach rascher Zugabe von 100 μl 1 M CaCl_2 -Lösung wurde die Suspension wieder gut gemischt und dadurch die DNA während einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur an die Goldpartikel präzipitiert. Nun wurde das DNA-Gold-Gemisch für 15 Sekunden bei 10000 Upm zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abpipettiert. Das Sediment wurde nachfolgend noch dreimal durch Resuspension in je 1 ml absoluten Ethanol gewaschen. Danach wurde das Sediment in mehreren Pipettierschritten mit insgesamt 1,75 ml pro 30 Patronen einer frisch angesetzten 0,075 mg/ml Polyvinylpyrrolidon (PVP)/Ethanol-Lösung gemischt und in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt. Zur Herstellung der Patronen wurde die Gold-DNA-PVP-Suspension mit Hilfe einer 10 ml Einmalspritze in einen speziellen Plastikschlauch (Tefzel Tubing, Bio-Rad) überführt, der zuvor durch 15 min Begasung mit N_2 „entfeuchtet“ wurde, wobei das PVP dabei als eine Art Klebstoff dient, der die Gold-DNA-Komplexe an den Schlauch bindet. Der Plastikschlauch wurde in eine entsprechende Präparierstation der Firma BioRad geschoben und 5 Minuten ruhen gelassen, damit sich die Gold-DNA-Komplexe absetzen konnten. Nach vorsichtigem Entfernen des

Ethanol aus dem Schlauch mit Hilfe einer 10 ml Spritze wurde der Schlauch durch Begasung mit Stickstoff getrocknet und aus der Station genommen.

Durch den Einsatz eines speziellen Schneidegerätes von BioRad wurde der Schlauch in gleichgroße Patronen zum Beladen der Genpistole geschnitten.

2.2.1.2. Durchführung der biolistischen Transfektion

Für die biolistische Transfektion wurde den Versuchsmäusen die Bauchhaut sorgfältig mit einem elektrischen Rasierer rasiert. Die Genpistole wurde an eine Helium-Gasflasche angeschlossen, ein Arbeitsdruck von 400 psi eingestellt und der Revolver mit den hergestellten Patronen beladen. Pro Immunisierung wurde jede Maus mit 4 µg DNA, also mit zwei Patronen à 2 µg DNA, auf nicht überlappende Hautareale beschossen. Im Abstand von je einer Woche wurden die Tiere dreimal mit der Genpistole immunisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass nie dieselben Hautstellen mehrmals beschossen wurden.

2.2.2 Intraperitoneale Immunisierung mit βGal

Für die Intraperitoneale (i.p.) Immunisierung wurde βGal (Sigma, Deisenhofen) in sterilem 1xPBS nach Herstellerangaben gelöst und in sterilem 1 x PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Sowohl für die Immunisierung als auch zur Sensibilisierung der Versuchstiere wurde βGal mit Aluminiumhydroxid (Imjekt® Alum, Perbio, Wien) im Verhältnis 1:2 gemischt und den Mäusen 200 µl dieser Suspension mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze in den Bauchraum injiziert, so dass jede Maus mit 1 µg βGal immunisiert wurde.

2.2.3 Serumgewinnung

Für die Serumgewinnung wurde den Versuchsmäusen Blut aus dem Augenhintergrund mit Hilfe einer Glaspasteurpipette entnommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Zur Defibrinierung wurde das frische Blut mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnte der entstandene Blutkuchen mit Hilfe einer schmalen Pinzette entfernt und das Serum durch zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000 Upm von den restlichen zellulären Bestandteilen abgetrennt werden. Anschließend wurde das Serum (klarer Überstand)

abgenommen, in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Analyse im Immunglobulin-ELISA (s.u.) bei -20°C gelagert.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt und ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO_2 -begasteten Inkubator bei 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 10% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

2.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und eine Verdünnung in physiologischer Trypanblau-Lösung hergestellt. Der Farbstoff kann durch geschädigte Zellmembranen diffundieren und bindet als saures Molekül an geladene zytosolische Proteine. Tote Zellen färben sich blau, während lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt bleiben. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Nach Auszählen der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (enthält 16 Kleinquadrate) ergibt die ermittelte Zahl (N) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

2.2.4.3 Präparation lymphoider Organe

Die Versuchsmäuse wurden per Genickbruch getötet.

2.2.4.3.1 Präparation von Lymphknotenzellen

Es wurden stets die drainierenden Lymphknoten präpariert: nach Immunisierung mit der Genpistole waren dies die axialen und inguinalen und nach intraperitonealer Immunisierung die mesenterischen Lymphknoten.

Die Lymphknoten wurden steril entnommen, sofort in eiskaltes Waschmedium (s.o.) gegeben und zwischen den rauen Seiten zweier abgeflammter Objektträger zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb ($40\ \mu\text{m}$) gegeben,

um so Bindegewebsaggregate zu entfernen. Nun wurde die Zellsuspension bei 300 x g und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert, das Zellsediment in Kulturmedium (s.o.) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt.

2.2.4.3.2 Präparation von Milzzellen

Die Milz wurde den Versuchsmäusen steril entnommen, sofort in eiskaltes Waschmedium (s.o.) gegeben und mit gezähnten Pinzetten fein zerzupft. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (40 µm) gegeben, um so Bindegewebsaggregate zu entfernen. Nun wurde die Zellsuspension bei 300 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Lyse der dünnwandigen Erythrozyten in hypotonischem Gey's Lysepuffer (1 ml pro Milz) resuspendiert. Die Reaktion musste nach einer Minute abgestoppt werden, um die Schädigung der Leukozyten zu verhindern. Dazu wurde das fünffache Volumen Waschmedium zugegeben und die Suspension erneut bei 300 x g und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellsediment in Kulturmedium (s.o.) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt (s.o.).

2.2.4.4 Antigen-spezifische Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen

Für die Bestimmung der antigen-spezifischen Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen wurden diese Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden *in vitro* mit dem relevanten Antigen β Gal stimuliert. Die Milzzellkulturen erfolgten in 24-Loch-Kulturplatten mit 5×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml pro Vertiefung zusammen mit dem entsprechenden Antigen (β Gal 25µg/ml) für 72 Stunden bei 37°C und 10% CO₂. Die Lymphknotenzellkulturen erfolgten in 48-Loch-Platten mit $5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml. Als Kontrolle dienten jeweils Kulturen ohne Antigen. Nach 72 Stunden Inkubation wurden 800 µl (24-Lochplatte) bzw. 400 µl (48-Lochplatte) Überstand je Vertiefung entnommen und in 48-Loch-Kulturplatten bei -20°C bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA aufbewahrt.

2.2.4.5 CTL-ELISpot

Der CTL-„Enzyme-Linked-ImmunoSpot-assay“ (CTL-ELISpot-Test) ist eine Methode zur Ermittlung der Anzahl IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Effektorzellen. Dazu wird

zunächst eine mit einer Nitrozellulosemembran ausgekleidete 96-Loch-Platte mit einem unmarkierten sterilen anti-IFN- γ -Antikörper beschichtet. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Kulturmedium (s.o.) wird die zu untersuchende Zellsuspension auf die Platte aufgebracht und in Anwesenheit von IL-2 durch die Zugabe eines MHC I-restringierten Peptids stimuliert, was zu einer Zytokinproduktion in den antigenspezifischen CD8⁺ T-Effektorzellen führt. Im Verlauf einer Kulturphase von 22 Stunden wird das freigesetzte IFN- γ von den an die Nitrozellulosemembran gekoppelten Antikörpern gebunden. An den Stellen, an denen sich IFN- γ -produzierende Zellen befinden, wird vermehrt IFN- γ an den Plattenboden gebunden. Zur Detektion wird nach dem Auswaschen der Zellen zunächst ein biotinylierter Detektionsantikörper gegen IFN- γ in die Vertiefungen pipettiert und in einem zweiten Schritt die ExtrAvidin-Peroxidase aufgebracht. Das Enzym bindet über Streptavidin an den biotinylierten Detektionsantikörper und setzt das anschließend zugegebene Substrat AEC mit Hilfe von H₂O₂ zu einem unlöslichen roten Farbkomplex um, der auf den hellen Nitrozelluloseböden als dunkler rundlicher Fleck sichtbar wird. Diese „Spots“ konnten dann im ELISPOT-Zählgerät mit Hilfe festgelegter Kriterien zu deren Identifikation (Größe, Intensität und Aussehen) ausgewertet werden.

Durchführung:

Die Vertiefungen der mit einer Nitrozellulosemembran ausgekleideten 96-Loch-Mikrotiterplatte (Millipore) wurden mit 50 μ l unmarkiertem Ratte-anti-Maus-IFN- γ -Antikörper in 1 x PBS in einer Konzentration von 10 μ g/ml beschichtet und über Nacht bei 4°C gehalten. Anschließend wurde die Platte zweimal mit jeweils 100 μ l sterilem 1 x PBS pro Vertiefung gewaschen und dann die freien Bindungsstellen mit 200 μ l Kulturmedium (s.o.) für ein bis zwei Stunden bei 37°C blockiert. Danach wurde das Medium wieder entfernt. Die Milzzellen wurden zu 1 x 10⁶ bzw. 2 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung auf die Platte gegeben. Es wurden pro Gruppe Quadruplikate mit und ohne Zusatz des MHC I-restringierten β Gal-Peptids TPHPARIGL (1 μ g/ml) angesetzt. Zu allen Ansätzen wurden 250 U/ml IL-2 pipettiert. Das Endvolumen der Kultur wurde auf 200 μ l eingestellt. Nach 22 Stunden Kultur bei 37°C und 10% CO₂ wurde die Platte zweimal im ELISA-Waschgerät mit Waschpuffer (s.o.) gewaschen und gründlich ausgeklopft. Die Detektion des von den Zellen sezernierten und von den Antikörpern gebundenen IFN- γ erfolgte durch die Zugabe von 50 μ l biotinyliertem Detektionsantikörper AN18.17.24 je Vertiefung in einer Verdünnung von 1:500 in 1 x PBS/1% BSA. Nach einer einstündigen Inkubationsphase bei 37°C

wurde die Platte erneut zweimal gewaschen und ausgeklopft. Dann wurden 50 µl ExtrAvidin-Peroxidase (1:1000 in 1 x PBS/1% BSA) aufgetragen. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation bei 37°C. Währenddessen wurde die zur Entwicklung des Tests benötigte AEC-Lösung angesetzt. Dazu wurde das Substrat AEC als Tablette in 2,5 ml DMF gelöst und anschließend 525 µl dieser Lösung in 10 ml 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt. Nach beendeter Inkubation wurde die ELISpot-Platte dreimal im ELISA-Waschgerät mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und die AEC Lösung durch einen 0,45 µm Filter filtriert und mit 1 µl/ml H₂O₂ versetzt. In jede der Vertiefungen wurden 50 µl Substratlösung pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von fünf bis fünfzehn Minuten waren rote Flecken zu erkennen, woraufhin die Substratlösung durch Ausschlagen der Platte entfernt wurde. Nach dem Trocknen der Platte über Nacht erfolgte die Auswertung mit Hilfe der ELISpot-Auswerteeinheit unter Berücksichtigung festgelegter Kriterien zur Identifikation der „Spots“ wie Größe, Intensität und Aussehen.

2.2.4.6 ELISA zur Bestimmung von Zytokinen in Kulturüberständen

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine IL-5 und IFN- γ in den Lymphknoten- und Milzzellkulturüberständen (s.o.) wurde ein ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay) durchgeführt. Die Bestimmung des Zytokingehalts erfolgte über die indirekte Sandwich-ELISA-Methode, wobei die Überstände in einer Verdünnungsreihe mit an ELISA-Platten gebundenen zytokin-spezifischen Fänger-Antikörpern inkubiert wurden. Die festgehaltenen Zytokine wurden dann in einem weiteren Schritt durch zytokin-spezifische biotinylierte Detektions-Antikörper und anschließend durch Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche im letzten Schritt das farblose Substrat OPD (s.o.) in ein photometrisch messbares Produkt umwandelt. Als Referenz wurden Standardlösungen der zu testenden Zytokine neben den Überständen mitgeführt.

Durchführung:

Die Adsorption der Fänger-Antikörper an ELISA-Platten erfolgte in 0,1 M NaHCO₃ (s.o.) bzw. 1 x PBS (Antikörper-Konzentrationen und verwendete Puffer siehe oben) in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung über Nacht bei 4°C. Nach diesem Schritt wurden die Platten zweimal im ELISA-Waschgerät mit Waschpuffer (s.o.) gewaschen und gründlich ausgeklopft. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurden die

Platten nun mit 150 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde der Blockierungspuffer gründlich aus den Platten ausgeklopft. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden sowohl der Zytokinstandard (mit bekannter Konzentration) als auch die Überstände (mit unbekanntem Zytokingehalt) seriell zweifach in 1 x PBS/1% BSA verdünnt (50 µl pro Vertiefung) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft. Im Anschluss erfolgte die Bindung der biotinylierten Detektions-Antikörper (50 µl pro Vertiefung) während einer 60 minütigen Inkubationsphase bei 37°C. Nach erneutem zweimaligen Waschen im ELISA-Waschgerät mit ELISA-Waschpuffer wurden 50 µl pro Vertiefung ExtrAvidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000 in 1 x PBS/1%BSA auf die Platten gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nun wurden die Mikrotiterplatten sehr gründliche dreimal mit Waschpuffer gewaschen und ordentlich ausgeklopft. Zuletzt wurde der Test mit Hilfe des Substrats OPD entwickelt. Dazu wurde dieses in Substratpuffer (s.o.) gelöst (OPD-Konzentration: 1 mg/ml) und 30%iges Wasserstoffperoxid (1 µl pro ml OPD-Lösung) als Kosubstrat zugefügt. 50 µl der Substratlösung wurden anschließend in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Der Substratumsatz zeigte sich durch eine Gelbfärbung. Spätestens wenn in den Vertiefungen, in denen der Leerwert bestimmt wurde, eine beginnende Gelbfärbung zu sehen war, wurde der Test durch die Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ je Vertiefung abgestoppt, wodurch sich ein Farbumschlag von gelb zu orange ergab. Die Extinktion wurde bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen wobei die Messwerte des Leerwerts von den Extinktionswerten der Proben abgezogen wurden. Mit den Extinktionswerten der Proben und des Standards wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und zur Errechnung der Zytokinkonzentrationen in den Proben die Zytokinkonzentration des Standards und die Verdünnung der Probe bei einer optischen Dichte (OD) von 0,2 in Bezug gesetzt.

2.2.4.7 ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline in Immunsereen

Zum Nachweis der antigen-spezifischen Antikörper IgE, IgG1 und IgG2a in den Seren immunisierter Mäuse wurde ein ELISA durchgeführt. Die Seren wurden in einer Verdünnungsreihe auf an ELISA-Platten gebundenes Antigen (βGal oder OVA) gegeben. Die festgehaltenen Antikörper konnten dann in einem weiteren Schritt

durch isotypspezifische biotinylierte Detektions-Antikörper gegen IgE, IgG1 oder IgG2a nachgewiesen werden. An diese wurde Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche im letzten Schritt das farblose Substrat OPD (s.o.) in ein photometrisch messbares Produkt umwandelt.

Durchführung:

Die Adsorption des Antigens (β Gal) an ELISA-Platten erfolgte in 0,1 M NaHCO_3 in einem Volumen von 100 μl pro Vertiefung über Nacht bei 4°C. β Gal wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Eine Reihe der ELISA-Platte wurde nicht mit Antigen beschichtet. Sie diente als Kontrolle für die Antigenspezifität der nachzuweisenden Antikörper. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer (s.o.) gewaschen und gründlich ausgeklopft. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Platten nun mit 150 μl Blockierungspuffer pro Vertiefung eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten gründlich ausgeklopft. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden Seren seriell 1:2 in 1 x PBS/1% BSA titriert (100 μl /Vertiefung). Die Platten wurden 1,5 Stunden bei RT inkubiert und dann zweimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft.

Nun erfolgte die Bindung der biotinylierten Detektions-Antikörper gegen IgG1 oder IgG2a (100 μl /Vertiefung) während einer 45 minütigen Inkubationsphase bei RT. IgG1 und IgG2a wurden mit biotinyliertem Ziege-anti-Maus-IgG1 oder -IgG2a (Einsatz 1:5000) detektiert. Die Detektion von IgE erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden 100 μl des Ratte-anti-Maus-IgE-mAb EM95-3 (1:1000 in PBS/1% BSA verdünnt) in jede Vertiefung pipettiert und 45 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Im zweiten Detektionsschritt wurde ein biotinylierter Maus-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:1000 in PBS/1% BSA verdünnt, 100 μl) in jede Vertiefung pipettiert und 45 Minuten bei RT inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μl /Vertiefung ExtrAvidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000 in 1 x PBS/1%BSA auf die Platten gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nun wurden die Mikrotiterplatten sehr gründliche dreimal mit Waschpuffer gewaschen und ordentlich ausgeklopft. Die Entwicklung und Messung des Tests erfolgte wie unter 2.2.4.6 beschrieben, jedoch in einem Pipettiervolumen von 100 μl pro Vertiefung.

Die Messwerte des Leerwerts wurden von den Extinktionswerten der Serumproben abgezogen. Mit den Extinktionswerten der Proben wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man die antigen-spezifischen Antikörpertiter bei einer optischen Dichte (OD) von 0,2. Die antigen-spezifischen Antikörpertiter der verschiedenen Seren bei $OD_{0,2}$, die zusammen auf einer Platte gemessen wurden, wurden nun direkt miteinander verglichen.

2.2.4.8 Transfektion von NIH3T3-Zellen mit Expressionsvektoren

Für die Transfektion der NIH3T3-Zellen mit den Expressionsvektoren wurden diese wie oben beschrieben in 24-Lochplatten in jeweils 1 ml Kulturmedium pro Loch kultiviert bis sie zu 60-90% konfluent waren. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des GenePorter Reagenz. Dazu wurden 900 ng des IDO-Expressionsvektors (pCMV-IDO, pFas-IDO, pCMV-IDO-IRES-sOVA, pCMV-IDO-IRES-cOVA oder pFas-IDO-IRES-sOVA) und 100 ng pCMV-EGFP in 125 μ l serumfreien IMDM in einem Eppendorfgefäß gemischt, wobei das EGFP-Konstrukt dazu dient, später im Fluoreszenzmikroskop die Transfektionseffizienz abschätzen zu können. Diese DNA-Lösung wurde nun in ein zweites Eppendorfgefäß gegeben, in dem zuvor 5 μ l GenePorter Reagenz ebenfalls in 125 μ l IMDM verdünnt wurde. Nach Resuspendieren des Transfektionsansatzes wurde dieser 10-45 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurde das Medium von den NIH3T3-Zellen komplett abgenommen und 250 μ l Transfektionsansatz pro Loch vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 3 bis 5 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ wurde der Transfektionsansatz wieder von den Zellen abgenommen und durch 1 ml Kulturmedium (s.o.) ersetzt. Nun wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden bei 37°C und 10%CO₂ kultiviert.

2.2.4.9 Tryptophan- und Kynurenin-Nachweis mittels HPLC

Um die Funktionalität der in dieser Arbeit klonierten IDO-Konstrukte (pCMV-IDO, pFas-IDO, pCMV-IDO-IRES-sOVA, pCMV-IDO-IRES-cOVA, pFas-IDO-IRES-sOVA) zu überprüfen, wurden NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen IDO-Konstrukten transfiziert und der Tryptophan- bzw. Kynurenin Gehalt in den Überständen der Zellen mittels HPLC gemessen. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein Schlüsselenzym im Tryptophankatabolismus, die Kynurenine sind die Abbauprodukte dieser Tryptophandegradierung.

Die HPLC (High-Pressure-Liquid-Chromatography) ist ein Verfahren zur Trennung gelöster Stoffe und deren quantitativer und qualitativer Analyse mittels Säulenchromatographie. Die Auftrennung der Stoffe beruht auf deren unterschiedlicher Verteilung in einer flüssigen und einer stationären Phase. Die Substanzen verweilen unterschiedlich lange in der Säule und können mittels eines nachgeschalteten Photometers bei ihrer Elution detektiert werden. Tryptophan und Kynurenine konnten so nachgewiesen und ihre Konzentration im Überstand bestimmt werden.

Durchführung:

Die NIH3T3-Zellen wurden wie unter 2.2.4.8 beschrieben mit den entsprechenden IDO-Expressionskonstrukten transfiziert. Wobei als Kontrolle auch untransfizierte Zellen mit Gene Porter Reagenz behandelt wurden. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch 350 µl tryptophanfreies RPMI-Medium mit 20 mM Tryptophan supplementiert. Die Ansätze wurden für weitere 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden nun abgenommen und in Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Zellen selber wurden für eine RNA-Isolierung in 350 µl RA 1-Puffer (s.u.) lysiert und bei -80°C gelagert. Die Tryptophan- und Kynureninkonzentrationen in den Überständen wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ellen Closs im Institut für Pharmakologie der Universität Mainz mittels HPLC bestimmt.

2.2.4.10 Grafik und Statistik

Die grafische und statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme SigmaPlot 2001 und Excel. Die mit dem Studentischen t-Test bestimmten signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p < 0,001$) wurden durch entsprechende Symbole gekennzeichnet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche bakteriologischen Arbeiten wurden unter der Verwendung sterilisierter Arbeitsgeräte und steriler Verbrauchsmaterialien durchgeführt.

2.3.1 Vermehrung von chemokompetenten TOP10-Zellen

Die TOP10-Zellen (siehe 2.1.16) wurden zunächst über Nacht in 5 ml LB-Medium (s.o.) bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur mit 95 ml LB-Medium verdünnt und für weitere 3 bis 4 Stunden bei 37°C und 180 Upm geschüttelt. Hatte die Bakterienkultur eine mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht (bei $OD_{600} \sim 0,4$), wurde sie für 15 Minuten auf Eis gestellt, danach bei 2000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und dann der Überstand verworfen, während das Bakteriensediment in 15 ml RF1-Salzpuffer (s.o.) resuspendiert wurde. Nach weiterer 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut bei 2000 x g und 4°C 15 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 4 ml RF2-Salzpuffer (s.o.) resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für weitere 15 Minuten war die Herstellung der chemokompetenten TOP10 abgeschlossen und sie konnten aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.3.2 Vermehrung von elektrokompetenten TOP10-Zellen

Die TOP10-Zellen (siehe 2.1.16) wurden zunächst über Nacht in 50 ml LB-Medium (s.o.) bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur mit 950 ml LB-Medium verdünnt und für weitere 2 bis 3 Stunden bei 37°C und 180 Upm geschüttelt. Hatte die Bakterienkultur eine mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht (bei $OD_{600} \sim 0,4$), wurde sie für 10 Minuten auf Eis gestellt, danach bei 2000 x g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen, während das Bakteriensediment in 500 ml eisgekühltem destillierten Wasser resuspendiert wurde. Die Bakteriensuspension wurde nun bei 2000 x g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment erneut in 500 ml eisgekühltem destillierten Wasser resuspendiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 4000 x g wurde das Bakterienpellet in 4 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und 100 µl-Aliquote der fertigen elektrokompetenten Top10 bei -80°C gelagert.

2.3.3 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einschleusen replikationsfähiger, zirkulärer DNA in Bakterien, mit dem Ziel, die Fremd-DNA unter Ausnutzung der DNA-Synthesemaschinerie des Wirts zu amplifizieren. Die Fremd-DNA besteht dabei aus einem Expressionsvektor mit einem Selektionsgen (hier der Plasmidvektor pCi mit dem Ampicillin-Resistenzgen), in den über die multiplen Klonierungsstellen verschiedene Zielgene integriert wurden.

2.3.3.1 Transformation von chemokompetenten TOP10-Zellen

Bei der chemischen Transformationsmethode für *Escherichia coli* bedingt ein Temperaturschock die DNA-Aufnahme in die prokaryotischen Zellen, wobei der eigentliche Einschleusungsmechanismus unbekannt ist. Im Rahmen der Bakterientransformation mit einem Expressionsplasmid wurden 50 µl chemokompetente TOP10-Bakteriensuspension mit etwa 1 µg DNA resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch für zwei Minuten in ein 42°C temperiertes Wasserbad gehalten. Dieser Hitzeschock ermöglicht die Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wurde der Transformationsansatz für fünf Minuten auf Eis gestellt und danach in ein mit 1 ml LB-Medium gefülltes 15 ml-Probenröhrchen überführt. Dieser Ansatz wurde als Vorkultur für eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Danach wurde eine weiterführende Kultur dieser Bakterien in 250 ml Selektionsmedium (LB-Medium versetzt mit Ampicillin) angesetzt, die über Nacht bei 37°C und 300 Upm inkubiert wurde. Die transformierten Bakterien exprimierten das plasmidkodierte Resistenzgen und konnten sich aufgrund dessen in dem Selektionsmedium vermehren.

2.3.3.2 Transformation von elektrokompentenen TOP10-Zellen

Bei der Elektroporation von *Escherichia coli* bedingt ein Elektroschock ein kurzzeitiges Aufbrechen des positiv geladenen Mureinsacculus und damit die DNA-Aufnahme in die prokaryotischen Zellen.

Dazu wurden 50 µl elektrokompentente TOP10-Bakteriensuspension mit etwa 1 µg DNA resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für eine Minute auf Eis

gehalten. Dann wurde der Transformationsansatz in eine eisgekühlte Küvette pipettiert und die elektrokompetenten TOP10-Zellen bei 2,1 kV, 200 Ω und 25 μ FD im Elektroporator transformiert. Danach wurden die Bakterien sofort in 250 μ l 37°C warmem LB-Medium aufgenommen und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Dieser Ansatz wurde als Vorkultur für eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Danach wurden die Bakterien entweder auf Selektions-Agarplatten ausplattiert (50-200 μ l Bakteriensuspension pro Platte) und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert oder es wurde eine weiterführende Kultur dieser Bakterien in 250 ml Selektionsmedium (LB-Medium versetzt mit Ampicillin) angesetzt, die über Nacht bei 37°C und 300 Upm inkubiert wurde. Die erfolgreich transformierten Bakterien exprimierten das plasmidkodierte Resistenzgen und konnten aufgrund dessen auf den Selektions-Agarplatten Kolonien bilden oder sich in dem Selektionsmedium vermehren.

2.3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

2.3.4.1 Schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA

Transformierte Bakterien wurden auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt und in 5 ml Selektionsmedium wieder über Nacht bei 37°C und 300 Upm kultiviert.

200 μ l der Über-Nacht-Bakterienkultur wurden dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für zwei Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde mit 25 μ l Bromphenolblau und 10 μ l PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) durch Vortexen gemischt und für fünf Minuten bei RT inkubiert, was zur Lyse der Bakterien führte. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11000 x g hatte sich eine farblose Phase (PCI-haltig) abgesetzt und eine blaue wässrige Phase darüber gebildet, welche die Nukleinsäuren enthielt. 10 μ l dieser DNA-haltigen Phase wurde nun auf ein Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese (s.u.) unterzogen. Auf dem Gel konnten auf diese Weise relativ schnell verschieden große DNA-Plasmide unterschieden und eine Vorauswahl getroffen werden, welche Klone wahrscheinlich ein intaktes Vektor-Insert-Konstrukt in sich trugen und somit weiter aufgereinigt (s.u.: Isopropanol-Minipräparation oder s.u.: Aufreinigung mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen) und Restriktionskontrollen unterzogen werden sollten.

2.3.4.2 Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA

1,5 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für zwei Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 100 ml Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert und dann mit 200 µl Puffer P2 (Qiagen) gemischt. P2 enthält Natronlauge für eine alkalische Lyse sowie SDS, welches an das Bakterienchromosom und andere bakterielle Bestandteile wie Proteine bindet. Zur vollständigen Lyse der Bakterien wurde die Suspension invertiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden nun 150 µl Essigsäure-haltiger Puffer P3 (Qiagen) zugegeben und gut geschüttelt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11000 x g hatten sich die Zellreste abgesetzt. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol durch Vortexen gemischt. Die Plasmid-DNA wurde nun für 10 Minuten bei -20°C gefällt und dann für 10 Minuten bei 11000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl 70%iger Ethanol auf das DNA-Sediment pipettiert und miteinander vermischt. Nach erneuter zweiminütiger Zentrifugation bei 11000 x g und RT wurde der Ethanol vorsichtig abpipettiert und das DNA-Sediment für fünf Minuten bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde zuletzt in 40 µl deionisiertem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.4.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen

Eine Über-Nacht-Bakterienkultur wurde bei 2000 x g für fünf Minuten bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 250 µl RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nun wurden 250 µl Lysepuffer P2 (enthält Natronlauge und SDS für eine alkalische Lyse) zu der Suspension gegeben. Für eine vollständige Lyse der Bakterien wurde die Suspension invertiert und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation wurde nun durch Zugabe von 350 µl Essigsäure-haltigem Puffer N3 und gutes Schütteln erreicht. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11000 x g hatten sich die Zellreste abgesetzt. Der plasmidhaltige Überstand wurde in eine Mini-Zentrifugationssäule überführt. Diese wurde für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Die Säulenmembran wurde nun mit 750 µl Entsalzungspuffer PE behandelt. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule erneut für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert und wiederum

der Durchfluss verworfen. Der Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt, um letzte Pufferreste zu entfernen. Nun wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 50 µl deionisiertes Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA eluiert wurde. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe u.) und die Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.4.4 Aufreinigung von endotoxinfreier Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen

Am Vortag wurde eine 250 ml-Kultur von transformierten Bakterien in Selektionsmedium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 300 Upm kultiviert. Die Zelldichte wurde am nächsten Tag im Photometer bestimmt. Dazu wurde zunächst als Referenz die optische Dichte von 1 ml LB-Medium in einer 1 ml-Einmalküvette bei 600 nm gemessen und als Nullwert festgelegt. Dann wurde die optische Dichte von 1 ml Bakteriensuspension bestimmt. Eine für die Präparation optimal gewachsene Bakterienkultur sollte eine OD von über 1,8 haben.

Die Bakteriensuspension wurde nun in einen 500 ml-Zentrifugenbecher gefüllt und für 15 Minuten bei 4000 Upm und 4°C in der Sorvall-Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 10 ml RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur alkalischen Lyse der Bakterien wurden 10 ml NaOH- und SDS-haltiger Lysepuffer P2 zugegeben und unter ständigem Invertieren fünf Minuten bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 10 ml Essigsäure-haltigem Puffer P3, wobei die Mischung gut geschüttelt wurde. Die lysierten Bakterien wurden nun für 15 Minuten bei 4°C und 2000 x g zentrifugiert. Dabei setzten sich Zellreste am Boden des Röhrchens und als Schicht über dem geklärten Lysat ab. Die obere Schicht wurde mit einer Einwegpipettenspitze entfernt. Das geklärte Lysat konnte nun in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 6 ml LPS-Entfernungspuffer gemischt werden. Diese Mischung wurde erst für 10 Minuten auf Eis und dann für weitere 10 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Dann wurde fünf Minuten bei RT und 2000 x g zentrifugiert, wobei sich die LPS-haltige blaue Phase absetzte. Die klare obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurde eine Midi-Säule, welche in einem Ständer in einer Plastikwanne stand, mit 4 ml

Puffer QBT äquilibriert. Dann wurde das geklärte Lysat nach und nach auf die Säule geladen. Die Säule wurde anschließend dreimal mit jeweils ca. 10 ml Waschpuffer QC gewaschen. Der Durchfluss in der Wanne wurde verworfen und die Säule mit Adapterringen auf ein mit 12,5 ml Isopropanol gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt. Zum Eluieren der Plasmid-DNA wurden zweimal 7,5 ml Elutionspuffer QF auf die Säule gegeben. Die eluierte Plasmid-DNA tropfte in den Isopropanol. Die so aus dem Eluat gefällte DNA wurde nun durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA in 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter fünf-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g wurde der Ethanol vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde zuletzt in 100-200 µl endotoxinfreiem Aqua dest. gelöst, die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe u.) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und einen Extinktionskoeffizienten von 47 für doppelsträngige DNA. Bestimmt man photometrisch die Extinktion (E_{260}) einer wässrigen DNA-Lösung, so kann man die DNA-Konzentration nach dem Lambert Beer'schen Gesetz durch Multiplikation mit dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) und einem möglichen Verdünnungsfaktor errechnen.

$$c[\text{DNA}] = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon$$

Da für den Einsatz in einer PCR auch die Reinheit der DNA-Lösung von Bedeutung ist, wird auch die Konzentration an Proteinen in der Lösung, also die Extinktion bei 280 nm, bestimmt. Bildet man den Quotienten der Extinktionswerte von DNA und Protein (E_{260}/E_{280}), so erhält man eine Aussage über den Grad an kontaminierenden Proteinen in der Lösung. Eine reine Nukleinsäurelösung sollte ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

Durchführung:

Mit dieser Methode wurden die Konzentrationen der aufgereinigten und in Wasser gelösten Plasmid-DNA sowie der cDNA nach der reversen Transkription (2.3.13) bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:100 in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit deionisiertem Wasser verdünnt und die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Photometer bestimmt. Das Gerät ermittelte die DNA-Konzentration nach der oben genannten Lambert Beer'schen Formel und gab das Ergebnis in ng/µl an. Für jede DNA-Probe wurden immer drei Verdünnungen gemessen und der Mittelwert berechnet. Als Referenz dienten 100 µl deionisiertes Wasser.

2.3.6 Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, durch die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Bei den üblicherweise verwendeten Restriktionsenzymen vom Typ II befinden sich diese DNA-Schnittstellen innerhalb der Basen-Erkennungssequenz, die in der Regel ein Palindrom von vier bis acht Basenpaaren umfasst. Auf diese Weise werden Fragmente mit einem 5'-Phosphat-Ende und einem 3'-OH- Ende generiert, wobei die Enden entweder glatt oder überhängend („sticky ends“) sind.

Diese Methode kann man zum einen nutzen, um einen Expressionsvektor in der multiplen Klonierungsstelle zu schneiden und ein passendes Insekt einzuligieren oder aber auch, um Restriktionsverdau zur Kontrolle von generierten Plasmiden zu machen. Nach einer erfolgreichen Plasmid-Isolierung aus Bakterien wurden Restriktionsverdau der Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen angesetzt, die spezifische Fragmente aus Plasmid-Vektoren herausschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden nachfolgend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Molekulargewicht bestimmt.

2.3.6.1 Restriktionskontrollen

Für die Herstellung von Restriktionskontrollen wurden 500 ng – 1 µg DNA mit 0,5-1 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl), 2 µl 10 x Restriktionspuffer und deionisiertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Wurde ein Enzym verwendet, das Sternaktivität aufwies, wurden außerdem 0,2 µl BSA (100 x konzentriert) zum Ansatz pipettiert. Der Restriktionsansatz wurde für mindestens zwei Stunden oder über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde der

Restriktionsansatz auf ein 0,8-1-gewichtprozentigem Agarosegel aufgetragen (siehe unten).

2.3.6.2 Restriktion zu Klonierungszwecken

Im Rahmen der Klonierungen wurden die offenen Leserahmen („open reading frames“ (ORF)) verschiedener Gene in den Expressionsvektor pCi kloniert. Dazu mussten die gewünschten Mini-Gene aus vorliegenden Plasmiden ausgeschnitten und in den linearisierten Zielvektor ligiert werden. Um das DNA-Fragment mit dem Zielgen vom Plasmidvektor zu trennen, mussten die Restriktionsfragmente über eine Gelelektrophorese (siehe u.) aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert werden (siehe u.). In diesem Fall mussten größere Mengen DNA restringiert werden, um genug Material für die Weiterverarbeitung zu haben. Bis zu 10 µg DNA wurden mit bis zu 2 µl Restriktionsendonuklease, 1 µl BSA, bis zu 5 µl 10 x Restriktionspuffer und deionisiertem Wasser in einem Gesamtvolumen von bis zu 50 µl gemischt. Die Restriktion wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, um einen vollständigen Verdau der DNA zu ermöglichen. Im Anschluss wurden, wie in 2.3.6.1 erwähnt, die Fragmente über eine Gelelektrophorese getrennt und das Zielfragment eluiert. Bei einer Linearisierung wurde nur ein Aliquot des Restriktionsansatzes (1 µg DNA) auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Linearisierung erfolgreich war.

2.3.6.3 Dephosphorylierung zur Stabilisierung restringierter Plasmide

Plasmide, die lediglich linearisiert wurden, können über ihre passenden Restriktionsenden spontan wieder religieren. Um dies zu verhindern wurde eine alkalische Dephosphorylierung durchgeführt. Dazu wurde die restringierte Plasmid-DNA mit 2 µl alkalische Phosphatase versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert.

2.3.7 Aufreinigung von restringierter DNA

Zum Restriktionsansatz wurde das fünffache Volumen DNA-Bindepuffer PB (Qiagen) pipettiert. Dann wurde die Mischung auf eine Zentrifugationssäule (Plasmid Mini Kit, Qiagen) gegeben und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 750 µl Waschpuffer PE (Plasmid Mini Kit, Qiagen) beladen und für eine Minute bei Raumtemperatur

inkubiert. Dann wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsvorgang mit der trockenen Säule wiederholt. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und zur Elution der DNA 40 µl deionisiertes Wasser direkt auf den Filter pipettiert. Nach einer Minute Inkubation wurde erneut bei 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat mit der aufgereinigten restringierten DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten bedient man sich der Methode der Gelelektrophorese. DNA-Proben werden mit einem dichteerhöhenden Saccharose- und Bromphenolblauhaltigen Puffer gemischt, in die Vertiefungen einer festen Gelmatrix aus Agarose und TBE-Puffer pipettiert und in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates bei neutralem pH-Wert in diesem Feld von der Anode zur Kathode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Agarosegel hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab: erstens von der Agarosekonzentration des Gels (je höher die eingesetzte Menge an Agarose, desto feinmaschiger ist das als Molekularsieb fungierende Polymer), zweitens von der elektrischen Spannung des Gels (die Laufgeschwindigkeit steigt proportional zur Spannung), drittens der Größe der DNA (kleine Fragmente wandern schneller als große) und viertens von der Konformation der DNA. So zeigen unverdaute Plasmide bei gelelektrophoretischer Auftrennung drei Banden unterschiedlicher Stärke. Die sehr kompakte superhelikale DNA wandert am Schnellsten, gefolgt von der durch Doppelstrangbruch linearisierten DNA und der relaxierten DNA, die durch einen Einzelstrangbruch ihre superhelikale Struktur verloren hat und somit am Langsamsten ist. Der Nachweis der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Fragmente erfolgt mit Hilfe einer Ethidiumbromid-Färbung. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und fluoresziert in dieser Form unter UV-Bestrahlung orange. Diese Methode erlaubt einen sehr sensitiven DNA-Nachweis (ab 20 ng DNA pro Bande). Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Doppelhelix gleichmäßig ein, so dass außerdem eine relative Konzentrationsbestimmung der DNA anhand der Fluoreszenzintensität möglich ist.

Durchführung:

Zur Herstellung eines ein-gewichtsprozentigen Agarosegels wurde 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100 ml 1 x TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle für ca. 90 Sekunden aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das flüssige Gel ließ man auf etwa 40°C abkühlen, bevor 10 µl einer ein-volumenprozentigen Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt wurden. Die Lösung wurde nun in einen abgedichteten Elektrophoreseschlitten gegossen, in den vorher ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen eingesetzt worden war. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden der Kamm und die Dichtungsbänder entfernt und der Gelschlitten in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. In die Taschen wurden dann mindestens 500 ng der DNA vermischt mit jeweils 1/6 des Volumens Beladungspuffer (Bromphenolblau- und Saccharoselösung) pipettiert. Der Beladungspuffer ermöglichte ein Absinken der DNA in den Geltaschen und durch die Blaufärbung der Laufflinie (ca. auf der 200 bp-Höhe) konnte man verfolgen, wo sich die DNA während des Laufes befand. Um die ungefähre Größe der aufgetrennten Banden auf dem Gel abschätzen zu können, wurden zusätzlich 6 µl 1 kb-Marker oder 100 bp-Marker (0,5 µg/µl) in eine Extratasche auf das Gel aufgetragen. Die Größe der Proben-DNA-Fragmente ließ sich anhand der Laufstrecke im Gel relativ zu der Laufstrecke der parallel aufgetragenen Marker-DNA-Fragmente mit bekannter Größe berechnen. Die Elektrophorese wurde bei 150 mA und 60 V durchgeführt. Abschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt und mit einer digitalen Kamera fotografiert.

2.3.9 Gel-Elution

Die Gelelektrophorese (2.3.8) kann auch zu präparativen Zwecken genutzt werden. Nach der Exzision eines Fragments aus einem Plasmid können Vektorhintergrund und Fragment per Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Mit der Methode der Gelelution kann das gewünschte DNA-Fragment zur weiteren Nutzung wieder aus dem Gel zurückgewonnen werden.

Dazu wurde zunächst ein Agarosegel mit großen Taschen hergestellt. Eine möglichst große Menge DNA wurde nun in das Gel gefüllt und einer Gelelektrophorese unterzogen. Das Gelstückchen, welches das gewünschte Fragment enthielt, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß

gegeben. Dazu wurden mindestens 600 µl Solubilisierungspuffer QG (Qiagen) pipettiert und das Gel darin im 50°C warmen Wasserbad geschmolzen. Währenddessen wurde das Gefäß immer wieder geschüttelt, um eine gute Durchmischung des Gels und des Puffers zu gewährleisten. Nach dem Schmelzen wurde zusätzlicher Puffer QG dazupipettiert, bis der pH-Indikator eine Gelbfärbung zeigte. Dann wurde das Gemisch auf eine Zentrifugationssäule (Plasmid Mini-Kit, Qiagen) geladen und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Beladungsvorgang wurde mehrfach wiederholt, bis die gesamte Gellösung aufgebraucht war. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Säule mit 500 µl Puffer QG gespült, für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde die Membran mit 750 µl Waschpuffer PE (Qiagen) behandelt und für eine Minute bei RT inkubiert. Danach wurde die Säule zunächst für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt, um letzte Pufferreste zu entfernen. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 50 µl deionisiertes Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die Konzentration der aus dem Gel aufgereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.3.5) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.10 Ligation

Bei einer Religation wurden 8 µl DNA (ca. 2-5 µg) mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide wurden die Größen der beiden zu ligierenden Fragmente errechnet und diese dann im Verhältnis von 1 Teil Vektor zu 3 Teilen Insert (Molverhältnis) in einen 20 µl-Ligationsansatz eingesetzt. 2 µl 10 x Ligase-Puffer und 2 µl T4-DNA-Ligase wurden dazupipettiert und der Ansatz für mehrere Stunden bei RT inkubiert.

2.3.11 Auffüllen von überhängenden Restriktionsenden mittels Klenow-Behandlung

Wenn DNA-Fragmente mit nicht zusammenpassenden Restriktionsenden ligiert werden sollten, mussten die überhängenden Enden zunächst mittels Klenow-Behandlung aufgefüllt werden, sodass glatte Enden entstanden. Zu einem 25 µl-

Verdau wurden 1 µl Klenow-Fragment (10 U/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach diesem Vorgang konnte der Verdau wie unter 2.3.7 beschrieben aufgereinigt werden.

2.3.12 RNA-Isolierung

Um die Funktionalität der Expressionskonstrukte für die DNA-Immunisierung *in vitro* zu überprüfen, wurde RNA aus transfizierten NIH-3T3-Zellen isoliert. Außerdem wurde RNA aus CD11c⁺ dendritischen Zellen isoliert, die aus den drainierenden Lymphknoten von DNA-vakzinierten Mäusen gewonnen wurden.

Vorbereitung:

Die Zellen wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 300 x g und 4°C pelletiert und in 350 µl Lysepuffer RA1 („NucleoSpin[®] RNAII Total RNA Isolation Kit“) aufgenommen. Die Zelllysate wurden bis zur Präparation der RNA bei -20°C gelagert. Der Lysepuffer enthält chaotrope Ionen, die die dreidimensionale Struktur von Proteinen und somit auch die der Zellwände zerstören.

Die RNA-Isolierung muss in einer RNase-freien Umgebung stattfinden. Da RNasen auf der Körperoberfläche vorkommen, ist es notwendig Handschuhe zu tragen. Außerdem ist darauf zu achten, dass alle Arbeitslösungen, die für die RNA-Isolierung benötigt werden, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt werden. Der Enzyminhibitor DEPC deaktiviert die RNasen im Wasser. Es wurden nur Pipetten verwendet, die ausschließlich für die RNA-Isolierung eingesetzt werden.

Durchführung:

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin[®] RNAII Total RNA Isolation Kit“ (Macherey-Nagel, Düren). Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten Zelllysate aufgetaut, zur Reduktion der Viskosität auf eine NucleoSpin[®] Filter-Säule gegeben und für eine Minute bei RT und 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 µl 70-prozentigem Ethanol verdünnt und die Lösung auf eine NucleoSpin[®] RNA II Säule gegeben. Diese wurde für 30 Sekunden bei RT und 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Entsalzen der Membran wurden 350 µl Puffer MDB (Membrane Desalting Buffer) auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule erneut für eine Minute bei RT und 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um evtl. noch vorhandene genomische DNA zu verdauen, wurden 90 µl DNase

Reaktionspuffer (Reaction buffer for DNase) mit 10 µl rekonstituierter RNase-freier DNase (1 U/µl) gemischt, direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer RA2 auf die Säule gegeben um die Membran zu waschen. Die Säule wurde für 30 Sekunden bei RT und 11000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun zweimal mit Puffer RA3 (600 µl und 250 µl) gewaschen, wobei sie jeweils zentrifugiert (für 30 Sekunden bzw. 2 Minuten bei RT und 11000 x g) und der Durchfluss verworfen wurde. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser (Macherey-Nagel) durch einminütige Zentrifugation bei RT und 11000 x g eluiert. Ein Teil der isolierten RNA wurde für die Reverse Transkription (siehe 2.3.13) eingesetzt und der Rest bei -80°C gelagert.

2.3.13 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist eine Methode zur Umschreibung von RNA in cDNA (komplementäre DNA) mit Hilfe einer reversen Transkriptase. Eine Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die anhand einer RNA-Matrize komplementäre dNTPs anfügt. Bei der Reversen Transkription werden zwei verschiedene Primer eingesetzt: Oligo-dT-Primer binden an den Poly-A-Schwanz der mRNA und Random-Hexamer-Primer sind eine Mischung aus verschiedenen, sechs Nukleotide umfassenden Primern, die statistisch verteilt an die RNA-Sequenz binden können. Die Primer aus diesen Mischungen binden an die einzelsträngige RNA und bilden somit die Startpunkte für die Reverse Transkription.

Durchführung:

Bei der Reversen Transkription wurden zunächst 11 µl RNA mit je 1 µl Oligo-dT-Primer (50 µmol/µl) und Random-Hexamerprimer (50 µmol/µl) in einem PCR-Eppendorfgefäß gemischt. Dieses Gemisch wurde zunächst für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz schnell auf Eis gestellt und es wurden 4 µl 5 x Puffer für Revert-Aid M-MuIV sowie 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zugefügt. Anschließend wurde die Mischung für weitere 5 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zuletzt wurde 1 µl Revert-Aid M-MuIV (200 U/µl) dazu pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde erst für 60 Minuten bei 42°C, dann für 10 Minuten bei 75°C im Thermocycler inkubiert und zum Schluss auf 4°C abgekühlt.

Nun wurde der cDNA-Gehalt der Probe bestimmt (siehe 2.3.5) und die cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.3.14 Konventionelle PCR

Die ursprünglich von K.B. Mullis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA und wurde hier dazu genutzt, die unten beschriebenen klonierten Expressionsplasmide zu überprüfen. Die Primerkombinationen wurden so gewählt, dass man die Übergänge zwischen den einzelnen Komponenten der Konstrukte nachweisen konnte.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

- 1 µl DNA (10 - 50 ng)
- 2 µl 10 x Puffer
- 0,2 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 0,5 µl Taq-Polymerase
- 1 µl sense Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl antisense Primer (10 pmol/µl)
- 14,3 µl H₂O (Aqua B. Braun, B.Braun, Melsungen)

Σ 20 µl

Das Reaktionsgemisch wurde in 500 µl PCR-Gefäße pipettiert.

Die Messung erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

| Zyklus | Zyklenzahl | Zeit | Temperatur | Phase |
|--------|------------|-------------------------------------|-------------------------|---|
| 1 | 1 | 1 Minute 1 Minute 30 Sekunden | 94°C 62°C 72°C | Denaturierung Anlagerung Elongation |
| 2 | 1 | 1 Minute 1 Minute 30 Sekunden | 94°C 60°C 72°C | Denaturierung Anlagerung Elongation |
| 3 | 33 | 1 Minute 1 Minute 30 Sekunden | 94°C 58°C 72°C | Denaturierung Anlagerung Elongation |
| 4 | 1 | 7 Minuten | 72°C Kühlung auf 4°C | Elongation Stopp der PCR |

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Phasen. Während der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge getrennt. Das Erhitzen auf 94°C bewirkt, dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen lösen. An die Einzelstrang-DNA binden während der Anlagerungsphase die Primer. Diese Phase findet bei einer moderaten Temperatur, meistens um die 60°C statt. Die optimale Anlagerungstemperatur ist von der Primersequenz (GC-Gehalt und Anzahl der Nukleotide) abhängig. Während der Elongationsphase baut die DNA-Polymerase beginnend an den 5'-Enden der Primer entlang der DNA-Matrize Nukleotide ein und komplettiert so die zu amplifizierenden Sequenzen. Die Denaturierungsphase des nächsten Zyklus sorgt für eine erneute Trennung der DNA-Doppelstränge.

Bei der „Touch down“-PCR bestimmt man drei verschiedene Anlagerungstemperaturen, wobei man im ersten Zyklus mit der höchsten Temperatur (hier 62°C) beginnt, im zweiten Zyklus die mittlere Temperatur (hier 60°C) wählt und für alle restlichen PCR-Zyklen die niedrigste Temperatur (hier 58°C) nimmt. Dieses Verfahren erhöht die Spezifität der PCR, indem es sich zunutze macht, dass die Primerbindung umso spezifischer ist, je höher die Temperatur ist. Am Anfang einer PCR ist die Menge der Matrizen-DNA noch relativ gering. Da die Primer im Überschuss im PCR-Ansatz vorhanden sind, könnte es bei einer geringen Temperatur zu Fehlbindungen von Primern an Sequenzen in der Matrizen-DNA kommen, die der spezifischen Primerbindungssequenz ähneln. Eine hohe Temperatur bewirkt, dass die Primer schon zu Anfang der PCR nur an ihre spezifische Sequenz binden können. Mit steigender Zyklenzahl steigt auch die Menge der spezifischen Matrizen-Sequenzen, so dass eine unspezifische Primerbindung unwahrscheinlich wird. Ein Senken der Temperatur erleichtert die Primerbindung in den folgenden Zyklen. So bekommt man ein hochspezifisches und effizientes PCR-Ergebnis.

2.3.15 Quantitative („Realtime“) – PCR

Bei der „Realtime“ PCR handelt es sich um eine Methode zum quantitativen Vergleich der Expressionsstärke von Genen. In dieser Arbeit wurde damit die Expression von IDO in CD11c⁺ dendritischen Zellen, die aus den drainierenden Lymphknoten von DNA-vakzinierten Mäusen gewonnen wurden, untersucht.

Bei der quantitativen PCR werden nach dem Elongationsschritt in jedem Zyklus die PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen detektiert. Dazu wurde der

DNA-Farbstoff SYBR-Green eingesetzt, der in die große Furche der PCR-Produkte stöchiometrisch interkaliert. Der Farbstoff kann dann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge doppelsträngiger DNA. Je größer die gebildeten Produktmengen, desto stärker ist auch die Fluoreszenz.

Für die „Realtime“-PCR wurde eine SYBR-Green-Lösung verwendet (Q-PCR-Mastermix, ABgene, Hamburg), die neben dem Farbstoff SYBR-Green 490 Reaktionspuffer, dNTPs und die Taq-Polymerase enthält. Außerdem enthält die SYBR-Green-Lösung den Referenzfarbstoff ROX, der als Beladungskontrolle dient. Des Weiteren wurden die Primer für die Reaktion als Primer-Mix, bestehend aus „sense“- und „antisense“-Primer, in einer Konzentration von jeweils 1 pmol/µl, zugegeben.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

1,75 µl Primer-Mix (je 1 pmol/µl)
9,75 µl H₂O (Aqua B. Braun, B. Braun, Melsungen)
12,5 µl SYBR Green 490-Lösung
1 µl cDNA (200 ng/µl)

Σ 25 µl

Es wurden stets PCRs zur Messung eines Haushaltsgens (UBC) durchgeführt. Um Störungen der Messung durch Pipettierungenauigkeiten möglichst gering zu halten, wurden zunächst „Mastermixe“ aus H₂O (Aqua B. Braun, B. Braun, Melsungen), SYBR Green 490-Lösung und Primer-Mix für die berechnete Probenanzahl pipettiert und 24 µl dieses Reaktionsgemischs in eine Thermo-96-Loch-Platte (Corning) pipettiert. Dazu wurde je Vertiefung 1 µl der entsprechenden, auf 200 ng/µl verdünnten cDNA pipettiert. Die Thermo-96-Loch-Platte wurde abschließend mit einer Abdeckfolie (Absolute QPCR Seal, ABgene) verschlossen. Die Platte wurde bei 300 x g kurz abzentrifugiert und bis zur Messung im Thermozykler bei -20°C gelagert.

3. Ergebnisse

Basierend auf früheren Daten der Arbeitsgruppe wird die Arbeitshypothese zur biolistischen DNA-Vakzinierung im Allergiemodell dahingehend modifiziert, dass die antigenspezifische Immunantwort durch die Applikation einer Kombinationsvakzine, bestehend aus pFascin- β Gal bzw. pCMV- β Gal und einem Vektor, der das Gen für dieIDO kodiert, inhibiert werden soll. Dabei soll überprüft werden, ob durch die Aktivität derIDO eventuell antigenspezifische regulatorische T-Zellen rekrutiert werden, so dass eine Toleranz gegen das Modellallergen β Gal induziert werden kann. Daher wurde zunächst *in vivo* geprüft, ob die Koexpression derIDO nach biolistischer Transfektion zu einer Modulation der transgenspezifischen Immunantwort, die ebenfalls im Zuge der DNA-Immunisierung induziert wird, führt. Dazu wurden neben der Bestimmung der antigenspezifischen Antikörpertiter im Serum der immunisierten Mäuse auch Analysen zur Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen aus DNA-vakzinierten Mäusen und zur CTL-Induktion in diesen Tieren durchgeführt.

Für die durchzuführenden Experimente im Mausmodell der Typ-I Allergie wurden Patronen für die Genpistole verwendet, die Goldpartikel enthielten, an die eine Mischung der Plasmide pFascin- β Gal bzw. pCMV- β Gal sowie pFascin-IDO bzw. pCMV-IDO gekoppelt waren. Um auszuschließen, dass die Kopplung eines weiteren Plasmids an die Goldpartikel an sich die durch die Immunisierung mit dem β Gal-kodierenden Vektor ausgelöste Immunantwort beeinflusst, wurde zur Kontrolle dieses Effektes einer Gruppe von Versuchstieren pCMV- β Gal bzw. pFascin- β Gal zusammen mit dem Kontrollplasmid pFascin-EGFP verabreicht. Die Größe des Expressionsvektors pFascin-EGFP liegt mit ca. 6,36 kb genau zwischen der des pCMV-IDO-Expressionsplasmids (ca. 5,5 kb) und der des Plasmids pFascin-IDO (ca. 7,1 kb) und eignet sich daher gut als Kontrollvektor.

3.1 Herstellung und Funktionsanalysen von IDO und OVA kodierenden Expressionsvektoren

Zum Zwecke der DNA-Vakzinierung mit dem Ziel der Modulierung von allergenspezifischen Immunantworten wurden zunächst verschiedene Expressionsplasmide, die IDO und/oder das Modellallergen OVA kodieren, kloniert. Alle im Folgenden beschriebenen Expressionsplasmide wurden mittels PCR überprüft. Dazu wurden die Primerkombinationen so gewählt, dass die Übergänge

zwischen den einzelnen Komponenten der Konstrukte nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden Analysen zu deren Funktionalität *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

3.1.1 Herstellung vonIDO und OVA kodierenden Expressionsvektoren

Zum Zwecke der DNA-Vakzinierung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene DNA-Konstrukte hergestellt. Bei den OVA-kodierenden Konstrukten wurden solche Plasmide unterschieden, die zum einen eine sezernierte Form des OVA (sOVA) und zum anderen eine zelluläre Form des OVA (cOVA) kodieren. Für die Konstruktion der cOVA-Plasmide wurde die Signalsequenz, die sich im 5' Bereich der das Protein kodierenden DNA befindet und die für den Transport des OVA aus der Zelle erforderlich ist, durch Klonierung entfernt.

Ein Teil der in den Experimenten weiterhin verwendeten Expressionsplasmide lag schon aus vorhergehenden Arbeiten in der Arbeitsgruppe vor (pCMV-IDO, pCMV-βGal, pFascin-βGal, pCMV-EGFP, pFascin-EGFP).

3.1.1.1 Klonierung von pCMV-sOVA

Ausgangspunkt für die Konstruktion des Plasmids pCMV-sOVA war ein bereits vorliegender Vektor, dem jedoch das Intron hinter dem CMV-Promotor fehlte. Dieser Bereich sollte nun durch Klonierung mit Hilfe einer XhoI-Schnittstelle in den Vektor eingefügt werden. Dazu musste zunächst eine zweite XhoI-Schnittstelle im Backbone des Plasmids entfernt werden. Dies geschah durch Verdau des Vektors mit NotI und anschließender Religation (Abb. 3.1.1).

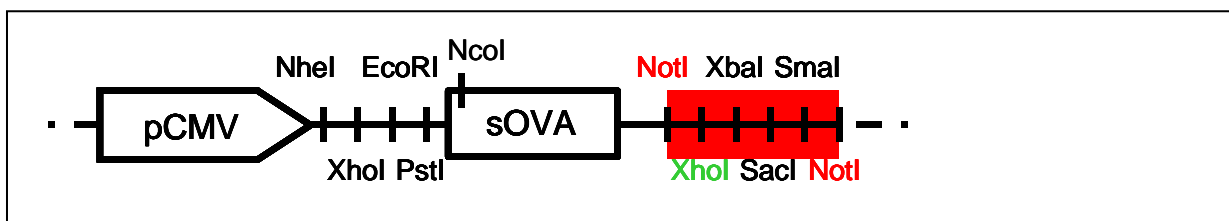


Abb. 3.1.1 Entfernung der zweiten XhoI-Schnittstelle aus pCMV-sOVA ohne Intron

Die Abbildung zeigt das Ausgangskonstrukt pCMV-sOVA ohne Intron. Die zweite XhoI Schnittstelle (grün) wurde mit Hilfe eines NotI-Verdau und anschließender Religation entfernt. Der herausgeschnittene Teil des Vektors ist rot hinterlegt.

Das so entstandene Konstrukt wurde nun mit SpeI und XhoI verdaut und der Vektor-Backbone wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.2 A). Parallel wurde der

pCi-Leervektor ebenfalls mit SpeI und XhoI verdaut und das Insert aufgereinigt (Abb.3.1.2 B).

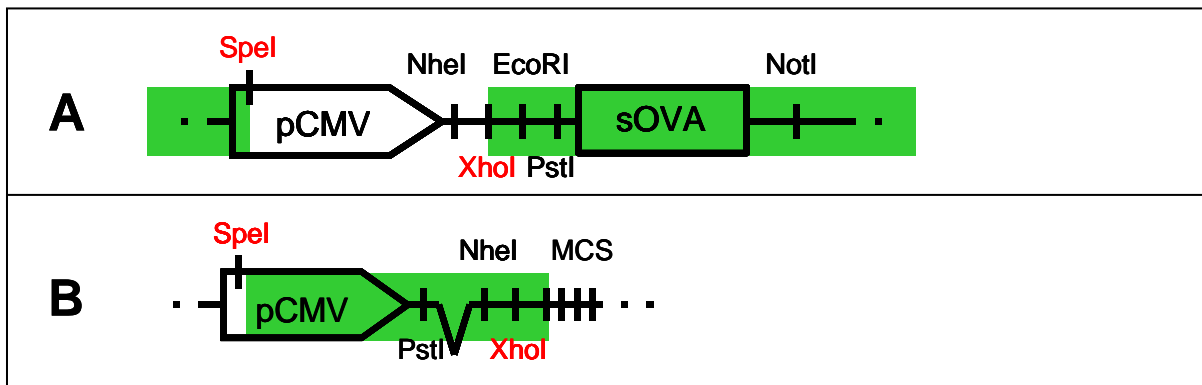


Abb. 3.1.2 Zwischenschritt bei der Herstellung von pCMV-sOVA

Das nach Entfernung der XhoI-Schnittstelle entstandene Konstrukt wurde mit SpeI und XhoI (rot) verdaut (A). Der Leervektor pCi wurde ebenfalls mit SpeI und XhoI (rot) verdaut (B). Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pCMV-sOVA entstand (Abb. 3.1.3).

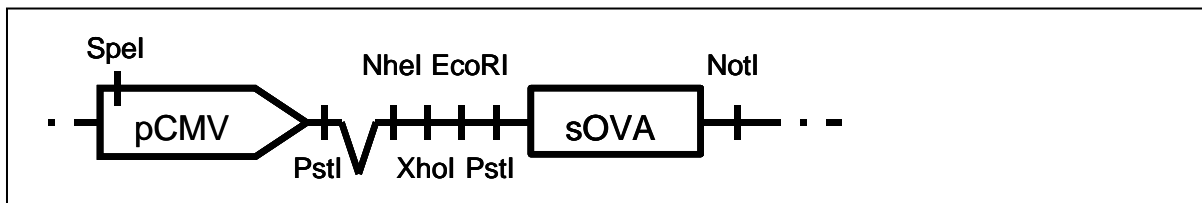


Abb. 3.1.3. Konstruktsskizze von pCMV-sOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-sOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

3.1.1.2 Klonierung von pCMV-cOVA

Ausgangspunkt für die Konstruktion des Plasmids pCMV-cOVA war ein bereits vorliegender Vektor, dem jedoch das Intron hinter dem CMV-Promotor fehlte. Dieser Bereich sollte nun durch Klonierung mit Hilfe einer XhoI-Schnittstelle in den Vektor eingefügt werden. Dazu mußte zunächst eine zweite XhoI-Schnittstelle im Backbone des Plasmids entfernt werden. Dies geschah durch Verdau des Vektors mit NotI und anschließender Religation (Abb.3.1.4).

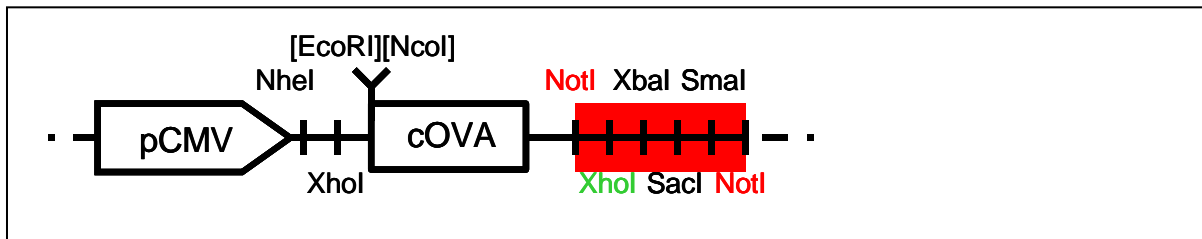


Abb. 3.1.4 Entfernung der zweiten XhoI-Schnittstelle aus pCMV-cOVA ohne Intron

Die Abbildung zeigt das Ausgangskonstrukt pCMV-cOVA ohne Intron. Die zweite XhoI Schnittstelle (grün) wurde mit Hilfe eines NotI-Verdau und anschließender Religation entfernt. Der herausgeschnittene Teil des Vektors ist rot hinterlegt.

Das so entstandene Konstrukt wurde nun mit SpeI und XhoI verdaut und der Vektor-Backbone aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.5 A). Parallel wurde der pCi-Leervektor ebenfalls mit SpeI und XhoI verdaut und das Insert aufgereinigt (Abb.3.1.5 B).

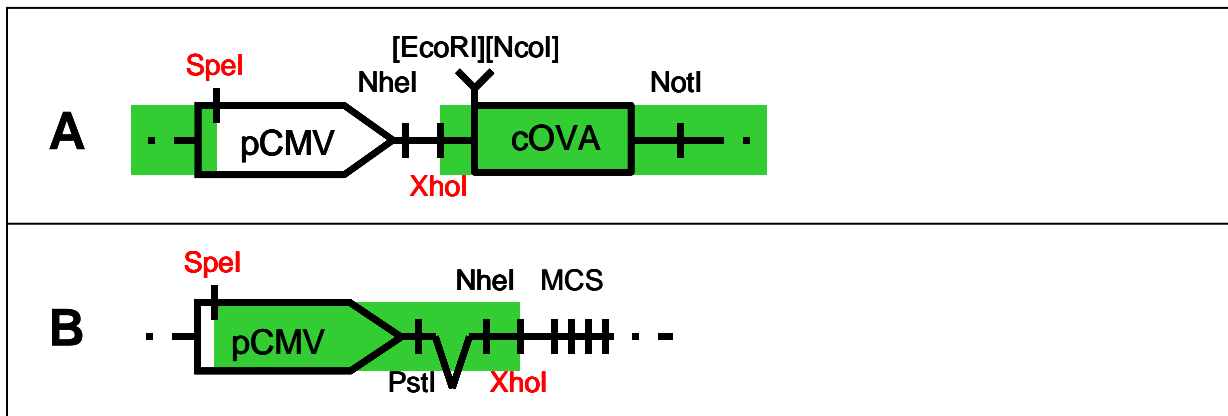


Abb. 3.1.5 Zwischenschritt bei der Herstellung von pCMV-cOVA

Das nach Entfernung der XhoI-Schnittstelle entstandene Konstrukt wurde mit SpeI und XhoI (rot) verdaut (A). Der Leervektor pCi wurde ebenfalls mit SpeI und XhoI (rot) verdaut (B). Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pCMV-cOVA entstand (Abb. 3.1.6).

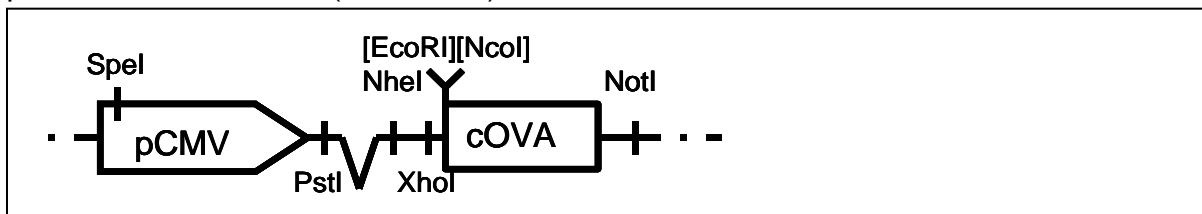


Abb. 3.1.6 Konstruktskizze von pCMV-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

3.1.1.3 Klonierung von pFascin-sOVA

Zur Herstellung von pFascin-sOVA wurde der vorhandene Vektor pCMV-sOVA ohne Intron und ohne die zweite XhoI Schnittstelle (Vgl. 3.1.1.1) zunächst mit XhoI und ClaI verdaut und das Insert aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.7 A). Parallel dazu wurde der pFascin-Leervektor ebenfalls mit XhoI und ClaI verdaut und der Backbone aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 3.1.7 B).

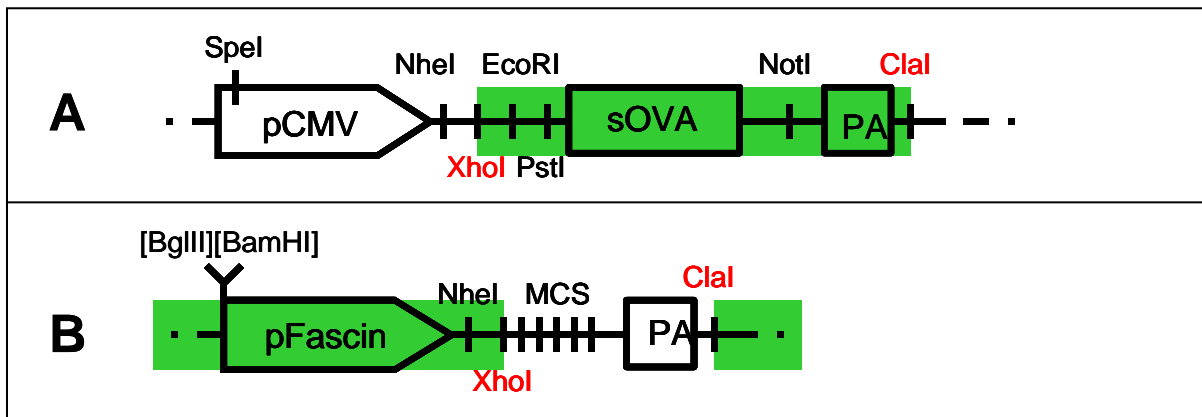


Abb. 3.1.7 Zwischenschritt bei der Klonierung von pFascin-sOVA

Das Ausgangskonstrukt pCMV-sOVA ohne Intron und ohne die zweite XhoI Schnittstelle wurde mit XhoI und ClaI (rot) verdaut (A). Der Teil B der Abbildung zeigt den pFascin-Leervektor, der ebenfalls mit XhoI und ClaI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pFascin-sOVA entstand (Abb. 3.1.8).

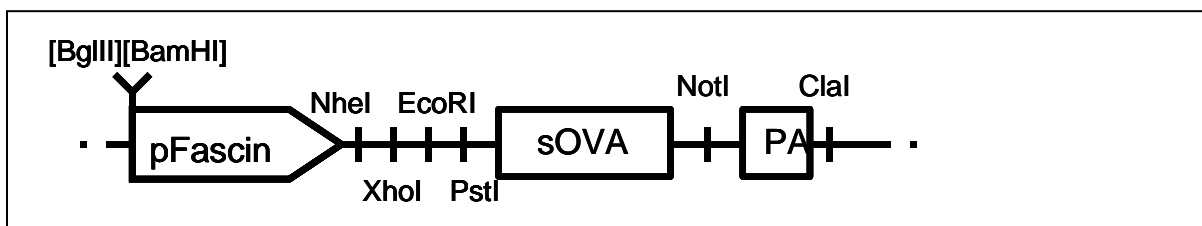


Abb. 3.1.8 Konstruktskizze von pFascin-sOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-sOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.1.1.4 Klonierung von pFascin-cOVA

Zur Herstellung von pFascin-cOVA wurde der vorhandene Vektor pCMV-cOVA ohne Intron und ohne die zweite XhoI Schnittstelle (Vgl. 3.1.1.2) zunächst mit XhoI und ClaI verdaut und das Insert aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.9 A). Parallel dazu wurde der pFascin-Leervektor ebenfalls mit XhoI und ClaI verdaut und der Backbone aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 3.1.9 B).

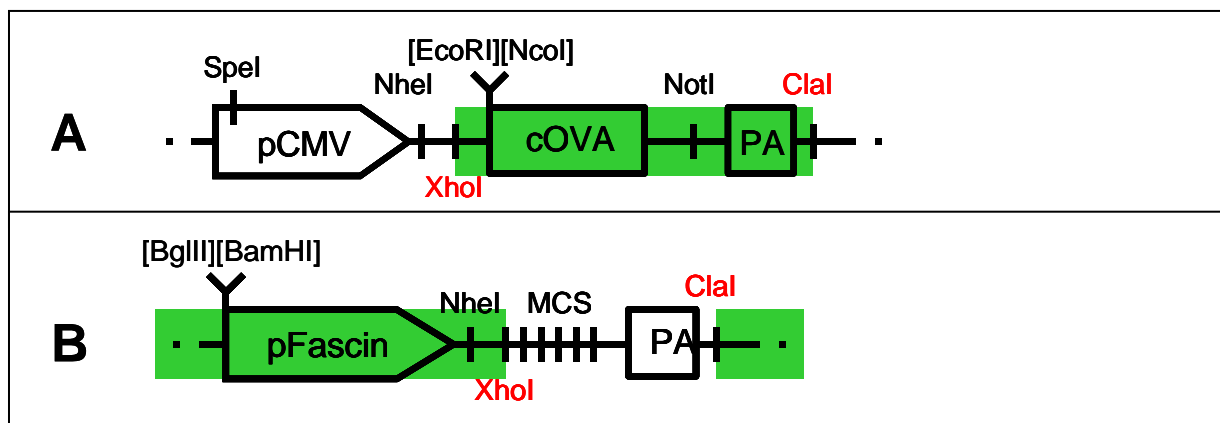


Abb. 3.1.9 Zwischenschritt bei der Klonierung von pFascin-cOVA

Das Ausgangskonstrukt pCMV-cOVA ohne Intron und ohne die zweite XhoI Schnittstelle wurde mit XhoI und ClaI (rot) verdaut (A). Der Teil B der Abbildung zeigt den pFascin-Leervektor, der ebenfalls mit XhoI und ClaI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pFascin-cOVA entstand (Abb. 3.1.10).

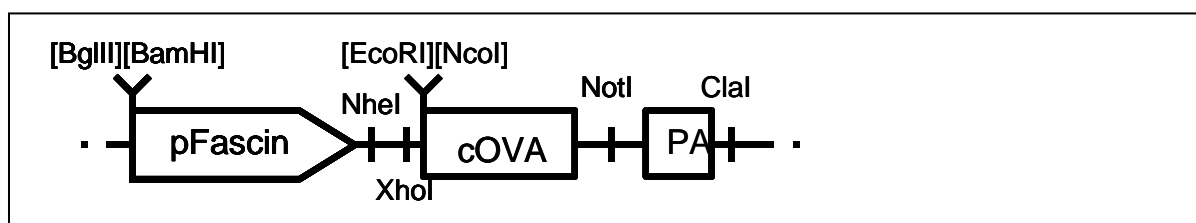


Abb. 3.1.10 Konstruktskizze von pFascin-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.1.1.5 Klonierung von pCMV-IDO-IRES-sOVA

Zur Herstellung des Vektors pCMV-IDO-IRES-sOVA wurde der bereits vorhandene intronlose Vektor pCMV-sOVA nach Entfernung der zweiten XhoI-Schnittstelle (Vgl. 3.1.1.1) zunächst mit NheI und XhoI verdaut und der Backbone aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.11 A). Parallel dazu wurde der Vektor pZero-IDO-IRES, der

aus einer vorherigen Arbeit in der Arbeitsgruppe vorlag, mit SpeI und XhoI verdaut und das Insert aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 3.1.11 B). Da NheI und SpeI kompatible Enden bilden, konnten nun beide Vektorteile ligiert werden.

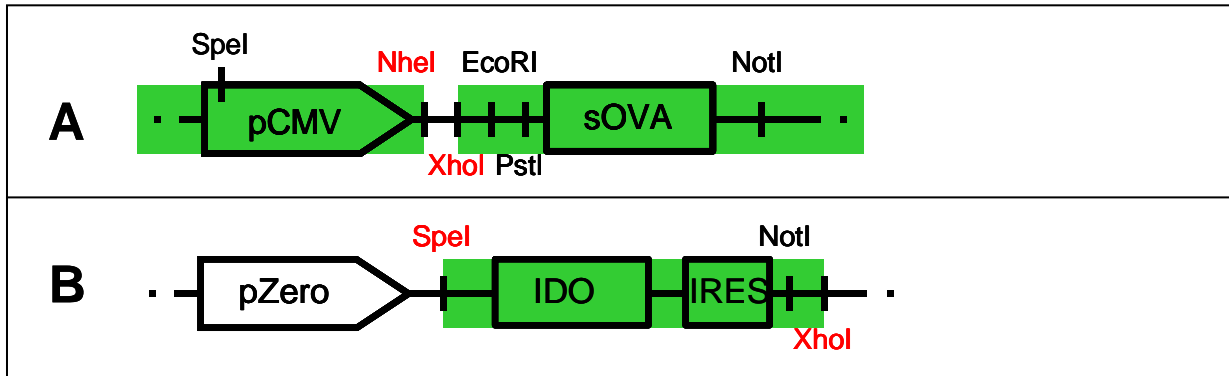


Abb. 3.1.11 Zwischenschritt bei der Klonierung von pCMV-IDO-IRES-sOVA

Das Ausgangskonstrukt pCMV-sOVA ohne Intron und ohne zweite XhoI Schnittstelle wurde mit NheI und XhoI (rot) verdaut (A). Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pZero-IDO-IRES, der mit SpeI und XhoI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert.

Um das Intron in den Vektor einzufügen, wurde das entstandene Konstrukt nun mit SnaBI und XbaI verdaut und der Backbone aufgereinigt (Abb. 3.1.12 A). Parallel dazu wurde der Vektor pCMV-IDO, der schon aus vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe vorlag und der über ein Intron verfügt, ebenfalls mit SnaBI und XbaI verdaut (Abb. 1.12 B).

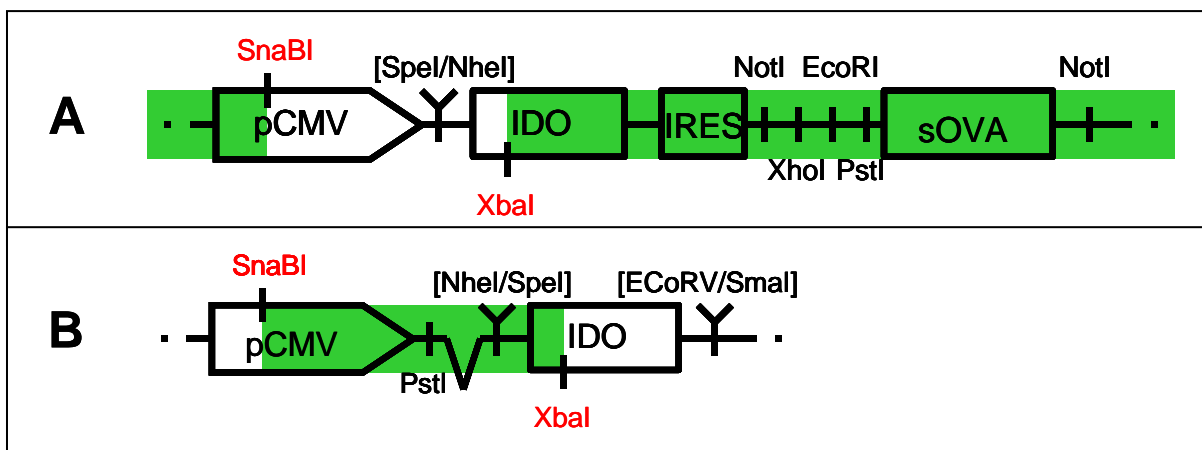


Abb. 3.1.12 Zwischenschritt bei der Klonierung von pCMV-IDO-IRES-sOVA

Der Teil A der Abbildung zeigt das entstandene Konstrukt aus dem in Abb. 3.1.11 gezeigten Verdau und anschließender Ligation. Es wurde mit SnaBI und XbaI (rot) verdaut. Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pCMV-IDO, der ebenfalls mit SnaBI und XbaI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, sodass das Konstrukt pCMV-IDO-IRES-sOVA entstand (Abb. 3.1.13).

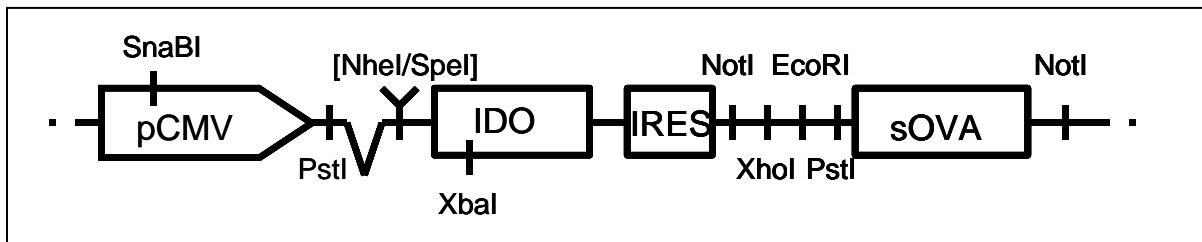


Abb. 3.1.13 Konstruktsskizze von pCMV-IDO-IRES-sOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-IDO-IRES-sOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

3.1.1.6 Klonierung von pCMV-IDO-IRES-cOVA

Zur Herstellung von pCMV-IDO-IRES-cOVA wurde der bereits vorhandene intronlose Vektor pCMV-cOVA nach Entfernung der zweiten XhoI Schnittstelle (Vgl. 3.1.1.2) zunächst mit NheI und XhoI verdaut und der Backbone aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.14 A). Parallel dazu wurde der pZero-IDO-IRES Vektor, der aus einer vorherigen Arbeit in der Arbeitsgruppe vorlag, mit SpeI und XhoI verdaut und das Insert aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 3.1.14 B). Da NheI und SpeI kompatible Enden bilden, konnten nun beide Vektorteile ligiert werden.

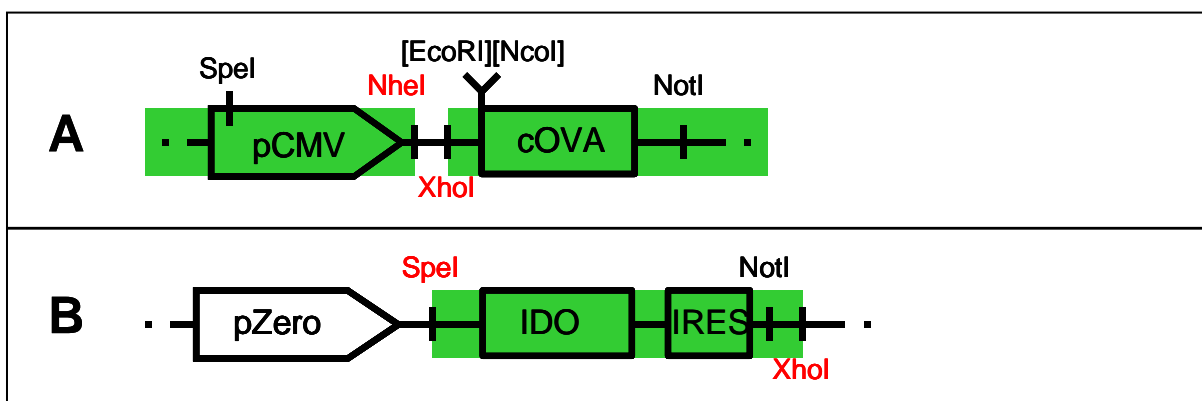


Abb. 3.1.14 Zwischenschritt bei der Klonierung von pCMV-IDO-IRES-cOVA

Das Ausgangskonstrukt pCMV-cOVA ohne Intron und ohne die zweite XhoI Schnittstelle wurde mit NheI und XhoI (rot) verdaut (A). Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pZero-IDO-IRES, der mit SpeI und XhoI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert.

Das entstandene Konstrukt wurde nun mit *Sna*BI und *Xba*I verdaut und der Backbone aufgereinigt (Abb. 3.1.15 A). Parallel dazu wurde der Vektor pCMV-IDO, der bereits aus vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe vorlag, ebenfalls mit *Sna*BI und *Xba*I verdaut (Abb. 1.15 B).

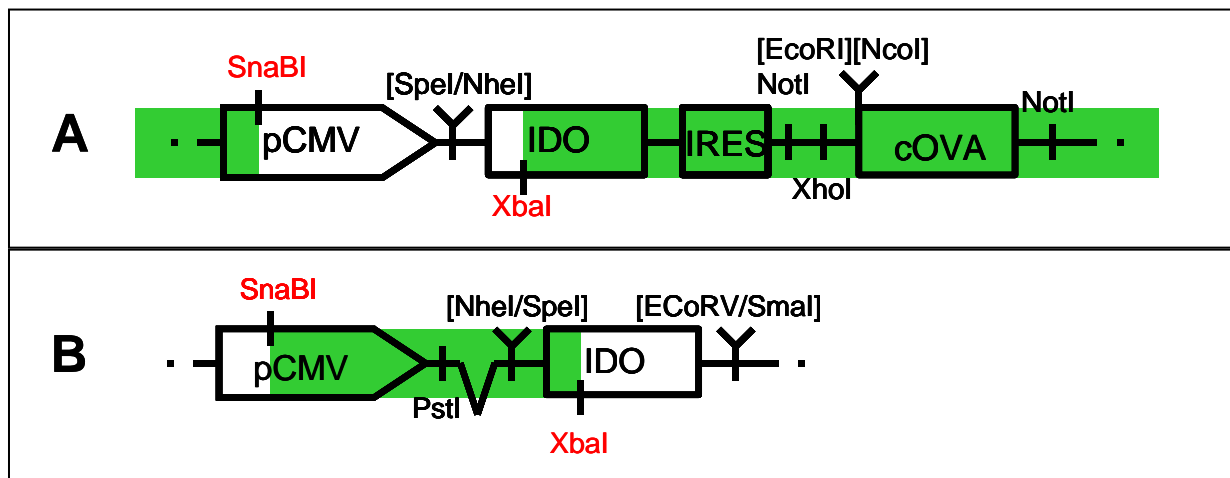


Abb. 3.1.15 Zwischenschritt bei der Klonierung von pCMV-IDO-IRES-cOVA

Der Teil A der Abbildung zeigt das entstandene Konstrukt aus dem in Abb. 3.1.14 gezeigten Verdau und anschließender Ligation. Es wurde mit *Sna*BI und *Xba*I (rot) verdaut. Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pCMV-IDO, der ebenfalls mit *Sna*BI und *Xba*I (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pCMV-IDO-IRES-cOVA entstand (Abb. 3.1.16).

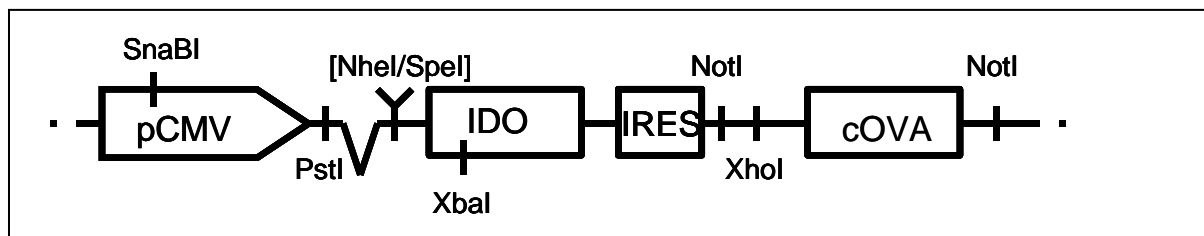


Abb. 3.1.16 Konstruktskizze von pCMV-IDO-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-IDO-IRES-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

3.1.1.7 Klonierung von pFascin-IDO-IRES-sOVA

Zur Herstellung des Vektors pFascin-IDO-IRES-sOVA wurde das in 3.1.1.5 entstandene intronlose Zwischenkonstrukt (Abb. 3.1.12) pCMV-IDO-IRES-sOVA mit *Sca*I und *Cl*aI verdaut und das Insert wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.17 A). Parallel dazu wurde der pFascin-Leervektor mit *Nhe*I verdaut und die

überhängenden Enden wurden mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurde das Konstrukt mit *Clal* verdaut und der Backbone aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 3.1.17 B).

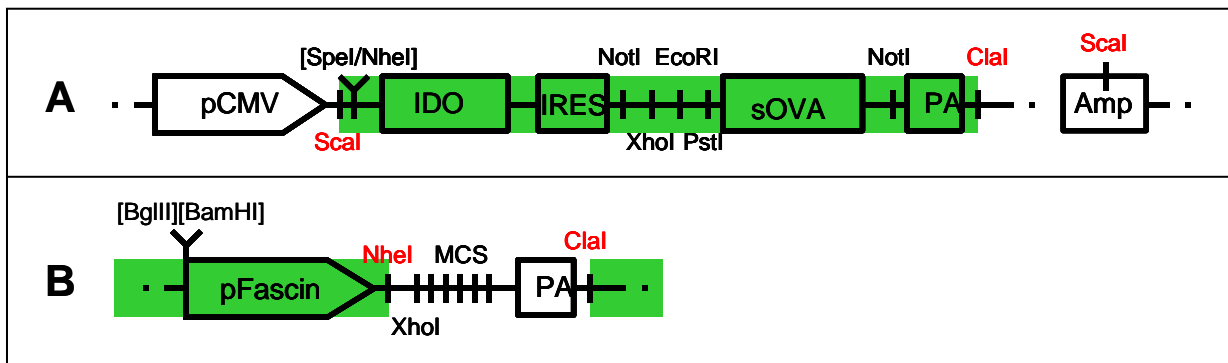


Abb. 3.1.17 Zwischenschritt bei der Klonierung von pFascin-IDO-IRES-sOVA

Der Teil A der Abbildung zeigt das nach dem in Abb. 3.1.11 gezeigten Verdau und anschließender Ligation entstandene Konstrukt. Dieses wurde mit *Scal* und *Clal* (rot) verdaut. Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pFascin-Leervektor, der zunächst mit *NheI* (rot) verdaut wurde. Anschließend wurden die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und das Konstrukt mit *Clal* (rot) verdaut. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und ligiert.

Nun konnten die beiden Vektorteile ligiert werden, da der Verdau mit *Scal* glatte Enden hervorruft und somit mit den aufgefüllten Enden des pFas-Leervektors kompatibel war, so dass das Konstrukt pFascin-IDO-IRES-sOVA entstand (Abb. 3.1.18).

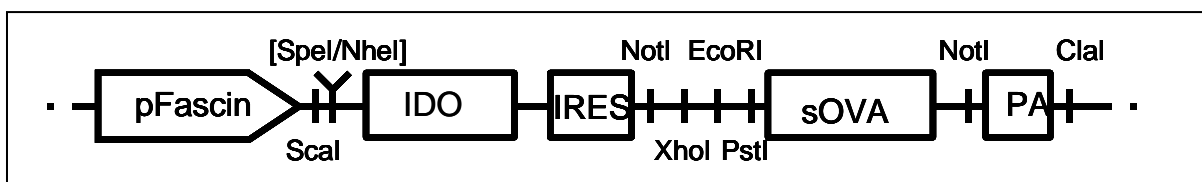


Abb. 3.1.18 Konstruktsskizze von pFascin-IDO-IRES-sOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-IDO-IRES-sOVA auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.1.1.8 Klonierung von pFascin-IDO

Zur Herstellung des Vektors pFascin-IDO wurde das in 3.1.1.7 entstandene Endkonstrukt pFascin-IDO-IRES-sOVA (Abb. 3.1.18) mit *EcoRI* und *XmnI* verdaut und das den Promotor enthaltene Stück wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.1.19 A). Parallel dazu wurde der Vektor pCMV-IDO, der bereits aus vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe vorlag, ebenfalls mit *EcoRI* und *XmnI* verdaut und das Insert wurde aufgereinigt (Abb. 1.19 B).

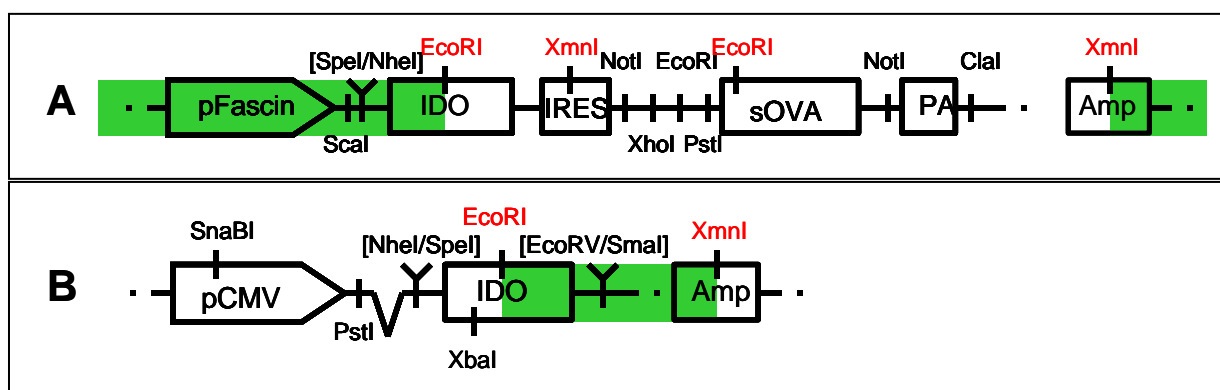


Abb. 3.1.19 Zwischenschritt bei der Klonierung von pFascin-IDO

Der Teil A der Abbildung zeigt das entstandene Endkonstrukt pFascin-IDO-IRES-sOVA aus Abb. 3.1.18, welches mit EcoRI und XmnI (rot) verdaut wurde. Der Teil B der Abbildung zeigt den Vektor pCMV-IDO, der ebenfalls mit EcoRI und XmnI (rot) verdaut wurde. Die grün hinterlegten Vektorabschnitte wurden aus dem Gel aufgereinigt und anschließend ligiert. Die „Zacke“ im Vektor symbolisiert das Intron.

In einem letzten Schritt wurden die beiden Vektorteile ligiert, so dass das Konstrukt pFascin-IDO entstand (Abb. 3.1.20).

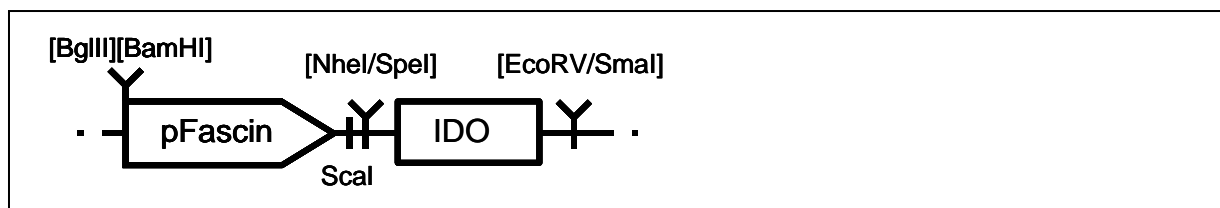


Abb. 3.1.20 Konstruktskizze von pFascin-IDO

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-IDO auf dem Vektorhintergrund von pCi. Das Expressionskonstrukt enthält das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind alle Restriktionsschnittstellen, die für eine eventuelle Klonierungsmaßnahme auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.1.2. Analysen zur Funktionalität von IDO und OVA kodierenden Expressionsplasmiden

Um die Funktionalität der unter 3.1.1 beschriebenen Expressionsplasmide zu überprüfen, wurden zunächst NIH-3T3-Zellen *in vitro* mit diesen Konstrukten transfiziert (siehe 2.2.11). Die NIH-3T3-Zelllinie ist eine Fascin-positive Fibroblasten-Zelllinie, die sowohl Gene, die vom ubiquitär aktiven CMV-Promotor als auch Gene, die vom DC-spezifischen Fascin-Promotor kontrolliert werden, exprimieren kann. Die NIH-3T3-Zellen wurden stets mit einem Testplasmid und dem Kontrollplasmid pCMV-EGFP kotransfiziert. Die Kotransfektion mit pCMV-EGFP ermöglichte eine Kontrolle der Transfektionsrate. Nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst 72 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Transfizierte Zellen exprimierten nun das Transgen. Nach drei Tagen konnte man daher im Fluoreszenzmikroskop deutlich EGFP produzierende und somit grün gefärbte Zellen nachweisen (Abb. 3.1.21).

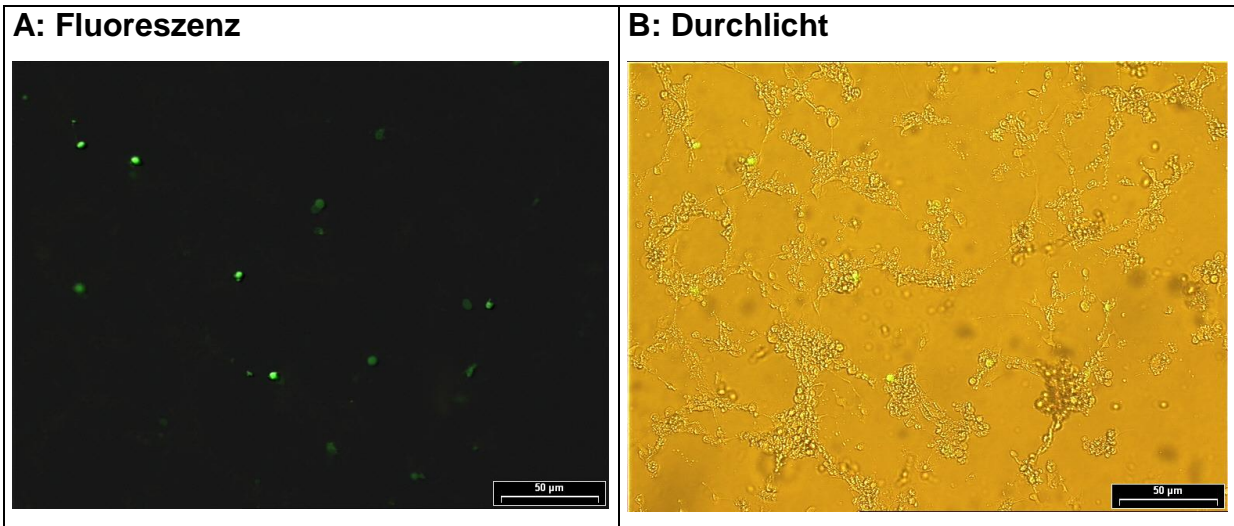


Abb. 3.1.21 Mikroskopische Aufnahme von transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Abbildung zeigt ein mikroskopisches Bild von NIH-3T3-Zellen 72 Stunden nach Kotransfektion von pCMV-IDO und pCMV-EGFP. In der Fluoreszenzaufnahme (A) sieht man deutlich die grün leuchtenden und damit transfizierten Zellen. (B) zeigt denselben Bildausschnitt als Durchlichtaufnahme.

3.1.2.1 Nachweis von IDO- und OVA-mRNA durch PCR-Analysen

72 Stunden nach der Transfektion wurden die NIH-3T3-Zellen geerntet und in Lysepuffer aufgenommen. Die RNA wurde isoliert und mittels reverser Transkription cDNA hergestellt. Mittels konventioneller PCR konnten nun IDO- und OVA-cDNA amplifiziert und auf einem Agarosegel nachgewiesen werden (Abb. 3.1.22 und Abb. 3.1.23).

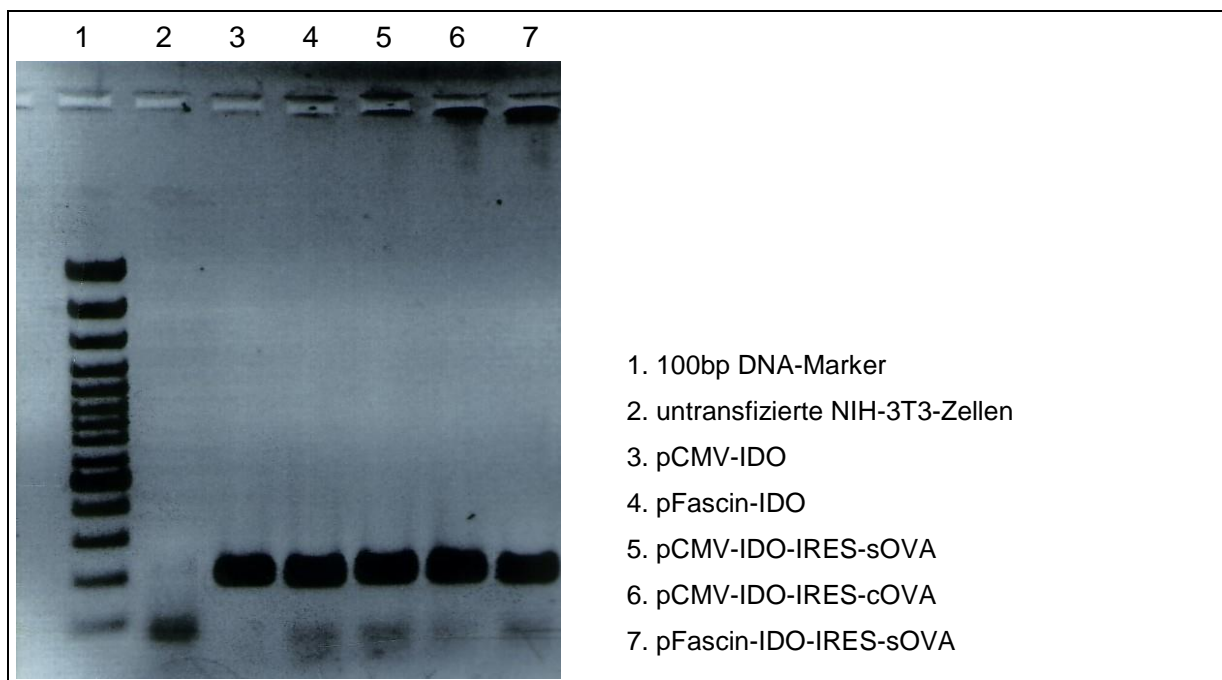


Abb. 3.1.22 Nachweis von IDO-mRNA in transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Abbildung zeigt ein 1%iges Agarosegel, auf welches die amplifizierte cDNA transfizierter NIH-3T3-Zellen nach konventioneller PCR mit IDO-spezifischen Primern aufgetragen wurde. Die Bande in den Reihen 3 bis 7, die zwischen der 200- und 300bp-Markerbande liegt, zeigt die amplifizierte IDO-DNA.

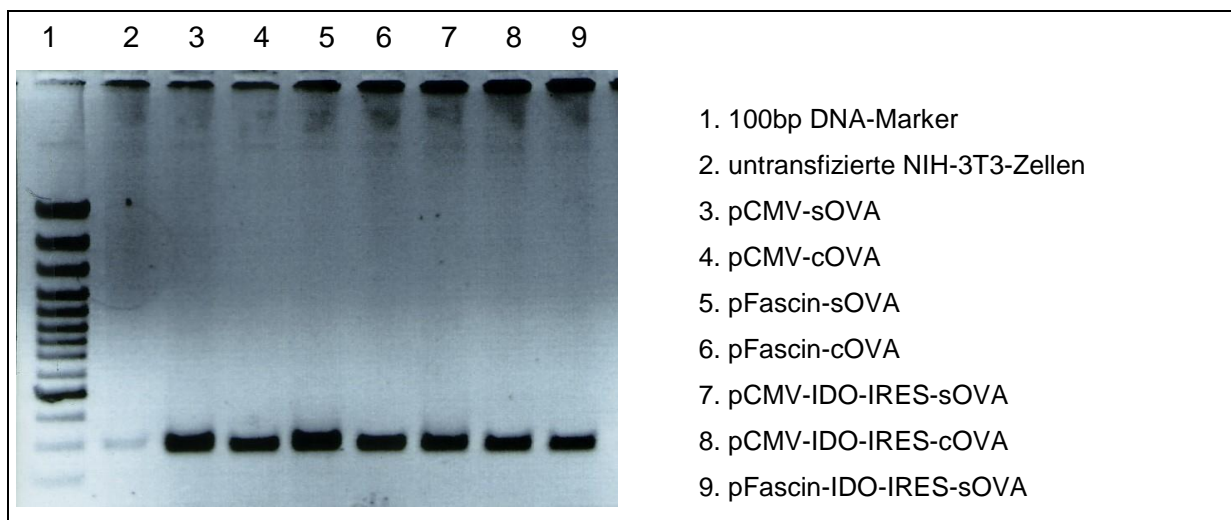


Abb. 3.1.23 Nachweis von OVA-mRNA in transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Abbildung zeigt ein 1%iges Agarosegel, auf welches die amplifizierte cDNA transfizierter NIH-3T3-Zellen nach konventioneller PCR mit OVA-spezifischen Primern aufgetragen wurde. Die Bande in den Reihen 3 bis 9, die auf Höhe der 300bp-Markerbande liegt, zeigt die amplifizierte OVA-DNA.

3.1.2.2 Nachweis des Tryptophanabbaus durch transfizierte NIH-3T3-Zellen

Um die Integrität der oben beschriebenen IDO-kodierenden Expressionsplasmide auch funktionell auf Proteinebene hinsichtlich der enzymatischen Aktivität der IDO zu analysieren, wurden die NIH-3T3-Zellen nach der Transfektion in RPMI-Medium mit definierter Tryptophanmenge (25 μ M) für 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ellen Closs (Institut für Pharmakologie) mittels HPLC die Menge des Tryptophans und der Kynurenine als Metabolite in den Zellkulturüberständen gemessen (Abb. 3.1.24).

Insgesamt war die enzymatische Aktivität der IDO bereits 24 Stunden nach der Transfektion deutlich detektierbar, der Tryptophanabbau bzw. die Kynureninanreicherung erreichte nach 48 Stunden jedoch noch stärkere Ausmaße. Im Medium der mit pCMV-IDO transfizierten Zellen wurde im Vergleich zu untransfizierten NIH-3T3-Zellkulturen ein deutlicher Tryptophanabbau bei gleichzeitiger Kynureninanreicherung beobachtet. Die Transfektion mit den Konstrukten, die sowohl IDO als auch das Antigen OVA unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodieren (pCMV-IDO-IRES-sOVA und pCMV-IDO-IRES-cOVA) resultierte ebenfalls in einem deutlichen Tryptophanabbau bzw. einer Kynureninanreicherung, obwohl diese Effekte etwas geringer ausfielen als nach der Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit pCMV-IDO. Die mit pFascin-IDO transfizierten Zellen induzierten im Vergleich zu den mit pCMV-IDO transfizierten Zellen einen deutlich schwächeren Tryptophanabbau und daraus resultierend eine geringere

Anreicherung von Kynureninen im Zellkulturmedium. Nach Transfektion mit dem Konstrukt pFascin-IDO-IRES-sOVA war kein Tryptophanabbau bzw. keine Kynureninanreicherung nachweisbar.

Demnach ist die enzymatische Aktivität der IDO nach Transfektion von NIH-3T3-Zellen mit Plasmidkonstrukten, bei denen die Transgenexpression vom Fascin-Promotor kontrolliert wird, deutlich schwächer als nach Transfektion mit Konstrukten, die IDO unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodieren. Das Phänomen, dass gewebespezifische Promotoren im Vergleich zu ubiquitären Plasmidpromotoren zu geringerer Proteinexpression führen, wurde bereits zuvor beschrieben [Vandermeulen *et al.*, 2009]. Außerdem wird deutlich, dass infolge der durch die IRES vermittelten Ko-Expression von IDO und OVA die enzymatische Aktivität der IDO erheblich schwächer war als nach Transfektion mit den Konstrukten, die lediglich IDO als Transgen kodieren. Dies impliziert, dass Gene, die durch eine IRES verbunden sind, schlechter exprimiert werden als Gene, deren Expression durch einen eigenen Promotor gesteuert werden. Auf der Grundlage dieser Daten wurde die ursprünglich geplante Strategie für die Immunisierungsstudien, in denen mit Hilfe der IRES sowohl die IDO als auch das Antigen auf ein und demselben Plasmid unter der Kontrolle des Fascin-Promotors kodiert und damit spezifisch in DC zur Expression gebracht werden sollten, revidiert. Um dennoch zu erreichen, dass *in vivo* beide Proteine zeitgleich von derselben DC produziert werden können, wurden alternativ den Versuchstieren zwei verschiedene Plasmide, die jeweils die IDO bzw. das Antigen kodieren, auf den gleichen Goldpartikeln mit Hilfe der Genpistole appliziert.

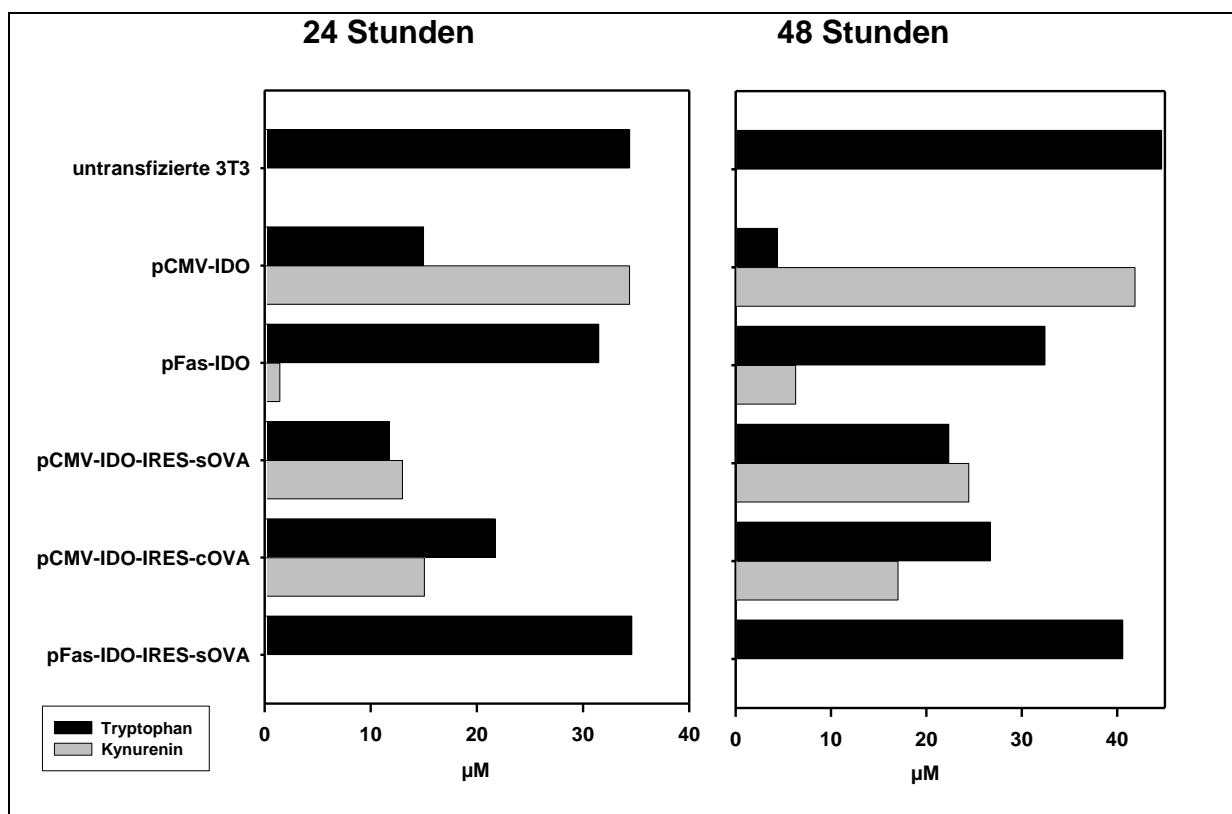


Abb. 3.1.24 Tryptophan- und Kynureninmengen in den Überständen transfizierter NIH-3T3-Zellkulturen 24 und 48 Stunden nach der Transfektion

Die Abbildung zeigt die Tryptophan- (schwarze Balken) bzw. Kynureninmengen (graue Balken) in den Überständen transfizierter NIH-3T3-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion. Die Aminosäuremengen wurden mittels HPLC bestimmt. Die hier dargestellten Daten sind repräsentativ für insgesamt drei Experimente.

3.1.2.3 *In vivo*-Funktionsanalysen von IDO-Expressionplasmiden

Unter 3.1.2.1 und 3.1.2.2 war die Funktionalität der Expressionsplasmide in verschiedenen *in vitro*-Tests nachgewiesen worden. Für diese Tests war die Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 ausgewählt worden, da sich die eigentlichen Zielzellen, nämlich murine DC, *in vitro* nicht mit ausreichender Effizienz transfizieren lassen. Um trotz dieser Schwierigkeiten die IDO-Expression auch in transfizierten DC untersuchen zu können, wurde eine biolistische Immunisierung mit Hilfe der Genpistole durchgeführt, die zu einer Expression der plasmidkodierten Gene in den DC der Haut führt. Aufgrund der unter 3.1.2.2 dargestellten Probleme in Bezug auf die Effizienz der IDO-Expression nach Transfektion mit Konstrukten, die über eine IRES verfügen, wurden lediglich die Plasmide *in vivo* getestet, die alleine IDO unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors bzw. des DC-spezifischen Fascin-Promotors kodieren.

Dazu wurden BALB/c-Mäusen mit Hilfe der Genpistole Goldpartikel, an die Plasmid-DNA (2 µg) gekoppelt war, auf fünf nicht überlappende Stellen der rasierten

Bauchhaut appliziert. Bei dieser DNA-Immunsierungsmethode dringen die Goldpartikel in die Epidermis und die Dermis ein und befördern die Expressionsplasmide direkt in das Zytoplasma oder bestenfalls in den Nukleus der Hautzellen (Keratinocyten, Langerhanszellen und dermale DC). Da dasIDO-Gen im Konstrukt pCMV-IDO unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors kodiert wird, konnten alle erfolgreich transfizierten Zellen in der Haut IDO exprimieren. Im Gegensatz dazu sollten nach der biologischen Transfektion mit pFascin-IDO nur die aktivierten Langerhanszellen und dermale DC in der Lage sein IDO zu produzieren. In beiden Fällen jedoch migrieren in der Haut transfizierte und dadurch aktivierte, mature DC in die drainierenden Lymphknoten. Um die Expression des Transgens in solchen Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden 48 Stunden nach der DNA-Immunsierung die inguinalen und axialen Lymphknoten präpariert. Aus den Lymphknotenzellen wurden mittels MACS-Separation die CD11c⁺ DCs isoliert. Diese wurden in Lysepuffer lysiert und die RNA wurde aufgereinigt. Mittels reverser Transkription wurde cDNA hergestellt, welche mittels Realtime-PCR analysiert wurde. Zur Kontrolle der Basis-IDO-Expression solcher DCs wurden Mäuse mit dem irrelevanten Vektor pCMV-EGFP biologisch immunisiert. Für die Auswertung wurde die in den CD11c⁺ DCs der Versuchstiere gemessene IDO-mRNA-Menge zu der IDO-mRNA-Menge in den CD11c⁺ DCs der mit dem Kontrollvektor transfizierten Mäuse in Bezug gesetzt.

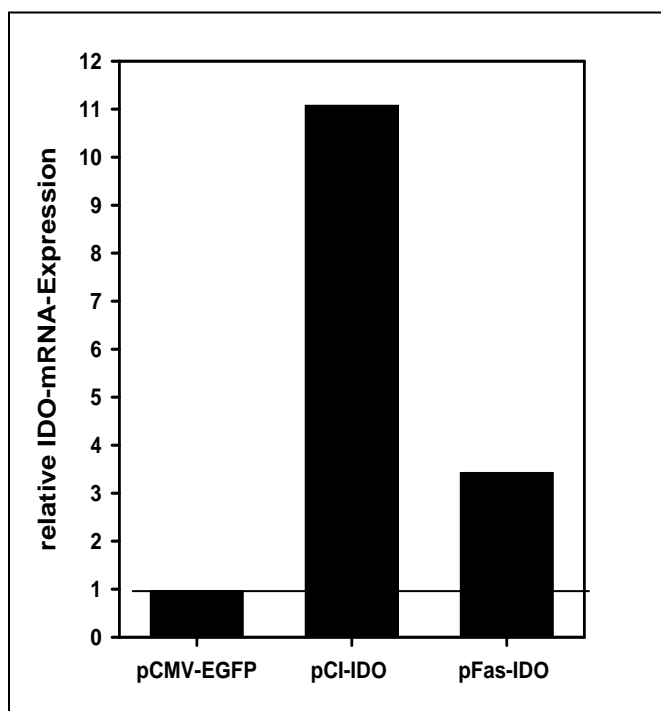


Abb. 3.1.25 Expression von IDO-mRNA in CD11c⁺ DC von DNA-immunisierten Mäusen.

BALB/c-Mäuse (n=5) wurden mittels der Genpistole mit pCMV-IDO, pFascin-IDO bzw. pCMV-EGFP behandelt. Dazu wurden fünf Schüsse à 2µg DNA auf nicht überlappende Stellen der rasierten Bauchhaut abgegeben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die drainierenden inguinalen/axialen Lymphknoten präpariert und gepoolt. Aus den Lymphknotenzellen wurden mittels MACS-Separation CD11c⁺ DC separiert. Die RNA wurde aus diesen Zellen isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Mittels Realtime-PCR wurde die relative IDO-mRNA-Expression der DC in Relation zu pCMV-EGFP behandelten Tieren ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Die IDO-mRNA-Expression in CD11c⁺ DCs aus mit pCMV-IDO transfizierten Mäusen war im Vergleich zu der IDO-mRNA-Expression in CD11c⁺ DCs aus den mit Kontroll-DNA transfizierten Mäusen erheblich erhöht (Abb. 3.1.25). Die IDO-mRNA-Expression in CD11c⁺ DCs aus mit pFascin-IDO transfizierten Mäusen war ebenfalls erheblich erhöht, allerdings in geringerem Ausmaß als nach Transfektion mit pCMV-IDO. Somit konnte nachgewiesen werden, dass auch *in vivo* das IDO-Transgen nach biolistischer Transfektion mit den Expressionsplasmiden pCMV-IDO und pFascin-IDO in DC exprimiert wird. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass das Gen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors stärker exprimiert wird als unter der Kontrolle des DC-spezifischen Fascin-Promotors.

3.1.3 Einfluss einer Koexpression von IDO auf die durch biolistische Transfektion induzierte transgenspezifische Immunantwort

Um den Einfluss einer Koexpression von IDO auf die systemische Immunantwort, welche durch biolistische Transfektion mit einem antigenkodierenden Vektor induziert wird, verlässlich untersuchen zu können, wurde in den folgenden Experimenten das Modellallergen β Gal anstelle des ursprünglich geplanten OVA verwendet. In der Klinischen Forschergruppe Allergie lagen aufgrund intensiver vorausgegangener Studien zur DNA-Immunisierung umfangreiche Erfahrungen hinsichtlich der immunologischen Eigenschaften sowohl der systemischen als auch der lokalen Antigen-spezifischen Immunantworten mit β Gal als Antigen vor [Sudowe *et al.*, 2002, 2006, 2009; Ross *et al.*, 2003; Zindler *et al.*, 2008; Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. So war eine verlässliche Evaluierung der beobachteten Effekte möglich, ohne dass eine zeitaufwendige umfangreiche funktionelle Überprüfung der OVA-Plasmide sowie eine Charakterisierung der Immunantwort, die nach biolistischer Transfektion mit diesen Vektoren ausgelöst worden wäre, nötig war.

Für diese Experimente wurden BALB/c-Mäuse dreimal mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP (Kontrolle), pFascin- β Gal+pCMV-IDO oder pFascin- β Gal+pFascin-IDO bzw. mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP (Kontrolle), pCMV- β Gal+pCMV-IDO oder pCMV- β Gal+pFascin-IDO mittels der Genpistole immunisiert (Abb. 3.1.26). Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer in den Seren mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.1.27). Nach der Präparation der Milzen sowie der inguinalen und axialen Lymphknoten wurden die Milz- und Lymphknotenzellen für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von β Gal *in vitro*

restimuliert und die Zytokinproduktion wurde durch Quantifizierung der Zytokinmengen in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.1.28). Zusätzlich wurde *ex vivo* die Anzahl der IFN- γ -produzierenden zytotoxischen T-Zellen unter den Milzzellen per CTL-ELISpot-Analyse bestimmt (Abb. 3.1.29).

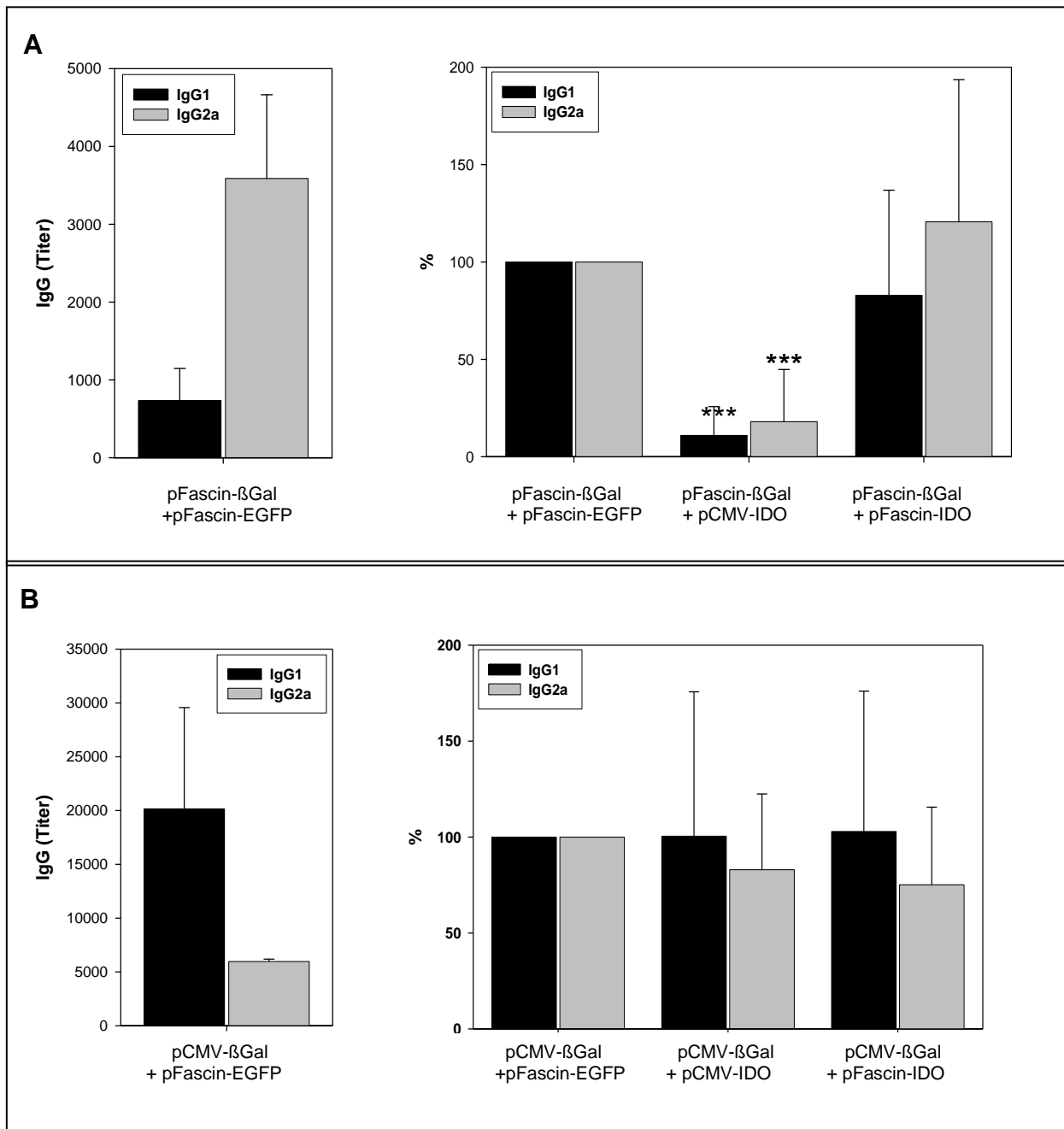


Abb. 3.1.27 Einfluss einer Koapplikation von IDO-kodierenden Plasmiden auf die Ig-Produktion nach Immunisierung mit pFascin- β Gal

BALB/c-Mäuse (n=14) wurden wie in Abb. 3.1.26 beschrieben mit den dargestellten Plasmidkombinationen biolistisch transfiziert. Zwei Wochen nach der letzten DNA-Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper wurden in den Seren mittels ELISA nachgewiesen. Auf der linken Seite sind die Mittelwerte \pm SD der IgG-Titer individueller Seren nach Immunisierung mit den Kontrollvektoren pFascin- β Gal+pFascin-EGFP (A) bzw. pCMV- β Gal+pFascin-EGFP (B) dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung sind die Antikörpertiter in den Seren der mit den IDO-Expressionsplasmiden koimmunisierten Mäuse prozentual zu den Kontrollvektoren dargestellt. (***) $p < 0,001$

In Abbildung 3.1.27 A ist die Produktion von β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern nach Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP bzw. pFascin- β Gal+pCMV-IDO oder pFascin- β Gal+pFascin-IDO dargestellt. Die Kontrollimmunisierung mit den Vektoren pFascin- β Gal+pFascin-EGFP führte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die für die biolistische Transfektion mit pFascin- β Gal alleine erhoben wurden [Sudowe *et al.*, 2003], zu der Produktion von überwiegend IgG2a-Antikörpern (Abb. 3.1.27 A links). Die Koimmunisierung mit dem Vektor pCMV-IDO bewirkte eine erhebliche Reduktion der durch Immunisierung mit pFascin- β Gal induzierten β Gal-spezifischen IgG-Produktion: während die IgG2a-Produktion um rund 80 % reduziert war, fiel die IgG1-Produktion um circa 90 % niedriger aus als nach Immunisierung mit dem Kontrollvektor. Die Koapplikation des Vektors pFascin-IDO hingegen führte nur zu einer leicht verringerten IgG1-Produktion (20 % weniger im Vergleich zu der Immunisierung mit dem Kontrollvektor), die IgG2a-Produktion war sogar leicht erhöht (20 % mehr als nach Immunisierung mit dem Kontrollvektor), diese Änderungen in der Stärke der IgG-Produktion waren jedoch statistisch nicht signifikant. In beiden Versuchsgruppen wurde nach Immunisierung mit den IDO-Kombinationsvakzinen etwas mehr IgG2a als IgG1 gebildet. In Abbildung 3.1.27 B ist die Produktion von β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern nach Immunisierung mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP bzw. pCMV- β Gal+pCMV-IDO oder pCMV- β Gal+pFascin-IDO dargestellt. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten über die DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal alleine [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009, Ludwig-Portugall *et al.*, 2004] führte die Koimmunisierung mit dem Kontrollvektor pFascin-EGFP ebenfalls zu einer erheblichen Produktion von sowohl IgG1 als auch IgG2a, wobei die IgG1-Produktion überwog (Abb. 3.1.27 B links). Im Gegensatz zu der Versuchsreihe der Mäuse, die mit pFascin- β Gal koimmunisiert wurden, bewirkte weder eine Koapplikation von pCMV-IDO noch von pFascin-IDO eine signifikante Veränderung der β Gal-spezifischen IgG-Produktion in pCMV- β Gal transfizierten Tieren. Lediglich die IgG2a-Produktion war in den Tieren, die eine der beiden IDO-Kombinationsvakzinierungen erhalten hatten, um rund 20 % verringert. In allen Versuchsgruppen wurde nach Immunisierung mit beiden IDO-Kombinationsvakzinen etwas mehr IgG1 als IgG2a gebildet.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die durch die Immunisierung mit pFascin- β Gal ausgelöste humorale Immunantwort durch die Koapplikation von

pCMV-IDO, nicht jedoch von pFascin-IDO, inhibiert werden konnte, wohingegen die durch Vakzinierung mit pCMV- β Gal ausgelöste Antikörperproduktion durch eine Koapplikation der IDO-Expressionsplasmide unbeeinflusst geblieben ist.

Um zu untersuchen, ob durch die Kotransfektion mit den IDO-kodierenden Plasmiden die Transgen-spezifische T-Zell-Antwort beeinflusst wird, wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus den mit den verschiedenen Expressionsvektoren immunisierten Mäusen isoliert und für 72 Stunden mit dem Antigen β Gal restimuliert. Im Anschluss wurden die Zytokinmengen von IL-5 und IFN- γ in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.1.28 und Abb. 3.1.29).

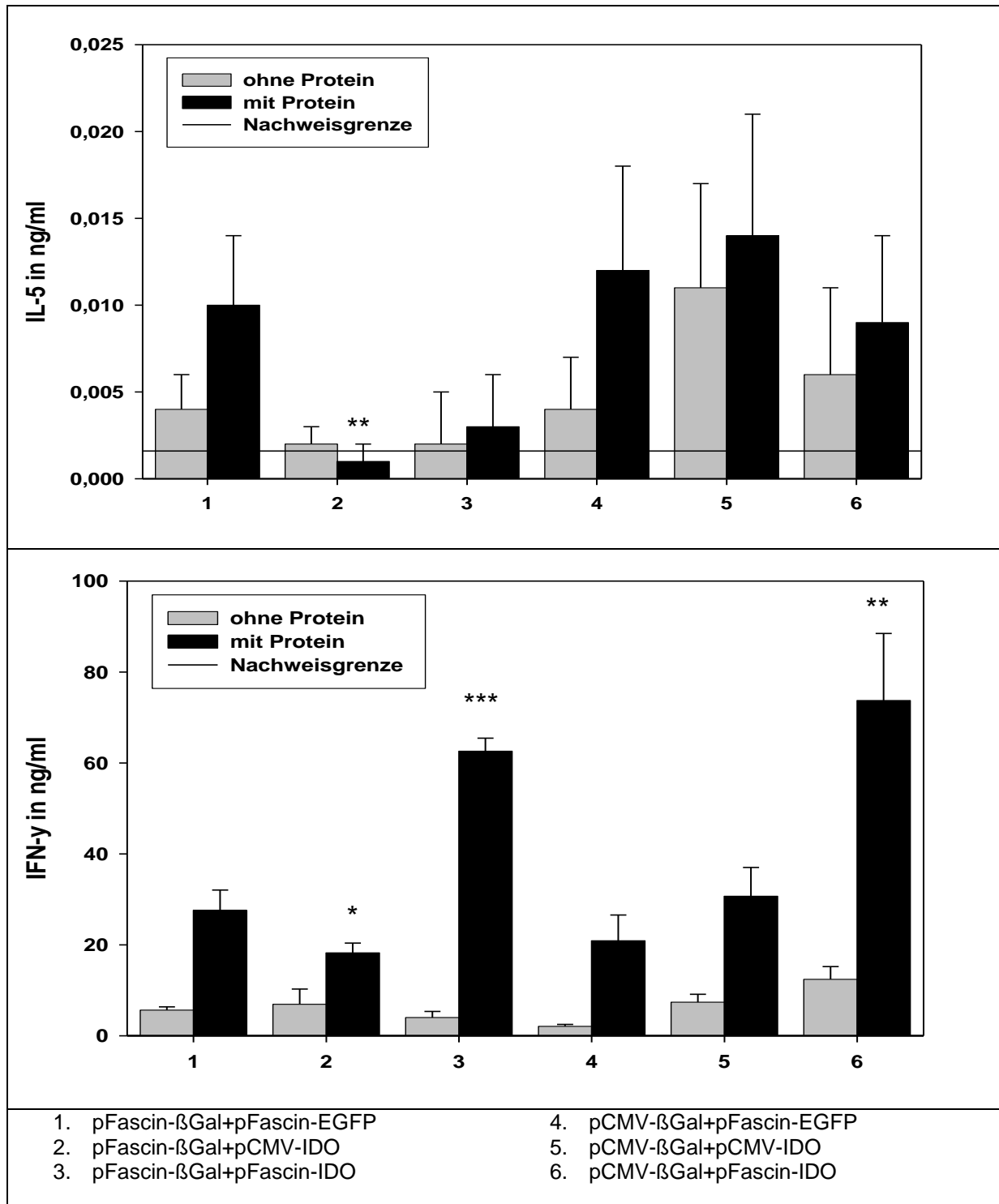


Abb. 3.1.28: Einfluss der Koapplikation von IDO-kodierenden Plasmiden auf die βGal-spezifische Zytokinproduktion der Milzzellen nach Immunisierung mit pFascin-βGal bzw. pCMV-βGal

BALB/c-Mäuse (n=4) wurden wie in Abb. 3.1.26 beschrieben mit den dargestellten Plasmidkombinationen biolistisch transfiziert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und für 72 h ohne (graue Balken) bzw. mit 25 µg/ml βGal (schwarze Balken) kultiviert. Die Mengen der Zytokine IL-5 und IFN-γ in den Kulturüberständen wurden anschließend mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der Zytokinkonzentrationen in den Überständen aus je vier Kulturen. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

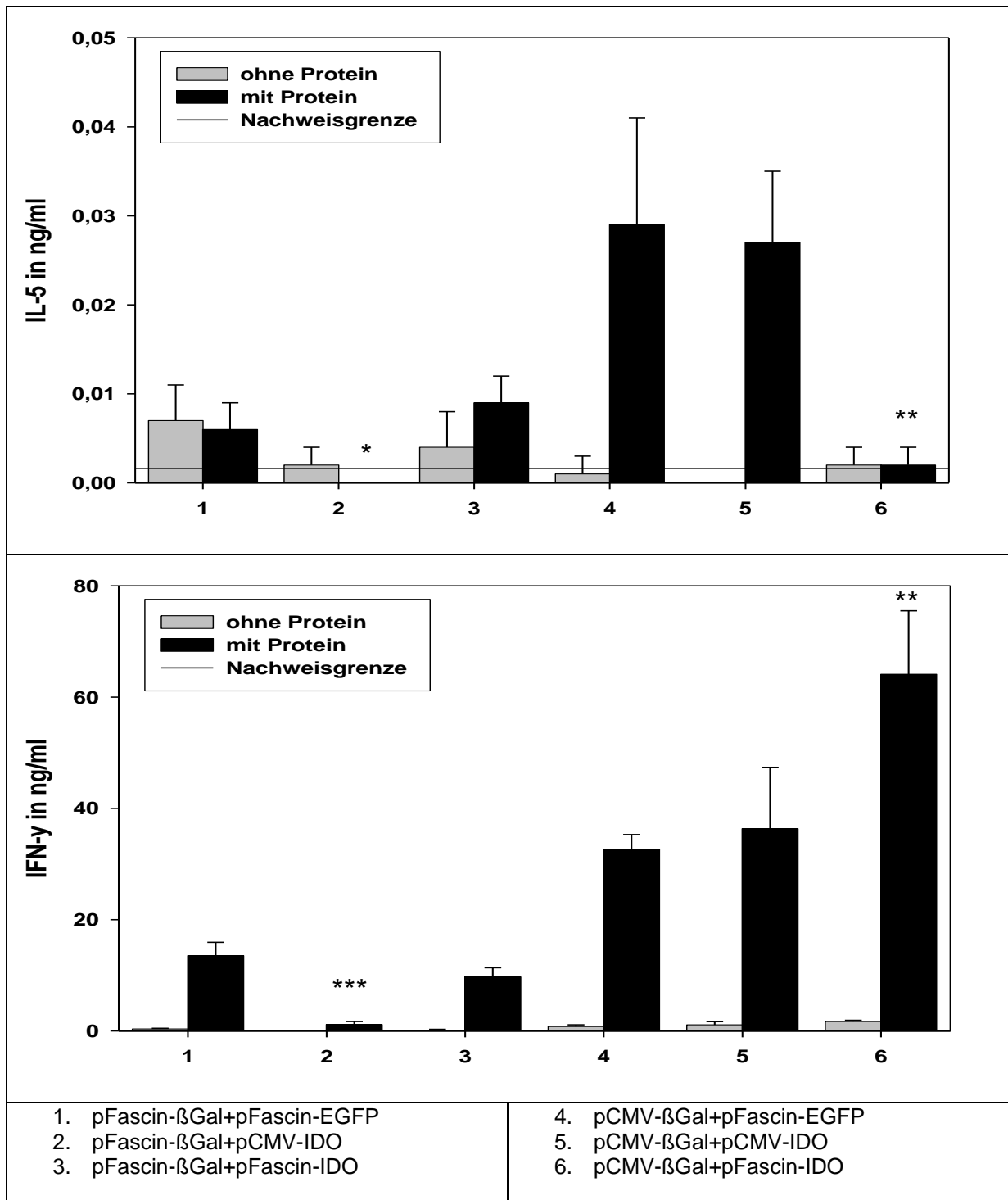


Abb. 3.1.29: Einfluss einer Koapplikation vonIDO-kodierenden Plasmiden auf die Zytokinproduktion der Lymphknotenzellen nach Immunisierung mit pFascin-βGal bzw. pCMV-βGal

BALB/c-Mäuse (n=4) wurden dreimal im Abstand von je einer Woche mit den verschiedenen Expressionsvektoren mit der Genpistole immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Lymphknotenzellen isoliert und ohne (graue Balken) bzw. mit 25 µg/ml βGal (schwarze Balken) kultiviert. Die Mengen der Zytokine IL-5 und IFN-γ in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der Zytokinkonzentrationen in den Überständen aus je vier Kulturen. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

Die Analyse der Zytokinproduktion ergab, dass die Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP zu einer starken antigenspezifischen Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ durch Milz- und Lymphknotenzellen führte. Das Th2-Zytokin IL-5 wurde in den Überständen von Milz- und Lymphknotenzellkulturen dagegen nur in äußerst geringer Konzentration nahe der jeweiligen Nachweisgrenze gemessen. Die DNA-Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP induzierte also eine Th1-polarisierte Antwort, was den zuvor publizierten Daten bei alleiniger DNA-Immunisierung mit pFascin- β Gal entspricht [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009].

Auch nach Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-IDO bzw. pFascin- β Gal+pCMV-IDO produzierten die Milz- und Lymphknotenzellen nach Restimulation *in vitro* kaum oder gar kein IL-5. Die Immunisierung mit pFascin- β Gal+pCMV-IDO führte nach *in vitro*-Stimulation von sowohl Milzzellen als auch Lymphknotenzellen zu einer leicht (Milzzellen) bis deutlich (Lymphknotenzellen) geringeren IFN- γ -Produktion. Nach Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-IDO hingegen war die IFN- γ Produktion *in vitro* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht (Milzzellen) oder nur schwach reduziert (Lymphknotenzellen).

In der Gesamtheit führen die Resultate aus den Analysen der β Gal-spezifischen IgG-Produktion und den Bestimmungen der Zytokinproduktion nach Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen *in vitro* zu dem Schluss, dass die antigenspezifische Th1-Antwort in den mit pFascin- β Gal+pCMV-IDO immunisierten Tieren abgeschwächt ist.

Die Analyse der Zytokinproduktion nach Immunisierung mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP ergab eine etwas stärkere antigenspezifische Produktion des Th2-Zytokins IL-5 vor allem durch die Lymphknotenzellen, gleichzeitig wurde jedoch auch eine erhebliche IFN- γ Produktion durch restimierte Milz- und Lymphknotenzellen gemessen. In Analogie zu den initialen Studien über die DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009] induziert die DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP demnach in Lymphknoten ebenfalls eine stärkere Th2-Antwort als pFascin- β Gal+pFascin-EGFP.

Die Koapplikation der Konstrukte pFascin-IDO bzw. pCMV-IDO zusammen mit pCMV- β Gal führte im Wesentlichen zu keiner signifikant verminderten IFN- γ Produktion durch die restimulierten Milz- und Lymphknotenzellen, während die IL-5 Produktion in den Lymphknotenzellen nach pFascin-IDO Koapplikation signifikant

vermindert war. Allgemein muss jedoch beachtet werden, dass die IL-5 Konzentration insgesamt sehr gering ausfiel.

Zusammenfassend kann also anhand der Analysen der β Gal-spezifischen IgG-Produktion und den Bestimmungen der Zytokinproduktion nach Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen *in vitro* festgehalten werden, dass die Koimmunisierung weder mit pFascin-IDO noch mit pCMV-IDO einen inhibitorischen Effekt auf die durch die Applikation von pCMV- β Gal ausgelöste Immunantwort der immunisierten Tieren hat.

Weiterhin wurde der Einfluss der Expression der IDO auf die Rekrutierung β Gal-spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen mit Hilfe von CTL-ELISpot-Analysen *ex vivo* evaluiert. In Abbildung 3.1.30 ist dargestellt, dass die Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP große Mengen IFN- γ -produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen induziert (90 CTL/2x10⁵ Milzzellen). Parallel zu der bereits dokumentierten Inhibition der Aktivierung CD4⁺ T-Zellen wurde durch die Koapplikation von pCMV-IDO auch die Induktion CD8⁺ Effektor-T-Zellen signifikant reduziert (49 CTL/2x10⁵ Milzzellen). Die Koimmunisierung von pFascin-IDO hingegen führte zu keiner Veränderung der Frequenz der β Gal-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu der Situation nach Immunisierung mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP.

Die Zahl der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen betrug nach DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP ungefähr das Doppelte (192 CTL/2x10⁵ Milzzellen) der Zellzahl, die im Vergleich in Milzen von Tieren, welche mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP immunisiert wurden, bestimmt wurde. Dieses Phänomen wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben [Sudowe *et al.*, 2008]. Die Koapplikation von pCMV- β Gal mit pCMV-IDO bzw. pFascin-IDO führte zu keiner Reduktion der CTL-Induktion im Vergleich zu der Kontrollimmunisierung mit pCMV- β Gal+pFascin-EGFP, die Zahl der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen wurde durch die Kotransfektion von pCMV-IDO sogar signifikant verstärkt (244 CTL/2x10⁵ Milzzellen).

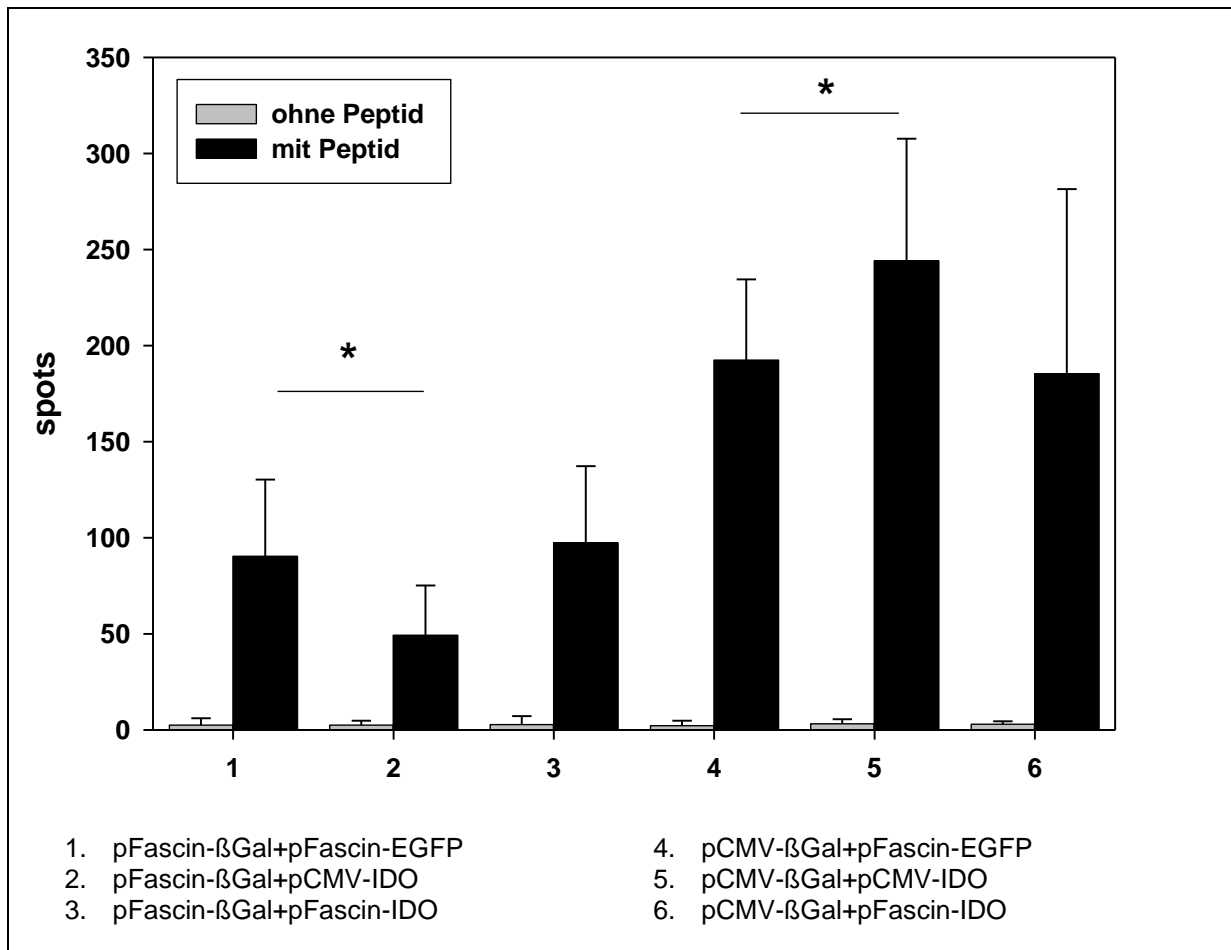


Abb. 3.1.30: Einfluss der Koapplikation von IDO-kodierenden Plasmiden auf die Induktion IFN-γ-produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen nach Immunisierung mit pFascin-βGal bzw. pCMV-βGal

BALB/c-Mäuse (n=10) wurden wie in Abb. 3.1.26 beschrieben mit den dargestellten Plasmidkombinationen biolistisch transfiziert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Anzahl IFN-γ-produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen mittels ELISpot ermittelt. Dazu wurde 2×10^5 Milzzellen auf ELISpot-Mikrotiterplatten, die mit anti-IFN-γ-Antikörpern beschichtet worden waren, mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) Zugabe des MHC I-spezifischen βGal-Peptids TPHPARIGL (1 μg/ml) kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD von Quadruplikaten. Signifikante Unterschiede in der Anzahl der IFN-γ-produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen in den mit pFascin-βGal+pCMV-IDO oder pCMV-βGal+pCMV-IDO immunisierten Mäusen verglichen mit der Anzahl der IFN-γ-produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen in den Mäusen der entsprechenden Kontrollgruppe pFascin-βGal+pFascin-EGFP bzw. pCMV-βGal+pFascin-EGFP sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05). Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein inhibitorischer Einfluss der Koapplikation der IDO auf die transgenspezifische Immunantwort nur dann zu erkennen war, wenn das Transgen βGal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors exklusiv in den DC exprimiert wurde. Dieser inhibitorische Effekt war jedoch nur gegeben, wenn die IDO unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde.

3.1.4 Einfluss einer Koapplikation vonIDO- und Antigen-kodierenden Plasmiden auf die antigenspezifische Immunantwort im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

Auf Grundlage der zuvor dargestellten Daten, die zeigen, dass eine Inhibition der Immunantwort durch die Koapplikation von IDO nur gelingt, wenn das Transgen β Gal unter dem Einfluss des Fascin-Promotors exklusiv in den DC exprimiert wird, wurde im Folgenden lediglich dieses Plasmid (pFascin- β Gal) in Kombination mit den beiden IDO-Konstrukten pFascin-IDO und pCMV-IDO im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie verwendet. Dazu wurden BALB/c-Mäuse wie zuvor beschrieben mit Hilfe der Genpistole mit den Kombinationsvakzinen *in vivo* transfiziert. Zwei Wochen nach der letzten DNA-Vakzinierung wurden die Tiere fünfmal im Abstand von je 14 Tagen mit 1 μ g β Gal adsorbiert an das Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) intraperitoneal immunisiert (Abb. 3.1.31).

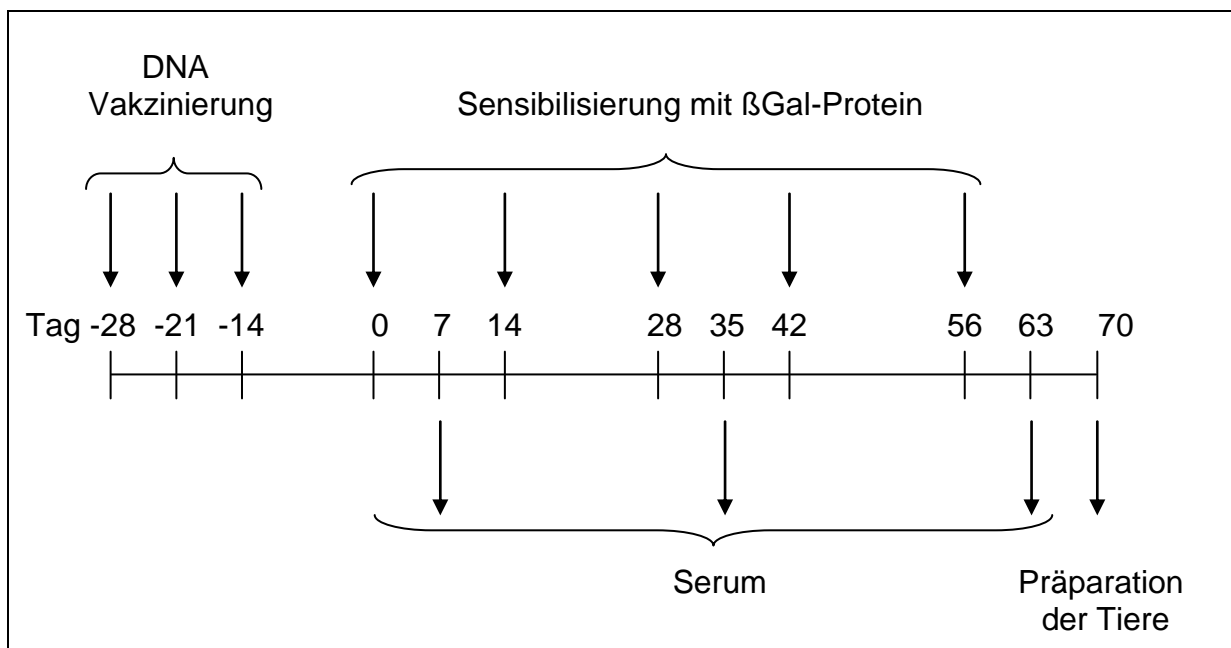


Abb. 3.1.31: Immunisierungsschema

BALB/c-Mäuse (n=4) wurden an Tag -28, -21 und -14 mit pFascin- β Gal+pFascin-EGFP bzw. den Kombinationsvakzinen pFascin- β Gal+pCMV-IDO und pFascin- β Gal+pFascin-IDO mittels der Genpistole immunisiert. Ab Tag 0 wurden die Tiere repetitiv alle 14 Tage mit 1 μ g β Gal-Protein adsorbiert an Alum sensibilisiert. An den Tagen 7, 35 und 63 wurde den Tieren Serum entnommen und die β Gal-spezifischen IgG1-, IgG2a- und IgE-Titer wurden mittels ELISA bestimmt. An Tag 70 wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen und die drainierenden Lymphknoten wurden präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden für 72 Stunden *in vitro* mit dem Antigen restimuliert und die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen wurde *ex vivo* mittels ELISpot ermittelt.

Kontrollmäuse wurden nicht vakziniert, aber mit β Gal-Protein sensibilisiert. Nach der ersten (Tag 7), dritten (Tag 35) und fünften (Tag 63) Injektion mit β Gal wurde den Mäusen Blut entnommen und die β Gal-spezifischen IgG1-, IgG2a- und IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 3.1.32).

In Abbildung 3.1.32 ist die Produktion der β Gal-spezifischen Antikörper in unvakzinierten und DNA-vakzinierten Mäusen zu den verschiedenen Sensibilisierungszeitpunkten dargestellt. Die wiederholte Immunisierung mit β Gal-Protein, adsorbiert an Alum, führte in den nicht vakzinierten Mäusen zu einem raschen Anstieg der β Gal-spezifischen IgG1- (A) und IgE-Produktion (C), während auch nach mehreren Applikationen von β Gal-Protein nur wenig antigenspezifisches IgG2a (B) induziert wurde.

Eine der Immunisierung mit β Gal/Alum vorausgegangene biologische Vakzinierung mit der Kontrollvakzine pFascin- β Gal+pFascin-EGFP führte zu einer signifikanten Inhibition der IgG1- und IgE-Produktion, wohingegen die IgG2a-Produktion im Vergleich zu der nicht vakzinierten Kontrollgruppe bedeutend verstärkt war. Nach Koapplikation von pFascin- β Gal mit einemIDO-kodierenden Plasmid war der Serumgehalt der Versuchstiere an IgG1- und IgE-Antikörpern ebenfalls erheblich geringer. Dieser inhibitorische Effekt war unabhängig davon, ob das IDO-Gen unter der Kontrolle des CMV oder des Fascin-Promotors exprimiert wurde. Die Erhöhung der IgG2a-Produktion fiel jedoch nach Vakzinierung mit pFascin- β Gal+pFascin-IDO und insbesondere nach Applikation von pFascin- β gal+pCMV-IDO nur moderat aus (Abb. 3.1.32 B).

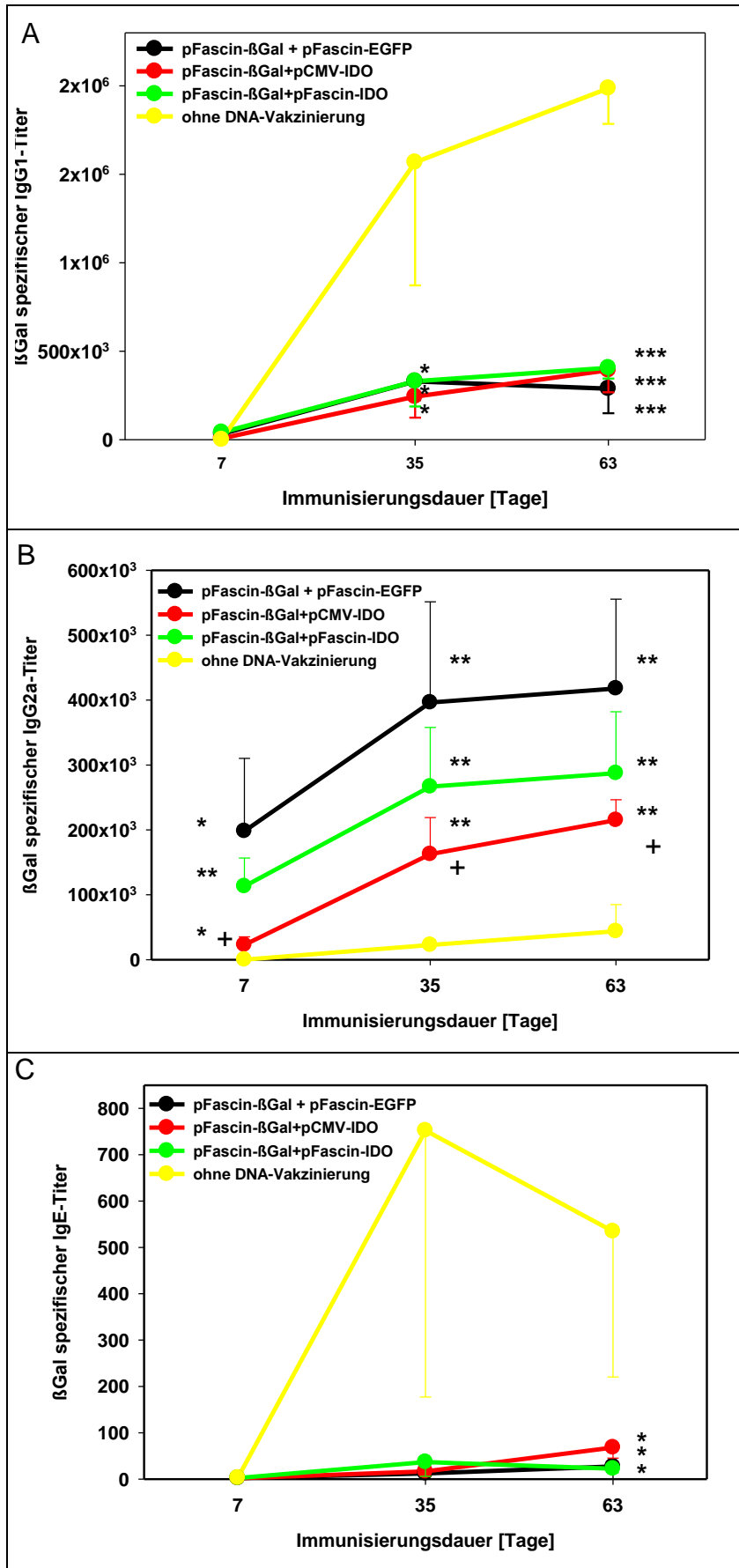


Abb. 3.1.32: Einfluss einer Kovakzinierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Plasmiden auf die humorale Immunantwort im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden wie unter 3.1.31 mit den angegebenen

Kombinationsvakzinen

biolistisch transfiziert und im Anschluss durch wiederholte

Immunisierung mit 1 µg βGal/Alum sensibilisiert. An den dargestellten Zeitpunkten

wurden die Seren der Versuchsmäuse gewonnen und die βGal-spezifischen

IgG1- (A) und IgG2a- (B) sowie IgE- (C) Antikörpertiter wurden mittels ELISA

bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der Antikörpertiter

individueller Seren. (Kontrollgruppe ohne Vakzinierung: *p<0,05;

p<0,01; *p<0,001; Kontrollgruppe pFascin-βGal+pFascin-EGFP:

+p<0,05)

Um die immunologischen Veränderungen der DNA-Vakzinierung auch auf der T-Zell-Ebene zu analysieren, wurden eine Woche nach Abschluss der Sensibilisierung die Milzen sowie die mesenteriiellen Lymphknoten der Versuchstiere präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden für 72 Stunden mit und ohne Zugabe von β Gal restimuliert und die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.1.33).

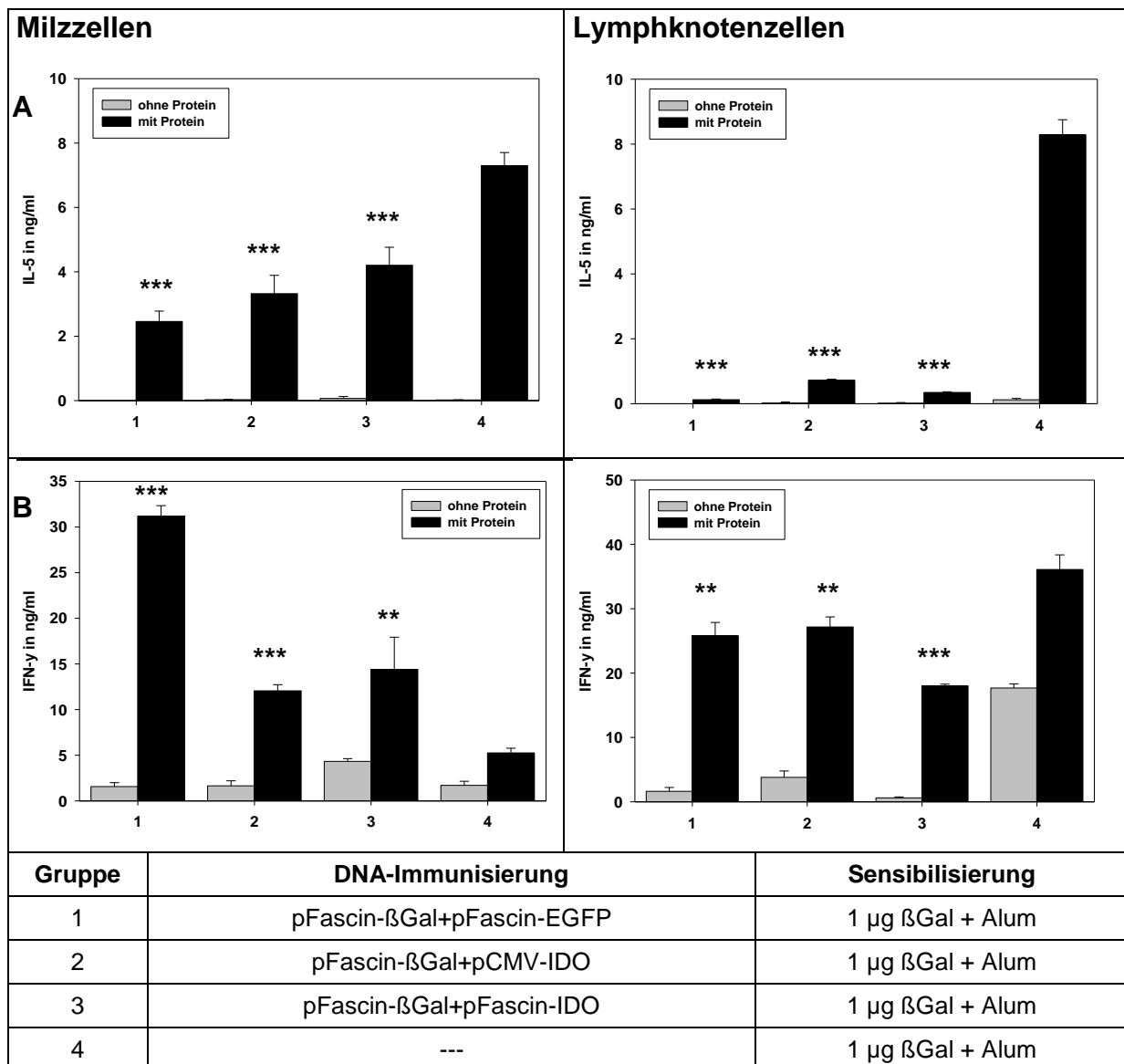


Abb. 3.1.33: Einfluss einer Kovakzinierung mit pFascin- β Gal und IDO-kodierenden Plasmiden auf die Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden wie unter 3.1.31 mit den angegebenen Kombinationsvakzinen biologisch transfiziert und im Anschluss durch wiederholte Immunisierung mit 1 μ g β Gal sensibilisiert. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurden die Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und ohne (graue Balken) bzw. mit 25 μ g/ml β Gal (schwarze Balken) restimuliert. Die Mengen der Zytokine IL-5 (A) und IFN- γ (B) in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Zytokinkonzentrationen in den Überständen aus je vier Kulturen. (**p<0,01; ***p<0,001)

In den Milzzellkulturen unvakzinierter Tiere wurden große Mengen an IL-5 und weniger IFN- γ produziert, was charakteristisch für eine deutlich polarisierte Th2-Immunantwort ist. Eine Vakzinierung mit den Kontrollplasmiden pFascin- β Gal+pFascin-EGFP führte zu einer deutlichen Reduktion der IL-5-Produktion durch Milz- und Lymphknotenzellen, wohingegen die IFN- γ -Produktion vor allem in den Milzzellkulturen stark erhöht war. Die zuvor beschriebene Th2-Immunantwort wurde durch die biolistische Kontrollvakzinierung also supprimiert zugunsten der Etablierung einer Th1-Immunantwort. Die Koapplikation derIDO-kodierenden Plasmie hatte keinen verstärkenden Effekt auf die durch pFascin- β Gal hervorgerufene Reduktion der in den Kontrolltieren durch die Sensibilisierung induzierten Aktivierung von IL-5-produzierenden Th2-Zellen. Gleichzeitig wurde durch die Koapplikation desIDO-kodierenden Vektors jedoch die durch die Vakzinierung mit dem transgenkodierenden Plasmid hervorgerufene Stimulation von IFN- γ produzierenden Th1-Zellen inhibiert.

Zusammenfassend kann man aufgrund der gezeigten Daten konstatieren, dass die prophylaktische biolistische Vakzinierung mit pFascin- β Gal und einemIDO-kodierenden Vektor im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie zu einer Inhibition sowohl der durch Sensibilisierung induzierten Th2-Antwort als auch der durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal bedingten Th1-Immunantwort führt.

An der Inhibition der IgE-Produktion nach biolistischer Transfektion mit pFascin- β Gal sind auch CD8⁺ T-Zellen entscheidend beteiligt [Sudowe *et al.*, 2009]. Andererseits spielen solche nach der Vakzinierung induzierten CD8⁺ T-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer Atemwegshyperreaktivität im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentszündung [Zindler *et al.*, 2008]. Um den Einfluss der Koapplikation vonIDO-kodierenden Plasmiden auf die Aktivierung der β Gal-spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen zu evaluieren, wurde deren Frequenz in den vakzinierten Tieren *ex vivo* bestimmt (Abb. 3.1.34). Wie zuvor für die Vakzinierung mit pFascin- β Gal berichtet [Ludwig-Portugall *et al.*, 2004; Sudowe *et al.*, 2009] lassen sich nach Immunisierung der Mäuse mit der Kontrollvakzine pFascin- β Gal+pFascin-EGFP am Ende der Sensibilisierungsphase eine große Zahl IFN- γ produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen nachweisen. Ihre Zahl ist jedoch nach Koapplikation von pCMV-IDO und in etwas geringerem Maße auch nach Transfektion mit pFascin-IDO signifikant inhibiert.

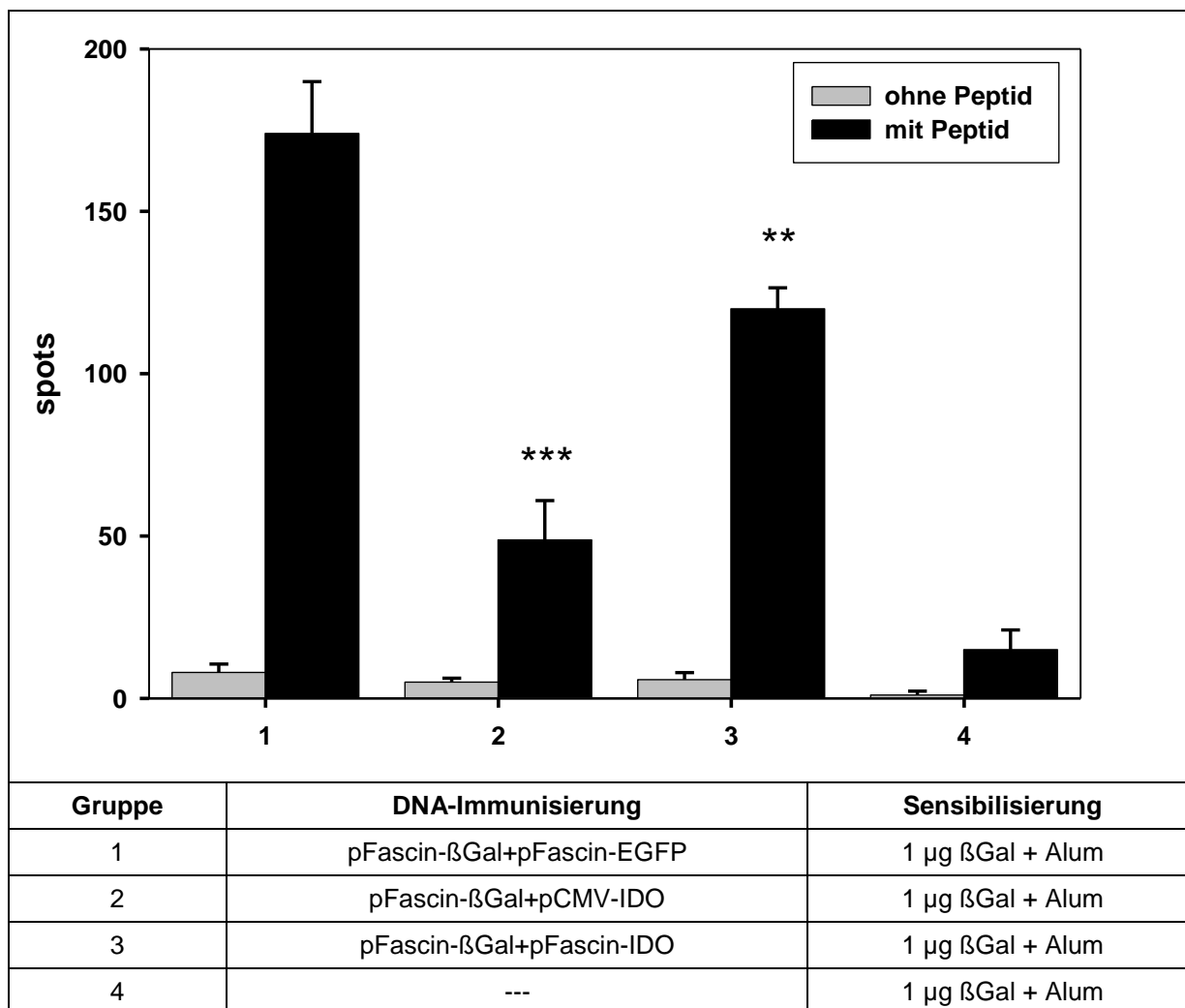


Abb. 3.1.34: Einfluss einer Kovakzinierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Plasmiden auf die Induktion IFN-γ-produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden wie unter 3.1.31 mit den angegebenen Kombinationsvakzinen biologisch transfiziert und im Anschluss durch wiederholte Immunisierung mit 1 µg βGal sensibilisiert. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Anzahl der IFN-γ-produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen wurde mittels ELISpot ermittelt. Dazu wurde 2×10^5 Milzzellen auf ELISpot-Mikrotiterplatten, die mit anti-IFN-γ-Antikörpern beschichtet worden waren, mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) Zugabe des MHC I-spezifischen βGal-Peptids TPHPARIGL (1 µg/ml) kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD von Quadruplikaten. Signifikante Unterschiede in der Anzahl der IFN-γ-produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen in den mit pFascin-βGal+pCMV-IDO oder pFascin-βGal+pFascin-IDO immunisierten Mäusen verglichen mit der Anzahl der IFN-γ-produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen in den Mäusen der entsprechenden Kontrollgruppe pFascin-βGal+pFascin-EGFP sind durch Sterne gekennzeichnet (**p<0,01 ; ***p<0,001).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Vakzinierung mit pFascin-βGal+pFascin-EGFP eine Inhibition der allergischen Immunantwort zur Folge hatte. Statt einer Th2-Antwort wurden jedoch starke Th1- und CTL-Antworten induziert, die potenziell lokale immunpathologische Effekte haben können [Zindler *et al.*, 2008]. Diese Verschiebung in der Art der Immunantwort läßt sich jedoch durch die Koapplikation vonIDO-kodierenden Vektoren reduzieren. So ließ sich nach prophylaktischer biolistischer Vakzinierung mit pFascin-βGal und einem IDO-kodierenden Vektor im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie eine Inhibition sowohl der durch Sensibilisierung induzierten Th2-Immunantwort als auch der durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal bedingten Th1-Immunantwort beobachten. Bemerkenswerterweise war am Ende der Sensibilisierungsphase auch die Zahl der IFN-γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach Koapplikation von IDO-kodierenden Vektoren im Vergleich zu der Kontrollvakzinierung mit pFascin-βGal+pFascin-EGFP inhibiert, so dass auch hier die eventuell schädlichen Auswirkungen der Induktion von CD8⁺ T-Zellen, wie sie im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung z.B. in Form der Auslösung einer AHR auftreten können, umgangen werden können.

4. Diskussion

Die Häufigkeit von allergischen Erkrankungen des Soforttyps wie allergisches Asthma bronchiale oder Rhinokonjunktivitis ist in den letzten Jahrzehnten sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen dramatisch angestiegen [Johnson *et al.*, 2002]. Die Typ I-Allergie ist durch eine starke antigenspezifische IgE-Produktion durch proliferierende B-Zellen charakterisiert. Gefördert wird die IgE-Synthese durch die Sezernierung von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 von Th2-Zellen, welche verstärkt aus naiven CD4⁺ T-Zellen rekrutiert werden. Die Grundlage der gesteigerten Aktivierung von Th2-Zellen bildet eine genetische Prädisposition des Allergikers, aber auch Umweltfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien. Die lange Zeit vertretene immunologische Sichtweise zur Allergieentstehung ging von einer gestörten Balance der Aktivierung allergenspezifischer CD4⁺ T-Zellen zugunsten der allergiefördernden Th2-Zellen, mit verminderter Rekrutierung antagonistischer IFN- γ produzierender Th1-Zellen, aus. Neuere Untersuchungen legen allerdings die Interpretation nahe, dass ein Ungleichgewicht bei der Induktion von Th2-Zellen und von regulatorischen T-Zellen (Treg) zu herrschen scheint [Akdis *et al.*, 2004]. Die Frequenz der Treg, die die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und/oder TGF- β produzieren und die in gesunden Individuen eine allergenspezifische Toleranz der CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie aufrechterhalten, ist in Allergikern stark reduziert, was dazu führt, dass die Aktivierung von Th2-Zellen keiner effizienten Kontrolle unterliegt [Akdis *et al.*, 2004; Jutel *et al.*, 2003].

Die meisten der aktuell angewandten Therapien zur Behandlung allergischer Krankheitsbilder wie Antihistaminika, Glukokortikoide oder Immunsuppressiva kontrollieren in erster Linie die Symptome und basieren mehrheitlich auf allergenunspezifischen Wirkmechanismen, die teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen assoziiert sind. Derzeit stellt die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) die einzige nicht allein antisymptomatische klinisch erprobte Behandlungsform zur langfristigen Therapie von Typ I-Allergien dar. Dabei werden dem Patienten über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren ansteigende Dosen des spezifischen Allergenextrakts subkutan injiziert oder sublingual verabreicht [Durham *et al.*, 1999]. Durch die SIT werden grundlegende Änderungen im immunologischen Gedächtnis induziert, unter anderem eine starke Zunahme blockierender IgG-Antikörper, das Ausbleiben des saisonalen Anstiegs der spezifischen IgE-Antikörper sowie eine Reduktion der IL-4- und IL-5-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen [Durham *et al.*, 1998].

Das zentrale Ereignis bei einer effektiven SIT ist jedoch eine durch Treg induzierte periphere Toleranz in der Population der allergenspezifischen T-Zellen [Jutel *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2012]. Die SIT hat sich jedoch nur bei einer begrenzten Anzahl von Allergenen als effizient erwiesen und ist deshalb für eine Reihe weiterer Allergene als verbesserungswürdig in Bezug auf die Erfolgchancen, aber auch hinsichtlich der langen Behandlungsdauer und der Nebenwirkungen einzustufen [Greineder, 1996].

Der „Allergen-Genstransfer“, welcher bis dato lediglich in tierexperimentellen Studien evaluiert wurde, stellt eine effektive und ebenfalls allergenspezifisch wirkende Alternative zur SIT dar. Dabei werden somatische Zellen mit Plasmidvektoren transfiziert, welche für ein als Allergen wirkendes Protein kodieren. Einige Studien in verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass eine vor einer Sensibilisierung mit einem Allergen durchgeführte prophylaktische DNA-Vakzinierung zu einer äußerst effektiven Suppression der spezifischen IgE Produktion, welche für die Pathogenese von allergischen Erkrankungen entscheidend ist, führt. Dieser Effekt konnte jedoch nur nach intramuskulärer [Hsu *et al.*, 1996; Toda *et al.*, 2000, 2002; Maecker *et al.*, 2001; Adel-Patient *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2001] und intradermaler [Raz *et al.*, 1996; Jilek *et al.*, 2001; Hochreiter *et al.*, 2003] Inokulation erzielt werden. Die prophylaktische DNA-Immunsierung mit Hilfe der Genpistole als Form der Allergithherapie zeigte bisher nur Teilerfolge.

Toda *et al.* [2000] verglichen die Effizienz der intramuskulären und der biolistischen Applikation von Cry j 1-kodierenden Plasmiden als Allergieprophylaxe in einem Mausmodell der allergischen Reaktion auf Pollen der *Cryptomeria japonica*. Die intramuskuläre Injektion von Cry j 1 induzierte in den Versuchstieren eine Th1-gerichtete Immunantwort. In diesen Mäusen war die durch die anschließende Sensibilisierung mit Cry j 1-Protein hervorgerufene IgE-Produktion verglichen mit der IgE-Produktion in unvakzinierten, aber sensibilisierten Tieren inhibiert. Dagegen wurde durch die biolistische Applikation von Cry j 1 auf zellulärer Ebene eine gemischte Th1-/Th2-Immunantwort in den Mäusen hervorgerufen, die sich durch eine gemischte Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen (IFN- γ , IL-4) auszeichnete. Auf humoraler Ebene war eine starke Produktion von antigenspezifischen IgG1-Antikörpern nachweisbar, was typisch für eine Th2-gerichtete Immunantwort ist. Diese Th2-gerichtete Immunantwort wurde durch die anschließende Sensibilisierung

mit Cry j 1 Protein noch verstärkt und es kam zu einer starken Cry j 1-spezifischen IgE-Produktion [Toda *et al.*, 2000].

Scheiblhofer *et al.* [2006] analysierten die Effekte einer präventiven DNA-Vakzinierung im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung anhand der klinisch relevanten Allergene Bet v 1 (Birkenpollenallergen) und Phl p 5 (Gräserpollenallergen). Sie applizierten den Versuchsmäusen zunächst die allergenkodierenden Plasmide bzw. zur Kontrolle den Leervektor mittels Genpistole und sensibilisierten und provozierten die Tiere anschließend mit dem relevanten Protein. Die Sensibilisierung induzierte sowohl in den unvakzinierten bzw. in den mit dem Leervektor vakzinierten Kontrolltieren als auch in den vakzinierten Tieren eine starke IgE-Produktion. Auch der durch die intranasale Provokation induzierte Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge konnte durch die DNA-Vakzinierung nicht inhibiert werden.

Bei Alvarez *et al.* [2005] führte eine biolistische DNA-Immunsierung mit Ovalbumin (OVA) kodierender Plasmid-DNA zu einer allergenspezifischen Sensibilisierung und induzierte sowohl in der Haut nach lokaler Provokation mit dem Allergen als auch in der Lunge eine Th2-Antwort, die durch die Produktion von spezifischen IgE- und IgG1-Antikörpern und durch die Sekretion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 sowie IL-10 und IL-13 durch T-Zellen charakterisiert war.

In den Versuchen von Toda *et al.* [2000], Scheiblhofer *et al.* [2006] und Alvarez *et al.* [2005] konnten also mit der DNA-Immunsierung mittels Genpistole keine immunmodulatorischen Effekte erzielt werden, die einer allergischen Immunantwort entgegen wirkten.

Andere Studien belegen jedoch, dass eine prophylaktische Applikation von allergenkodierenden Plasmiden sehr wohl die durch eine nachfolgende Sensibilisierung induzierte IgE-Produktion inhibieren kann. So konnten Ludwig-Portugall *et al.* [2004] in murinen Sensibilisierungsmodellen die IgE-Produktion durch präventive DNA-Vakzinierung mit dem Modellallergen β Gal effektiv inhibieren. Des Weiteren wurde sowohl eine potente Rekrutierung IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Zellen als auch die Umorientierung der allergenspezifischen Th2-Immunreaktion in eine gemischte Th1/Th2-Antwort beobachtet.

Sudowe *et al.* [2003] verglichen die biolistische DNA-Immunsierung mit β Gal-kodierenden Plasmiden, deren Expression zum einen von dem ubiquitär aktiven CMV-Promotor und zum anderen vom Fascin-Promotor kontrolliert wurde. Während eine biolistische Applikation von pCMV- β Gal zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort

fürte, kam es nach einer Immunisierung mit pFascin- β Gal zu einer von Th1-Zellen beherrschten Immunantwort. Die Verwendung des Fascin-Promotors in den Vektoren ermöglicht eine auf DCs fokussierte Transgenexpression. Aufgrund der aus der Limitierung der Transgenexpression auf DC resultierenden Reduktion des potenziell freigesetzten Antigens wird das Risiko unerwünschter Immunreaktionen wie zum Beispiel anaphylaktischer Reaktionen minimiert [Sudowe *et al.*, 2006].

Über eine erfolgreiche therapeutische Anwendung der DNA-Vakzinierung im Tiermodell existieren im Gegensatz zur protektiven Form des Allergen-Gentransfers nur wenige Berichte [Raz *et al.*, 1996; Maecker *et al.*, 2001; Sudowe *et al.*, 2006; Hochreiter *et al.*, 2003]. Sudowe *et al.* [2006] konnten beispielsweise einen bestehenden IgE-Titer im Serum sensibilisierter Mäuse nicht senken, sondern lediglich eine weitere Steigerung der IgE-Produktion verhindern. Außerdem war der Effekt nur transient.

Dies deutet darauf hin, dass die durch den Allergen-Gentransfer induzierten immunologischen Veränderungen, insbesondere die Induktion einer Th1-Immunantwort, nicht effizient genug sind, um eine persistierende Th2-Immunantwort, wie sie auch in Allergie-Patienten vorliegt, zu modulieren. Außerdem konnten Randolph *et al.* [1999] durch den Transfer von allergen-spezifischen Th1-Zellen im Mausmodell des allergischen Asthmas zeigen, dass eine stark ausgeprägte Th1-Antwort ihrerseits lokale inflammatorische Reaktionen hervorrufen oder unterstützen kann. Auch Zindler *et al.* [2007] konnten durch DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung zwar die Lungeneosinophilie in sensibilisierten und mit β Gal provozierten Tieren inhibieren, im Gegenzug kam es jedoch zu einer starken Neutrophilie. Außerdem reagierten mit DNA immunisierte Mäuse im Test der Atemwegsreaktivität stark auf die Provokation mit Methacholin [Zindler *et al.*, 2007]. Die DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal führte zwar zu einer Inhibition der systemischen und lokalen Th2-Immunantwort, die im Gegenzug auftretenden immunologischen Veränderungen, wie die Induktion von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, Th1-Effektorzellen und der Neutrophileninflux in die Lunge trugen jedoch zu lokalen immunpathologischen Effekten wie einer starken AHR bei.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit an einer neuen DNA-Immunisierungsstrategie gearbeitet, in deren Mittelpunkt im Unterschied zu den bisher verfolgten Ansätzen primär die Induktion einer allergenspezifischen Toleranz

stehen sollte und nicht eine Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen präferenziell in Th1-Zellen.

Dazu wurden Plasmidvektoren konstruiert, die sowohl für das Modellallergen als auch für das immunmodulatorische Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) kodieren. IDO ist das erste und limitierende Enzym des Tryptophan-Katabolismus [Stone und Darlington, 2002]. Es katalysiert die oxidative Spaltung des Indolrings von Tryptophan und startet so den Abbau dieser essentiellen Aminosäure zu verschiedenen neuroaktiven und immunmodulatorischen Molekülen, den sogenannten Kynureninen [Frumento *et al.*, 2002, Grohmann *et al.*, 2003]. IDO-exprimierende DCs können T-Zellantworten auf verschiedene Weise supprimieren. Einerseits führt der Tryptophanmangel im Mikromillieu einer IDO-produzierenden Zelle zur Suppression der Proliferation von T-Zellen [Frumento *et al.*, 2001], andererseits induzieren die Kynurenin-Derivate die Apoptose insbesondere auch von aktivierten T-Zellen [Fallarino *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002]. Es ist unklar, ob Kynurenine direkt toxisch wirken oder den Zelltod über Rezeptoren vermitteln [Mellor und Munn, 2004]. Außer T-Zellen sind auch B-Zellen und NK-Zellen, nicht aber DCs, von der durch den Tryptophanmangel und die Akkumulation der Kynurenine induzierten Apoptose betroffen [Terness *et al.*, 2002].

Auch bei einer effizienten SIT scheint IDO eine entscheidende Rolle zu spielen: so konnte gezeigt werden, dass die allergenspezifische Toleranzinduktion während der SIT teilweise durch eine IDO Aktivierung vermittelt wird [Moingeon *et al.*, 2006; Taher *et al.*, 2008]. Dabei scheinen eher die Tryptophan Metabolite als der Tryptophanmangel an sich für die Entwicklung der Toleranz gegen das Allergen verantwortlich zu sein [Moingeon *et al.*, 2006]. Moingeon *et al.* zeigten 2006, dass während der SIT oral zugegebenes Tryptophan die Effizienz der Therapie nicht inhibiert. Die Kombination aus Tryptophanmangel und Anreicherung der Tryptophan Metabolite kann *in vitro* naive CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen transformieren [Fallarino *et al.*, 2006; 2011]. Darüber hinaus haben sich Hinweise verdichtet, dass die IDO-Expression von DC auch *in vivo* mit der Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) korreliert [Park *et al.*, 2008]. Die IDO-vermittelte Induktion von Treg wird auch durch Untersuchungen, in denen das Enzym gezielt überexprimiert wurde, unterstützt [Yu *et al.*, 2008]. Allerdings ist der detaillierte Mechanismus der Expansion oder Aktivierung von Treg durch IDO nicht bekannt.

Zum Zwecke der DNA-Vakzinierung mit dem Ziel der Modulierung von allergenspezifischen Immunantworten wurden in dieser Arbeit zunächst verschiedene

Expressionsplasmide, dieIDO und/oder das Modellallergen Ovalbumin (OVA) kodieren, kloniert. Die gleichzeitige und effiziente Expression der beiden Transgene in derselben Zelle sollte durch das Einfügen einer ribosomalen Eintrittssequenz (IRES) zwischen die Leserahmen der Transgene gewährleistet werden. Daher wurden zunächst Plasmide hergestellt, die unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors bzw. des DC-spezifischen Fascin-Promotors entwederIDO alleine oder sowohlIDO als auch das Antigen OVA – verbunden durch die IRES-Sequenz-kodieren. Zunächst wurde OVA – sowohl in sezernierender Form (sOVA) als auch in zytosolischer Form (cOVA) - als Modellallergen verwendet, da eine Reihe von OVA-spezifischen Reagenzien und Zelllinien sowie OVA-TCR-transgene Mäuse (OT-I, OT-II) zur Verfügung standen, die eine detaillierte Analyse der Mechanismen der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort erlauben würden. Die erfolgreiche Klonierung der Plasmide wurde mittels Restriktionsanalysen überprüft (Daten nicht gezeigt). Um die Funktionalität der Expressionsplasmide zu verifizieren, wurde zunächst die Fascin-positive Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 *in vitro* mit diesen Konstrukten transfiziert, da sich die eigentlichen Zielzellen, nämlich murine DC, *in vitro* nicht mit ausreichender Effizienz transfizieren lassen. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität derIDO durch die Messung des Tryptophanabbaus bzw. der Kynureninanreicherung im Zellkulturmedium mittels HPLC bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität derIDO nach Transfektion von NIH-3T3-Zellen mit Plasmidkonstrukten, bei denen die Transgenexpression vom Fascin-Promotor kontrolliert wird, nach 48 Stunden deutlich schwächer ausfällt als nach Transfektion mit Konstrukten, dieIDO unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodieren. Das Phänomen, dass gewebespezifische Promotoren im Vergleich zu ubiquitär aktiven, viralen Plasmidpromotoren zu geringerer Proteinexpression führen, wurde auch von anderen Autoren beschrieben. So verglichen Vandermeulen *et al.* [2009] die zwei ubiquitären Promotoren CMV und CAG mit drei gewebsspezifischen Promotoren. Der Keratin 14 Promoter beschränkt die Genexpression auf die Keratinozyten der Epidermis, der CD11c Promotor auf DC und der Fascin-Promotor auf reife DC. Die Verwendung von Plasmiden mit den gewebsspezifischen Promotoren resultierte in einer signifikanten, aber sehr geringen Proteinexpression verglichen mit der Expression unter Verwendung der ubiquitären Promotoren [Vandermeulen *et al.*, 2009].

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Experimente beobachtet werden, dass die Metabolisierung von Tryptophan durch transfizierte NIH-3T3-Zellen bei Verwendung

der IDO/IRES/OVA-Konstrukte sehr viel weniger effizient war als nach Transfektion mit den ausschließlich IDO kodierenden Vektoren (Abb. 3.1.24). Dies impliziert, dass Gene, die durch eine IRES verbunden sind, schlechter exprimiert werden als Gene, deren Expression durch einen eigenen Promotor gesteuert werden. Dieses wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben. So warnen Ngoi *et al.* [2004], dass bei der Verwendung der IRES die Expression des downstream Genes signifikant geringer ausfällt als die des upstream Genes.

Auf der Grundlage dieser Daten wurde die ursprünglich geplante Strategie für die Immunisierungsstudien, in denen mit Hilfe der IRES sowohl die IDO als auch das Antigen auf ein und demselben Plasmid unter der Kontrolle des Fascin-Promotors kodiert und damit spezifisch in DC zur Expression gebracht werden sollten, revidiert. Um dennoch zu erreichen, dass *in vivo* beide Proteine zeitgleich von derselben DC produziert werden können, wurden den Versuchstieren zwei verschiedene Plasmide, die jeweils die IDO bzw. das Antigen kodieren, auf den gleichen Goldpartikeln mit Hilfe der Genpistole appliziert.

In einer ersten Überprüfung der Funktionalität der IDO-Expressionplasmide *in vivo* wurden daher lediglich Plasmide getestet, die alleine IDO unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors bzw. des DC-spezifischen Fascin-Promotors kodieren. Dazu wurden den Mäusen die entsprechenden Expressionsplasmide auf fünf nicht überlappende Stellen der rasierten Bauchhaut mit Hilfe der Genpistole appliziert. Dabei dringen die Goldpartikel in die Epidermis und die Dermis ein und befördern die Expressionsplasmide direkt in das Zytoplasma und bestenfalls in den Nukleus der Hautzellen (Keratinocyten, Langerhanszellen und dermale DC). Da das IDO-Gen im Konstrukt pCMV-IDO unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors kodiert wird, konnten alle erfolgreich transfizierten Zellen in der Haut IDO exprimieren. Im Gegensatz dazu sollten nach der biologischen Transfektion mit pFascin-IDO nur die aktivierten Langerhanszellen und dermalen DC in der Lage sein IDO zu produzieren. In beiden Fällen jedoch migrieren in der Haut transfizierte und dadurch aktivierte, mature DC in die drainierenden Lymphknoten. Obwohl die erfolgreich transfizierten DC in den Lymphknoten nur einen relativ geringen Anteil an der Gesamtpopulation der DC darstellen [Porgador *et al.*, 1998], wurde in entsprechenden Präparationen CD11c⁺ DC, die aus den Lymphknoten der mit pCMV-IDO transfizierten Mäuse isoliert wurden, mittels quantitativer RealTime-PCR eine signifikant stärkere IDO-mRNA-Expression im Vergleich zu den CD11c⁺ DC aus mit einem Kontrollvektor (pCMV-EGFP) transfizierten Mäusen gemessen (Abb.

3.1.25). Die IDO-mRNA-Expression in CD11c⁺ DCs aus mit pFascin-IDO transfizierten Mäusen war ebenfalls signifikant erhöht, allerdings in geringerem Ausmaß als nach Transfektion mit pCMV-IDO. Somit konnte nachgewiesen werden, dass auch *in vivo* das IDO-Transgen nach biolistischer Transfektion mit den Expressionsplasmiden pCMV-IDO und pFascin-IDO in DC exprimiert wird. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass das Gen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors stärker exprimiert wird als unter der Kontrolle des DC-spezifischen Fascin-Promotors. Das Phänomen, dass gewebespezifische Promotoren im Vergleich zu ubiquitären Plasmidpromotoren zu geringerer Proteinexpression führen, wurde zuvor ebenfalls bei den *in vitro* Experimenten beobachtet und wie erwähnt bereits von Vandermeulen *et al.* [2009] beschrieben.

Als nächstes wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Koexpression von IDO auf die systemische Immunantwort untersucht, welche durch biolistische Transfektion mit einem antigenkodierenden Vektor induziert wird. Als Antigen fungierte in diesen Experimenten das Modellantigen β -Galaktosidase (β Gal) anstelle des ursprünglich geplanten OVA, da in der Klinischen Forschergruppe Allergie aufgrund intensiver vorausgegangener Studien zur DNA-Immunisierung umfangreiche Erfahrungen hinsichtlich der immunologischen Eigenschaften sowohl der systemischen als auch der lokalen Antigen-spezifischen Immunantworten mit β Gal als Antigen vorlagen [Sudowe *et al.*, 2002, 2006, 2009; Ross *et al.*, 2003; Zindler *et al.*, 2008; Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. So war eine verlässliche Evaluierung der beobachteten Effekte möglich, ohne dass eine zeitaufwendige umfangreiche funktionelle Überprüfung der OVA-Plasmide sowie eine Charakterisierung der Immunantwort, die nach biolistischer Transfektion mit diesen Vektoren ausgelöst worden wäre, nötig war.

In den durchgeführten Studien wurden die Versuchstiere daher dreimal im Wochenabstand mit einem Plasmid biolistisch vakziniert, welches β Gal unter der Kontrolle des CMV- bzw. des Fascin-Promotors kodiert. Gleichzeitig wurde auf demselben Goldpartikel ein Plasmid koappliziert, welches IDO unter der Kontrolle des CMV- bzw. des Fascin-Promotors kodiert. Als Kontrolle wurde ein Vektor koappliziert, der das Protein EGFP unter dem Einfluss des Fascin-Promotors kodiert und der einen möglichen Einfluss der erhöhten Beladung der Goldpartikel mit Plasmid-DNA auf die Induktion der β Gal-spezifischen Immunantwort evaluieren sollte. Die biolistische Vakzinierung mit den β Gal-kodierenden Plasmiden induziert,

wie bereits von Sudowe *et al.* beschrieben [2003, 2009], sowohl die Produktion von Antikörpern als auch eine potente zelluläre Immunantwort. Die spezifische humorale Immunantwort nach Immunisierung mit pFascin- β Gal bzw. pCMV- β Gal unterscheidet sich jedoch sowohl qualitativ als auch quantitativ. Während die Vakzinierung mit pFascin- β Gal zu einer vorherrschenden Produktion von IgG2a durch antigenspezifische B-Zellen führt, werden nach Immunisierung mit pCMV- β Gal sowohl IgG2a- als auch IgG1- Antikörper produziert [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009]. Diese charakteristischen Isotypenprofile ändern sich durch die Koapplikation des Kontrollvektors pFascin-EGFP nicht (Abb. 3.1.27). Die Koapplikation vonIDO unter der Kontrolle des Fascin-Promotors führte zu keiner signifikanten Änderung der Antikörpertiter (Abb. 3.1.27). Die Koapplikation vonIDO kodierenden Plasmidvektoren unter der Kontrolle des CMV-Promotors hingegen führten zu einer signifikanten Reduktion sowohl der IgG1- als auch der IgG2a-Titer in den Seren der mit pFascin- β Gal immunisierten Tiere (Abb. 3.1.27 A). Interessanterweise tritt der inhibitorische Effekt der Koapplikation von pCMV-IDO auf die Immunglobulinsynthese nicht auf, wenn das Antigen β Gal unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht (Abb. 3.1.27 B). Diese Beobachtung bestätigt die Arbeitshypothese, dass eine erfolgreiche Modulation der antigenspezifischen Immunantwort durch die Produktion vonIDO zwingend die Fokussierung der Antigenexpression auf direkt transfizierte DC unter Verwendung des Fascin-Promotors erfordert. Eine ausgedehnte Antigenexpression in der Haut infolge der biolistischen Transfektion mit dem ubiquitär aktiven CMV-Promotor [Ludwig-Portugall *et al.*, 2004] verhindert die supprimierende Wirkung einer Koapplikation des IDO-kodierenden Vektors.

Der Einfluss der Kotransfektion mit den IDO-kodierenden Plasmiden auf die Aktivierung und Art der Differenzierung von Transgen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vivo* wurde durch Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen mit β Gal-Protein untersucht. Die Analyse der Zytokinproduktion ergab, dass die DNA-Immunisierung mit pFascin- β Gal zusammen mit pFascin-EGFP durch eine Dominanz von IFN- γ produzierenden Th1-Zellen charakterisiert ist, was den zuvor publizierten Daten bei alleiniger DNA-Immunisierung mit pFascin- β Gal entspricht [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009]. IL-5 wurde dagegen nur in geringem Ausmaß produziert. Während das Ausmaß der IFN- γ -Produktion durch Koexpression von IDO unter Kontrolle des Fascin-Promotors nicht beeinflusst wird, wurde nach Koapplikation des Vektors pCMV-IDO eine signifikante Reduktion der IFN- γ -Sekretion sowohl in Milzzell- als auch in Lymphknotenzellkulturen festgestellt (Abb. 3.1.28 und 3.1.29). Die Analyse

der Zytokinproduktion nach Immunisierung mit pCMV- β Gal zusammen mit pFascin-EGFP ergab eine etwas erhöhte antigenspezifische Produktion des Th2-Zytokins IL-5 vor allem durch die Lymphknotenzellen, gleichzeitig wurde jedoch auch eine erhebliche IFN- γ Produktion durch restimulierte Milz- und Lymphknotenzellen gemessen (Abb. 3.1.28 und 3.1.29). Die Koapplikation der Konstrukte pFascin-IDO bzw. pCMV-IDO zusammen mit pCMV- β Gal führte im Wesentlichen zu keiner signifikant verringerten IFN- γ Produktion durch die restimulierten Milz- und Lymphknotenzellen. Dies stimmt mit den Daten zur Antikörperproduktion überein, wonach ein inhibitorischer Effekt auf die Immunantwort nach biolistischer Transfektion mit β Gal kodierenden Plasmiden durch die Koapplikation der IDO-Konstrukte lediglich auftritt, wenn die Produktion des Antigens β Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors steht.

In ähnlicher Weise wie die Induktion der CD4⁺ T-Zellantwort wird auch die Rekrutierung β Gal-spezifischer IFN- γ produzierender CD8⁺ Effektor-T-Zellen nach biolistischer Transfektion mit β Gal-kodierenden Plasmiden durch die gleichzeitige Produktion von IDO beeinflusst. Lediglich nach Koapplikation des antigenkodierenden Vektors pFascin- β Gal mit pCMV-IDO ergibt sich eine signifikante Reduktion der Anzahl der durch eine DNA-Immunisierung generierten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.1.30).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein inhibitorischer Einfluss der Koapplikation der IDO auf die transgenspezifische Immunantwort nur dann zu erkennen war, wenn erstens das Transgen β Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors exklusiv in den DC exprimiert wurde und zweitens die IDO unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde. Die Daten zu dem ersten Punkt können wie in Abbildung 4.1 dargestellt interpretiert werden [mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Sudowe]. Wird das Antigen β Gal unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (Abb. 4.1A), so besteht die Möglichkeit, dass DC, die nach der biolistischen Immunisierung nicht mit Plasmid-DNA transfiziert sind, von transfizierten Keratinozyten oder anderen Hautzellen produziertes und freigesetztes Antigen aufnehmen und dieses prozessieren. Nach ihrer Migration in die drainierenden Lymphknoten präsentieren diese DC das prozessierte Protein antigenspezifischen T-Zellen, was deren Stimulation und Differenzierung in Effektor-T-Zellen bewirkt (Abb. 4.1 A). Im Gegensatz dazu präsentieren nach Immunisierung

mit dem pFascin-Vektor nur solche DC das Antigen, die direkt transfiziert wurden und somit zur gleichen Zeit auchIDO produzieren und sezernieren. Unter dem Einfluss derIDO werden die mit solchen DC interagierenden T-Zellen nicht aktiviert, sondern gehemmt, was insgesamt zu einer Inhibition der antigenspezifischen Immunantwort führt (Abb. 4.1 B).

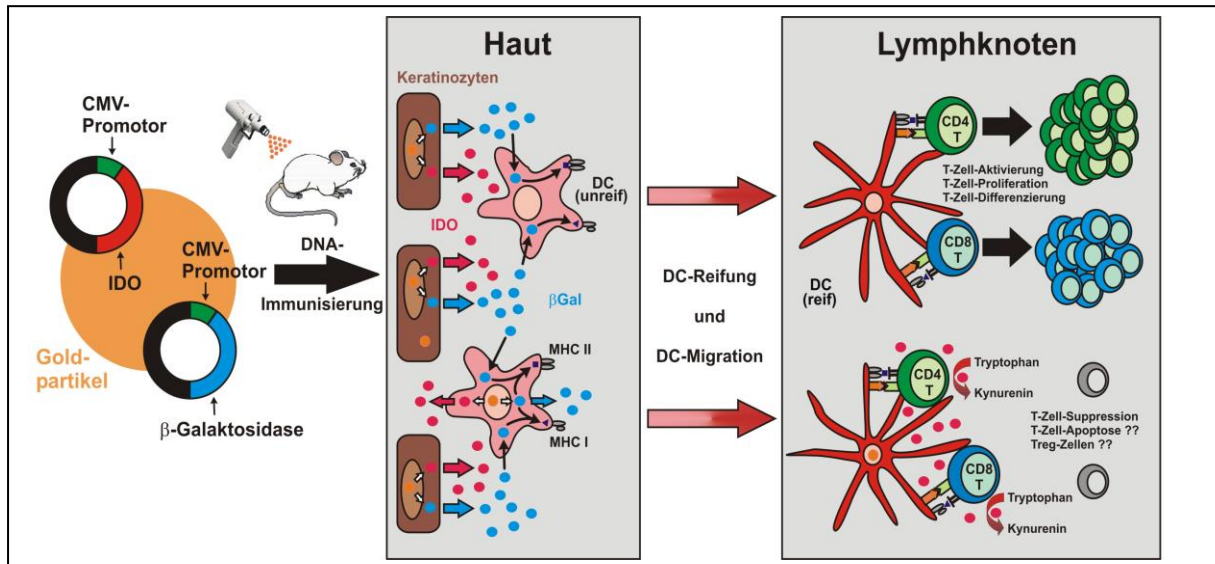


Abb. 4.1 A: Modell zur Wirkungsweise der DNA-Immunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden bei ubiquitärer Antigenexpression unter der Kontrolle des CMV-Promotors [von PD Dr. Sudowe]

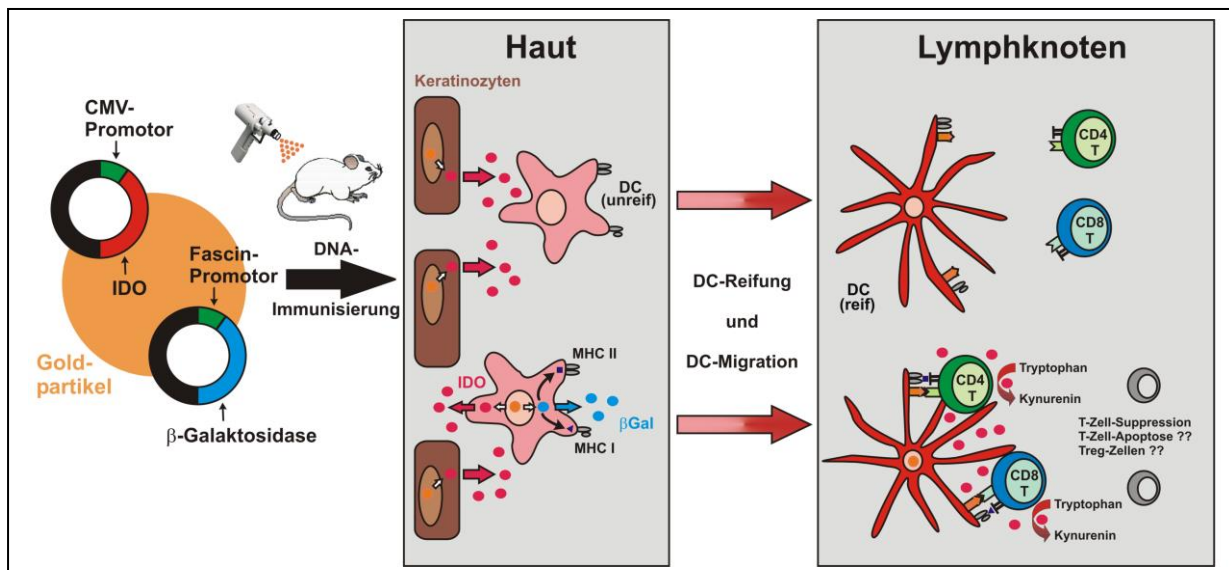


Abb. 4.1 B: Modell zur Wirkungsweise der DNA-Immunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden bei DC-fokussierter Antigenexpression unter der Kontrolle des Fascin-Promotors [von PD Dr. Sudowe]

Die Beobachtung, dass eine Suppression der antigenspezifischen T-Zellen nur gelingt, wenn dieIDO unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors exprimiert wird und dieIDO-Produktion nicht alleine auf DC fokussiert ist, lässt zwei Deutungen zu. Die erste Möglichkeit besagt, dass eine massiveIDO-Produktion in

der Haut, infolge der biolistischen Transfektion mit pCMV-IDO zu den beschriebenen suppressiven Effekten im Rahmen der T-Zell-Aktivierung in den Lymphknoten führt, unabhängig von einerIDO-Produktion durch die direkt transfizierten und das Antigen präsentierenden DC. Diese Interpretation erscheint jedoch unwahrscheinlich, da ansonsten ebenfalls ein inhibitorischer Effekt nach Immunisierung mit pCMV-βGal und der Koapplikation von pCMV-IDO hätte auftreten müssen. Daher ist eine zweite alternative Erklärungsmöglichkeit wahrscheinlicher, wonach die Expressionsstärke des Fascin-Promotors in den mit den T-Zellen interagierenden DC im Vergleich zu der des CMV-Promotors geringer ist, und somit nach Koapplikation von pFascin-IDO lokal nicht ausreichend IDO produziert wird, um eine Inhibition der T-Zellen herbeizuführen. Diese Interpretation wird durch die zuvor erhobenen *in vitro*-Daten unterstützt und wurde, wie bereits erwähnt zuvor von Vandermeulen *et al.* [2009] als ein Phänomen beschrieben, wonach gewebespezifische Promotoren im Vergleich zu ubiquitären Plasmidpromotoren zu geringerer Proteinexpression führen. Außerdem haben die durchgeführten Experimente gezeigt, dass eine vom CMV-Promotor kontrollierte ubiquitäre IDO-Expression in der Haut keine generelle Inhibition von Immunantworten zur Folge hat.

In weiteren Experimenten wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Koapplikation von IDO- und Antigen-kodierenden Plasmiden auf die antigenspezifische Immunantwort im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie untersucht. Da die zuvor erhobenen Daten zeigen, dass eine Inhibition der Immunantwort durch Koapplikation von IDO nur gelingt, wenn das Transgen βGal unter dem Einfluss des Fascin-Promotors exklusiv in DC exprimiert wird, wurde lediglich dieses Plasmid (pFascin-βGal) in Kombination mit den beiden IDO-Konstrukten pFascin-IDO und pCMV-IDO im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie verwendet. In früheren Arbeiten konnten Sudowe *et al.* [2006, 2009] zeigen, dass eine der Sensibilisierung mit βGal-Protein, adsorbiert an das Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum), vorausgegangene repetitive biolistische Vakzinierung mit pFascin-βGal zu einer Inhibition der IgE- und IgG1-Produktion führte, wohingegen die IgG2a-Produktion gesteigert war. Die in dieser Arbeit vorgenommene Koapplikation des Kontrollvektors pFascin-EGFP zusammen mit Fascin-βGal hatte in Bezug auf die humorale Immunantwort keine Änderung der zuvor beschriebenen Beobachtungen zufolge und führte ebenfalls zu einer Inhibition der allergischen Immunantwort. In den früheren Arbeiten wurde statt einer Th2-Antwort eine starke Th1- und CTL-Antwort induziert, die im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung potenziell lokale immunpathologische

Effekte zur Folge haben können [Zindler *et al.*, 2008]. Daher wurde in dieser Arbeit im Modell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie untersucht, ob durch die nach DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal ausgelöste antigenspezifische Immunantwort bei Koapplikation derIDO-kodierenden Vektoren neben der Suppression der IgE- und IgG1-Produktion auch eine Inhibition der Th1-Antwort, angezeigt durch eine verminderte IgG2a-Produktion, erreicht werden kann. Tatsächlich blieb die Suppression der IgE- sowie der IgG1-Produktion nach Kotransfektion sowohl mit pFascin-IDO als auch mit pCMV-IDO aufrechterhalten (Abb. 3.1.32). Bemerkenswerterweise fiel der Anstieg der IgG2a-Titer, der nach Koapplikation des Kontrollvektors in den Mäusen in hohem Maße zu verzeichnen war, nach Vakzinierung mit pFascin-IDO und insbesondere pCMV-IDO nur moderat aus (Abb. 3.1.32). Dies ist möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen, dass die humorale Immunantwort, die im Anschluss an die biolistische Transfektion mit den IDO-kodierenden Plasmiden induziert wurde, bereits signifikant schwächer ausfiel (siehe vorigen Abschnitt) und somit auch die Zahl der Gedächtnis-B-Zellen, die potenziell durch die Immunisierung mit dem β Gal-Protein stimuliert werden konnten, geringer war. Die Spekulation, dass *in vivo* durch die DNA-Vakzinierung mit IDO-kodierenden Plasmiden antigenspezifische regulatorische Zellen induziert wurden, stellt eine weitere Interpretationsmöglichkeit dieser Daten dar. Am Ende der Sensibilisierungsphase war die durch die DNA-Immunisierung mit pFascin- β Gal hervorgerufene Aktivierung von IFN- γ produzierenden Th1-Zellen reduziert (Abb. 3.1.33). Interessanterweise war am Ende der Sensibilisierungsphase auch die Zahl der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach Koapplikation von pCMV-IDO inhibiert (Abb. 3.1.34).

Zusammenfassend ließ sich nach prophylaktischer biolistischer Vakzinierung mit pFascin- β Gal und einem IDO-kodierenden Vektor im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie eine Inhibition der durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal bedingten Th1-Immunantwort beobachten. Die Suppression der IgE- und IgG1-Produktion, welche durch Transfektion mit pFascin- β Gal erreicht wurde, konnte durch Kotransfektion mit den IDO-kodierenden Vektoren aufrechterhalten werden.

5. Zusammenfassung

Derzeit stellt die allergenspezifische Immuntherapie die einzige nicht allein antisymptomatische Behandlungsform zur langfristigen Therapie von Typ I-Allergien dar, welche grundlegende Änderungen im immunologischen Geschehen induziert. Sie ist jedoch verbesserungswürdig in Bezug auf Behandlungsdauer, Erfolgchancen und Nebenwirkungen. Daher wurde in dieser Arbeit eine Strategie zur Therapie von Typ I-Allergien entwickelt und evaluiert, welche auf der Inhibition allergenspezifischer T-Zellen durch Dendritische Zellen (DC), die selektiv nach DNA-Immunisierung sowohl das relevante Allergen als auch Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) konstitutiv produzieren, basiert. IDO ist ein Enzym aus dem Tryptophan-Stoffwechsel, dessen Produktion durch DC einen lokalen immunsuppressiven Mechanismus induziert und in verschiedenen Situationen mit der Induktion peripherer Toleranz assoziiert ist. Zunächst wurden Plasmide hergestellt, die entweder IDO alleine oder IDO zusammen mit dem Antigen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV- bzw. des DC-spezifischen Fascin-Promotors kodieren. Die Überprüfung der IDO-Expression durch die monocistronischen Plasmide anhand von Transfektionsexperimenten *in vitro* ergab, dass die IDO-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors sehr viel stärker ausfiel als unter der Kontrolle des Fascin-Promotors. Nach Transfektion mit den bicistronischen Vektoren, in denen die Transgene für das Antigen und IDO durch eine IRES-Sequenz verbunden waren, war die IDO-Expression jedoch insgesamt sehr schwach. Im Rahmen der Überprüfung der Funktionalität der IDO-Expressionplasmide *in vivo* unter Verwendung der Genpistole wurden daher lediglich Plasmide getestet, die alleine IDO unter der Kontrolle des CMV-Promotors bzw. des Fascin-Promotors kodieren. Auch *in vivo* wurde eine stärkere IDO-Expression nach biolistischer Transfektion mit solchen Vektoren beobachtet, in denen der CMV-Promotor zur Expressionskontrolle verwendet wurde. Die Analyse des Einflusses einer Koexpression von IDO auf die durch biolistische Immunisierung mit einem antigenkodierenden Vektor induzierte systemische Immunantwort offenbarte einen inhibitorischen Effekt für den Fall, dass die Antigenproduktion mittels des Fascin-Promotors auf DC fokussiert war und die Expression des koapplizierten IDO-Transgens unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand. In diesem Fall wurde eine Reduktion der antigenspezifischen IgG1- und IgG2a-Produktion, eine verringerte Sekretion von IFN- γ durch restimulierte Milz- und Lymphknotenzellen sowie eine Reduktion der Zahl antigenspezifischer CD8⁺ Effektor-T-Zellen nachgewiesen. Im

Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie wurde weiterhin gezeigt, dass nach prophylaktischer biologischer Vakzinierung unter Verwendung dieser Vektorkombination eine Inhibition der durch die Vakzinierung bedingten antigenspezifischen Th1-Immunantwort ausgelöst wurde. Die Suppression der Th2-Antwort, welche durch Transfektion mit dem Antigenkodierenden Vektor unter Kontrolle des Fascin-Promotors bewirkt wurde, wurde durch Kotransfektion mit denIDO-kodierenden Vektoren aufrecht erhalten.

6. Literatur

Akdis CA und Blaser K. Immunologic mechanisms of specific immunotherapy. *Allergy* 1999;54 Suppl 56:31-2

Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Keramloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 2004;199:1567-1575.

Alvarez D, Harder G, Fattouh R, Sun J, Goncharova S, Stampfli MR, Coyle AJ, Bramson JL, Jordana M. Cutaneous antigen priming via gene gun leads to skin-selective Th2 immune-inflammatory responses. *J Immunol* 2005;174:1664-1674

Badrul A, Chowdhury MD. US Food and Drug Administration. *Meeting of the Pulmonary-Allergy Drugs Advisory Committee* 2009.

Donnelly, JJ., Ulmer, JB., Shiver, JW., and Liu, MA. DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 617-648

Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998;102:157-164.

Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, Till SJ, Hamid QA, Nouri-Aria KT: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341: 468-475.

Fallarino F, Grohmann U. Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance:IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr Med Chem* 2011;18:2215-2221.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069-1077.

Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997;158(5):2278-84.

Frew AJ. Anti-IgE and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91(2):117-8

Fruento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T natural killer cell proliferation induced by indolamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196:459-468.

Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. Lipopolysaccharide induction of indolamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism. *Eur J Immunol* 2001; 31:2313-8.

- Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis C.** Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy* 2012; 2:2
- Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C.** Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*. 2006 Sep;40(1):86-97.
- Fynan, EF., Webster, RG., Fuller, DH., Haynes, RJ., Santoro, JC., and Robinson HL.** DNA Vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Nat. Acad Sci USA* 1993;90: 11478-11482
- Geha RS.** Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* 2003;15(6):603-8.
- Gordon, JR, Li F, Nayyar A, Xiang J, Zhang X.** CD8 α^+ , but not CD8 α^- , dendritic cells tolerize Th2 responses via contact-dependent and -independent mechanisms, and reverse airway hyperresponsiveness, Th2, and eosinophil responses in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2005 175: 1516-1522
- Greineder DK.** Risk management in allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;98:330-334.
- Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P.** Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trend Immunol* 2003; 24:242-248.
- Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E.** Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2004 114: 270-279.
- Hochreiter R, Stepanoska T, Ferreira F, Valenta R, Vrtala S, Thalhamer J, Hartl A.** Prevention of allergen-specific IgE production and suppression of an established Th2-type response by immunization with DNA encoding hypoallergenic allergen derivatives of Bet v1, the major birch-pollen allergen. *Eur J Immunol* 2003;33:1667-1676.
- Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK, Hsieh KH.** Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med* 1996; 2:540-544.
- Hsu, C.H., K.Y. Chua, M.H. Tao, S.K. Huang, K.H. Hsieh.** Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int. Immunol.* 1996;8:1405-1411.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** Immunology. *Spektrum Lehrbuch*, 5. Auflage, 2002; S.506.
- Jilek S, Barbey C, Spertini F, Corthesy B.** Antigen-independent suppression of the allergic immune response to bee venom phospholipase A₂ by DNA vaccination in CAB/J mice. *J Immunol* 2001; 166:3612-3621.
- Johnson BA., Baban B and Mellor AL.** Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy. *Immunotherapy* 2009; 1(4): 645–661.

Johnson CC, Ownby DR, Zoratti EM, Alford SH, Williams LK, Joseph LM. Environmental epidemiology of pediatric asthma and allergy. *Epidemiol. Rev.* 2002;24:154-175.

Jurel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2003;33:1205-1214.

Lee, D.J., H. Tighe, M. Corr, M. Roman, D.A. Carson, H.L. Spiegelberg, E. Raz. Inhibition of IgE antibody formation by plasmid DNA immunization is mediated by both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997; 113: 227-230.

Lewis DB. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* 2002;14(5):644-51.

Liu X and Wang X. Indolamine 2,3-dioxygenase in tumor induced tolerance. *Clin Med J* 2009;122(24):3072-3077.

Ludwig-Portugall I, Montermann E, Kremer A, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Prevention of long-term IgE antibody production by gene gun-mediated DNA vaccination. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(4):951-7.

Löffler, Petrides: Biochemie & Pathobiochemie. *Springer Verlag*, Heidelberg 2003, 7. Auflage, ISBN 3-540-42295-1 S. 1155 f.

Maecker HT, Hansen G, Walter DM, DeKruyff RH, Levy S, Umetsu DT. Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 2001; 166:959-965.

Mellor AL and Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today* 1999; 20:469-473.

Mellor AL. and Munn DH. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and Tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:762-774.

Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, van Overvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;61:151-165.

Munn DH, Sgarma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indolamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100-4110.

Munn DH, Sharma MD, Lee RJ, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indolamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002;297:1867-70.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-3.

Park MJ, Min S, Park K, Cho Y, Cho M, Jung Y, Park H, Chang S, Cho SG, Min JK, Park SH and Kim H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model. *Arthr Res Ther* 2008;10:R11.

Pertmer TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DH and Haynes JR. Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte response following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 1995; 13: 1427-1430.

Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med.* 1998;21;188(6):1075-82.

Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific TRh1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* 1999;162:2375-2383.

Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. Preferential induction of Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5141-5145.

Reyes-Sandoval A and Ertl HC. DNA Vaccines. *Curr Mol Med* 2001; 1: 217-243.

Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1389-1397.

Ross R, Ross XL, Langin T, Reske-Kunz AB. Maturation of epidermal Langerhans cell: increased expression of beta- and gamma-actin isoforms as a basis of specialized cell functions. *Exp Dermatol* 1999; 8(6):487.

Ross R, Ross X-L, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB. The actinbundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1998;160: 3776.

Ross R, Sudowe S, Beisner J, Ross XL, Ludwig-Portugall I, Steitz J, Tüting T, Knop J, Reske-Kunz AB. Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther* 2003;10(12):1035-40.

Scheibelhofer S, Stoecklinger A, Gruber C, Hauser-Kronberger C, Alinger B, Hammerl P, Thalhamer J, Weiss R. Gene gun immunization with clinically relevant allergens aggravates allergen induced pathology and is contraindicated for allergen immunotherapy. *Mol Immunol* 2007;44(8):1879-87.

Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenes as target for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:609-620

Sudowe S, Dominitzki S, Montermann E, Bros M, Grabbe S, Reske-Kunz AB. Uptake and presentation of exogenous antigen and presentation of endogenously produced antigen by skin dendritic cells represent equivalent pathways for the priming of cellular immune responses following biolistic DNA immunization. *Immunology* 2009;128(1 Suppl):e193-205.

Sudowe S, Ludwig-Portugall I, Montermann E, Ross R, Reske-Kunz AB. Transcriptional targeting of dendritic cells in gene gun-mediated DNA immunization favors the induction of type 1 immune responses. *Mol Ther* 2003(4):567-75.

Sudowe S, Ludwig-Portugall I, Montermann E, Ross R, Reske-Kunz AB. Prophylactic and therapeutic intervention in IgE responses by biolistic DNA vaccination primarily targeting dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(1):196-203.

Tacke PJ, Jolanda I, de Vries M, Torensma R and Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nat Rev Immunol* 2007;7:790-801.

Taher YA, Piavaux BJ, Gras R, van Esch BC, Hofman GA, Bloksma N et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:983-991 e2.

Takashima A and Akimichi M. Dendritic cells in genetic immunization. *J Leuk Biol* 1999;66:350-356.

Tang DC, DeVit M, Johntson SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356; 152-154.

Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002;196: 447-457.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(6):1025-34

Toda M, Sato H, Takebe Y, Taniguchi Y, Saito S, Inouye S, Takemori T. Inhibition of immunoglobulin E response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) in mice by DNA immunization: different outcomes dependent on the plasmid DNA inoculation method. *Immunology* 2000;99:179-186.

Toda M, Kasai M, Hosokawa H, Nakano N, Taniguchi Y, Inouye S, et al. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur J Immunol* 2002;32:1631-1639

Ulmer J.B., Donnelly, JJ., Parker, SE., Rhodes, GH, Felgner, PL., Dwarki V.J., Gromkowski, SH., Deck, RR., De Witt, CM., Friedmann et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 (1993) 1745-1749.

Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trend Mol Med* 2006;12: 216-222

Umetsu DT, DeKruyff RH. Th1 and Th2 CD4+ cells in the pathogenesis of allergic diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215(1):11-20.

Vandermeulen G, Richiardi H, Escriou V, Ni J, Fournier P, Schirrmacher V, Scherman D, Pr at V. Skin-specific promoters for genetic immunisation by DNA electroporation. *Vaccine* 2009;27(32):4272-7.

Von Bubnoff D, Hanau D, Wenzel J, Takikawa O, Hall B, Koch S and Bieber T. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing antigen-presenting cells and peripheral T-cell tolerance: Another piece to the atopic puzzle? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 5:845-860

Von Bubnoff, D., R. Fimmers, M. Bogdanow, H. Matz, S. Koch, T. Bieber. Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1056-1063

Wichers MC, Maes M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon- α -induced depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29: 11-17

Wills-Karp M. Interleukin-12 as a target for modulation of the inflammatory response in asthma. *Allergy* 1998;53(2):113-9

Yu G, Dai H, Chen L, Gong M, Liu L, Xiong P, Wang CY, Fang M, Gong F. Gene delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase prolongs cardiac allograft survival by shaping the types of T-cell responses. *J Gene Med* 2008;10:754-761.

Yu G, Fang M, Gong M, Liu L, Zhong J, Feng W, Xiong P, Wang CY, Gong F. Steady state dendritic cells with forced IDO expression induce skin allograft tolerance by upregulation of regulatory T cells. *Transplant Immunol* 2008;18:208-219.

Zindler E, Gehrke N, Luft C, Reuter S, Taube C, Finotto S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Divergent effects of biolistic gene transfer in a mouse model of allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(1):38-46.

Sudowe S, Montermann E, Steitz J, T ting T, Knop J, Reske-Kunz AB. Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy. *Gene Ther.* 2002;9: 147-156.

Zhu BT. Development of selective immune tolerance towards the allogenic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites. *Int J Mol Med.* 2010; 25:831-835.

D. Anhang

1. Sequenzen der für die Klonierungen verwendeten Gene

1.1. Fascinpromotor

Accession: AJ318756

2685 bp DNA

Definition: Mus musculus Fscn1 gene, promoter

Autor: Ross, R.;

Titel: Preferential induction of cellular immunity by DNA vaccination focussed on dendritic cells

```

1 ggatccagcg ctttcgcttg cttgagacat ctcgttgact agctcctccg ttgttaacac
61 aggggtctcac tatgtaggtc cagttatctt ggaatttgcct ctgtagacca ggccggcacc
121 aaactcagag atagacctgc ctttgccttc agagtactgg gattaaaggt gtgcaccact
181 accacccagt ttaaaattct aaaaagattt gtgggtgcag ggatttgagg aggccaggag
241 agactggttg atctctggga actggagtta gaggtggttg tgagcccca cgggtgctga
301 gaactgaact aggggtgctg agaggagctc gctcactgct gagccccacc ttagatttga
361 gtcctctgta ctgaagctga gttcagtgat ttgactgagc cgaccgctca ggggtggcct
421 ttcgatgtgc accacagccc tgctttata ggtgaggtca tgcttgcaca actggccttt
481 cttttgcatt tacgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtacatg aagtgagagg gggcagtatg
541 ggaagggtca gtggacaact taagggagtt gggtttgctt tccatcatga tggcttagag
601 actaaattca gccctcagc cggggagcgt gcctttacc tccgagctcc cagctttggg
661 tttttgaggc aaggtttcat atagcttagg ctggcctggc attcaaggtc atctcagagg
721 cctaggatga ccttgtgttg toggttctcc ggcctttacc tctggtgtgc tggcgtttgc
781 cttaccacac ccaggcatcc cccatagctt aagcctaaag ctctcggatg gccagcacgc
841 ccatgccctg acgtgaagtt cagtgactaa tcaatacaga gcgttcacgg agccctgaca
901 catagcagca ttgacttaac cttaacagcc tgggtgtgta tgaggccaac ttgtccgatt
961 ctgccacga tgcgatgctc tgggttaaac aggtttgaa agagtaccgg atggcagggg
1021 gggcaccctc agtatcgggt tttggtctgt actgcttcca gtctcctgac ctgctccctc
1081 aaggctggtc ttaactcaa agcaatctc ctgtccctgc ttctcaagtt ctggaattac
1141 aagtgtgact cactgtaccc aggaatatgt gtctttatta cagaggaagg agagctcaga
1201 gagtgagagt aacctgtgca aagtcccaca gcaggagagg atggctggct atcggcccg
1261 aacttggtga cctttcctgt gacctotaag ggaggaacta gatgtcccag caaggattct
1321 agggacttgt caggactgac ctttgatgat gggaaagcca tgccatctcc ccttcccctt
1381 tgatggtcgc tggaggggtt tgcctgggac agagatgctg ttggacacag atcaccgtga
1441 agactgggtc gtttcagtac cctgccagc ctgtggctgg gaagggccat gggcccagat
1501 cttgtgggca gcctggggtg gggccagcat tccaggggcc tgctggcat tgggggaatg
1561 tcccaggaga agtctcagtc ctccagaaac tcaaagggaa gtgttcttac gtggggtggt
1621 gtgtggtggg aggtgggagg tgggtttgtt gggaaatgtc ctctggtctg gaaccctgag
1681 gggctgcagt taggaggtag attggggctg tgccattcta gggagctgac ctgcttttct
1741 gatgtcttca taaacagaga ccaactatcc tgcttacct accctgcttc ctggtagacc
1801 agcaccocgg ggcttgagca tcaccacagt agggactttt gtgggccact gacttgggccc
1861 acagttacca caatttattt agagtcagca aggtggctgt actctatgct gaccgggaa
1921 tagaaatctc ggtttctgct caggaggccc aggttacaag gccttgaaa accctgaggc
1981 gggcggggca ggtagggtc tgcattgccc tctctagaaa ttaacctcct ttctaccca
2041 gaccctctg gcgtctctgg cttcttcaag gaccggctct aaggctactt cctggtacac
2101 cctggaccct ccctccatcc tgaagggatc attatcttaa acctggtcct tccatcgac
2161 tgggtttggg ggtaggggtg tttcaggatg gcctcagaga gcaggagaaa gttggagatc
2221 agccaactac tgcagagcac gacttgtgga ggaacagtta aatggactag caaacacgaa
2281 cgggccagag gcagaaggac tgctatgagt tcgagtccag cctgagccac acagatactt
2341 caagcctagt ctgagttaca gagtgaaac cggctttaa cccagaaaa acactccggg
2401 gaagcgcagc ggaccgggag cgcctgac agccccctcc cggcaggcc cgggtagggg
2461 cgtggtccag gtgacgtcat cctcctataa aacctgggc gccgcttgtg tggccttgtg
2521 gagaactgca ggggctaaag cctgtttgaa caaaggaggt cgggcacagc tatccaagct
2581 cccggggcca cggggcggcc ctccgccacc atgaccgcca acggcacggc agaggctgtg
2641 cagattcagt tcgggctcat cagctgcggc aacaagtacc tgaca

```

1.2. IDO

Accession: NM_008324

1555 bp mRNA

Definition: Mus musculus indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase (Indo)

Autoren: Belladonna,M.L., Grohmann,U., Guidetti,P., Volpi,C., Bianchi,R.,

Fioretti,M.C., Schwarcz,R., Fallarino,F. and Puccetti,P;

Titel: Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. J. Immunol. 177 (1), 130-137 (2006)

```

1  gctaaaccct ataagagatg ctgggacatt ccttcagtgg ccaagtgggg ggtcagtgga
61  gtagacagca atggcactca gtaaaatata tcctacagaa ggttctagaa ggatccttga
121 agaccaccac atagatgaag atgtgggctt tgctctacca catccactgg tggagctgcc
181 cgacgcatac agcccctggg tccttgtggc tagaaatctg cctgtgctga ttgagaacgg
241 gcagcttcga gaagaagttg aaaagctgcc cacactgagc acggacggac tgagaggaca
301 caggttacag cgcttggcac acctggccct ggggtacatc accatggcgt atgtgtggaa
361 ccgaggggat gacgatgttc gaaaggtgct gccccgcaat attgctgttc cctactgcga
421 gctctcagag aagttgggccc tgccctctat tctgtcttat gcagactgtg tctctggcaaa
481 ctggaagaaa aaggacccca atgggcccac gacatacgag aacatggaca ttctgttctc
541 atttcctggt ggggactgcg acaagggctt ctctctctgc tctctattgg tggaaatcgc
601 agcttctcct gcaatcaaag caatccccac tgtatccagt gcagtagagc gtcaagacct
661 gaaagcattg gaaaaggcac tgcacgacat agctaccagt ctggagaaaag ccaaggaaat
721 ttttaagagg atgctgact ttgtggaccc agacacgttt ttccacgttc tccgcatata
781 tctgtctggc tggaaatgca gctccaagct gccagaaggt ctgctgtatg aggggtctg
841 ggacacccca aaaatgtttt cagggggcag tgcaggccag agcagcatct tccagagtct
901 tgatgtcctt ctgggaataa aacacgaggc tggcaaagaa tctcctgcag aattcctcca
961 ggaaatgaga gagtacatgc ctccagccca ccggaacttc cttttcttct tagagtcagc
1021 tccccagtc cgtgagtttg tcatttcaag acacaatgaa gacttgacga aagcttataa
1081 cgagtgtgtg aatggtctgg tctctgtgag aaagttccac ctgcgaatag tagatactta
1141 cattatgaaa ccttogaaga agaagcccac tgatggcgac aagtcggaag agccctcaa
1201 tgtggaaagc agagggactg ggggtacgaa tccatgact ttccaaagga gtgtgaaaga
1261 tacaaccgag aaagctcttc tgagttggcc ttagtgtagc aagctccact tctatcaggg
1321 cacagaaaac accttcatcc tgcatagct cattaatca gatccaccaa gtaagactat
1381 agaataatth gcctgttgta tattatgtag atttcaaaaa tcatctgtgc attcctgtg
1441 ggaaaataat caagctgaac tatttaatga tattaaaatg atataagaaa taatataaaa
1501 tatatthtat attgaaatac aacaatgaga cccagtaaat aaaagttatt gtgaa

```

1.3. IRES

```

TGCAGGTCGAGCATGCATCTAGGGCGGCCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAG
CCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTGATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAG
GGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGG
TCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCGTAGCGACCCCTTTG
CAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTTATAAGATACACCTGCAAA
GGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATT
CAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTT
TACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTTCCCTTTGAAAAAC
ACGATGATAAGCTTGCCACAACCCGG

```

1.4. OVA

Accession: NM_205152

1873 bp mRNA

Definition: Gallus gallus ovalbumin (LOC396058)

Autoren: Morshed,M., Sano,S., Nishimiya,D., Ando,M., Nishijima,K. and Iijima,S.

Titel: Chicken ovalbumin promoter is demethylated upon expression in the **regions** specifically involved in estrogen-responsiveness. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70 (6), 1438-1446 (2006)

```

1  gacatacagc tagaaagctg tattgccttt agcactcaag ctcaaagac aactcagagt
61  tcaccatggg ctccatcggc gcagcaagca tggaaatttg ttttgatgta ttcaaggagc
121 tcaaagtcca ccatgccaat gagaacatct tctactgcc cttgccaac atgtcagctc
181 tagccatggg atacctgggt gcaaaagaca gcaccaggac acagataaat aaggttggtc
241 gctttgataa acttccagga ttccggagaca gtattgaagc tcagtgtggc acatctgtaa
301 acgttcactc ttcacttaga gacatcctca accaaatcac caaaccaaat gatgtttatt
361 cgttcagcct tgccagtaga ctttatgctg aagagagata cccaatcctg ccagaatact
421 tgcagtgtgt gaaggaactg tatagaggag gcttggaaac tatcaacttt caaacagctg
481 cagatcaagc cagagagctc atcaattcct gggtagaaag tcagacaaat ggaattatca
541 gaaatgtcct tcagccaagc tccgtggatt ctcaaactgc aatggttctg gttaatgcca
601 ttgtcttcaa aggactgtgg gagaaaacat ttaaggatga agacacacaa gcaatgcctt
661 tcagagtgc tgagcaagaa agcaaacctg tgcagatgat gtaccagatt ggtttattta
721 gaatggcatc aatggcttct gagaaaatga agatcctgga gcttccattt gccagtggga
781 caatgagcat gttggtgctg ttgctgatg aagtctcagg ccttgagcag cttgagagta
841 taatcaactt tgaaaaactg actgaatgga ccagttctaa tgttatggaa gagaggaaga
901 tcaaagtgta cttacctcgc atgaagatgg aggaaaaata caacctcaca tctgtcttaa
961 tggtatggg cattactgac gtgtttagct cttcagccaa tctgtctggc atctcctcag
1021 cagagagcct gaagatatct caagctgtcc atgcagcaca tgcagaaatc aatgaagcag
1081 gcagagaggt ggtaggggtc gcagaggctg gagtggatgc tgcaagcgtc tctgaagaat
1141 ttagggctga ccatccattc ctottctgta tcaagcacat cgcaaccaac gccgttctct
1201 tctttggcag atgtgtttcc ccttaaaaag aagaaagctg aaaaactctg tcccttcaa
1261 caagaccagc agcactgtag tatcaggggt aaaatgaaaa gtatgttctc tgctgcatcc
1321 agacttcata aaagctggag cttaatctag aaaaaaatc agaaagaaat tacactgtga
1381 gaacaggtgc aattcacttt tcctttacac agagtaatac tggtaactca tggatgaagg
1441 cttaggga tgaaattgga ctacagtac tgagtcatca cactgaaaaa tgcaacctga
1501 tacatcagca gaaggtttat gggggaaaaa tgcagccttc caattaagcc agatatctgt
1561 atgaccaagc tgctocagaa ttagtactc aaaaatctct agattaaatt atcaactgtc
1621 accaaccatt cctatgctga caaggcaatt gcttgttctc tgtgttctc atactacaag
1681 gctcttctc acttctctaa gatgcattat aaaaatctta taattcacat ttctccctaa
1741 actttgactc aatcatggta tgttggcaaa tatggtatat tactattcaa attgttttcc
1801 ttgtaccat atgtaatggg tcttgtgaat gtgctctttt gttcctttaa tcataataaa
1861 aacatgttta agc

```

1.5. Beta-galactosidase (in pCMV β)

Accession: UO2451

Definition: Cloning vector pCMVbeta

7164 bp DNA

Autoren: MacGregor, G.R. and Caskey, C.T.

Titel: Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 17 (6), 2365 (1989)

```

1 gaattcgagc ttgcatgcct gcaggtcggt acataactta cggtaaattgg cccgcctggc
61 tgaccgcccc acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg
121 ccaatagggg ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg
181 gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaat acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa
241 tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac
301 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg
361 cgtggatagc ggtttgactc acgggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
421 agtttgTTTT ggcacaaaaa tcaacggggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca
481 ttgacgcaaa tgggcggtag gogtgaacgg tgggagggtct atataagcag agctcgttta
541 gtgaaccgct agatcgctcg gagacgcgat ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac
601 cgggaccgat ccagcctccg gactctagag gatccggtag tcgaggaact gaaaaccagc
661 aaagttaact ggtaagttaa gtctttttgt cttttatttc aggtcccggg tccggtggtg
721 gtgcaaatca aagaactgct cctcagtggg tgttgccctt acttctaggc ctgtacggaa
781 gtgttacttc tgctctaaaa gctgcggaat tgtaccgcgg gccgcaattc cccgggatcg
841 aaagagcctg ctaaagcaaa aaagaagtca ccatgtcgtt tactttgacc aacaagaacg
901 tgattttcgt tgccggtctg ggaggcattg gtctggacac cagcaaggag ctgctcaagc
961 gcgatcccgt cgttttataa cgtcgtgact gggaaaacc tggcgttacc caacttaatc
1021 gccttgagc acatccccct ttccagcagc ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc
1081 gcccttcccc acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg ctttgccctg tttccggcac
1141 cagaagcggg gccggaaagc tggctggagt gcgatcttcc tgaggccgat actgctgctg
1201 tcccctcaaa ctggcagatg cacggttacg atgcgccccat ctacaccaac gtaacctatc
1261 ccattacggt caatccgccc tttgttcccc cggagaatcc gacggggtgt tactcgtcct
1321 cattaatgt tgatgaaagc tggctacagg aaggccagac gcgaattatt tttgatggcg
1381 ttaactcggc gtttcatctg tggtgcaacg ggcgctgggt cggttacggc caggacagtc
1441 gtttgccgtc tgaatttgac ctgagcgcac ttttacgcgc cggagaaaac cgcctcgcgg
1501 tgatggtgct gcgttggagt gaocggcagtt atctggaaga tcaggatatg tggcggatga
1561 gcggcatttt ccgtgacgct tcggttctgc ataaaccgac tacacaaatc agcgaatttc
1621 atgttgccac tcgctttaat gatgatttca gcccgctgtg actggaggct gaagtccaga
1681 tgtgcggcga gttgcgtgac tacctacggg taacagtttc tttatggcag ggtgaaacgc
1741 aggtcgccag cggcaccgcg cctttcggcg gtgaaattat cgatgagcgt ggtggttatg
1801 ccgatcgcgt cacactacgt ctgaaacgtg aaaaccgcaa actgtggagc gccgaaatcc
1861 cgaatctcta tcgtgcggtg gttgaaactg acaccgcccga cggcacgctg attgaaagcag
1921 aagcctgcga tgtcggtttc cgcgaggtgc ggattgaaaa tggctctgctg ctgctgaaacg
1981 gcaagccggt gctgattoga ggcgttaacc gtcaacgagc tcatcctctg catggtcagg
2041 tcatggatga gcagacgatg gtgcaggata tctctgctgat gaagcagaac aactttaacg
2101 ccgtgcgctg ttcgcattat ccgaaccatc cgctgtggta cacgctgtgc gaccgctacg
2161 gcctgtatgt ggtggatgaa gccaatattg aaaccacggc catggtgcca atgaaatcgtc
2221 tgaccgatga tccgcgctgg ctaccggcga tgagcgaacg cgtaacgcga atggtgcagc
2281 gcgatcgtaa tcacccgagt gtgatcatct ggtcgcctggg gaatgaaatca ggccacggcg
2341 ctaatcacga cgcgctgtat cgctggatca aatctgtcga tccttcccgc cccggtgcagt
2401 atgaaggcgg cggagccgac accacggcca ccgatattat ttgcccgatg tacgcgcgcg
2461 tggatgaaga ccagcccttc ccggctgtgc cgaaatggtc catcaaaaaa tggctttcgc
2521 tacctggaga gacgcgcccg ctgatocttt gcgaatacgc ccacgcgatg ggtaacagtc
2581 ttggcggttt cgctaaatac tggcaggcgt ttogtcaagta tccccgttta cagggcggct
2641 tcgcttggga ctgggtggat cagtcgctga ttaaatatga tgaaaacggc aaccctgggt
2701 ccgcttacgg cggtgatttt ggcgatacgc cgaacgatcg ccagttctgt atgaaacgctc
2761 tggcttttgc cgaccgcacg ccgatccag cgctgacgga agcaaaacac cagcagcagt
2821 ttttccagtt ccgtttatcc gggcaaacca tcgaagtgac cagcgaatac ctgttccgctc
2881 atagcgataa cgagctcctg cactggatgg tggcgcctgga tggtaagccg ctggcaagcg
2941 gtgaagtgcc totggatgct gctccacaag gtaaacagtt gattgaaactg cctgaaactac
3001 cgcagccgga gagcgcgggg caactctggc tcacagtacg cgtagtgcaa cccgaacgcga

```

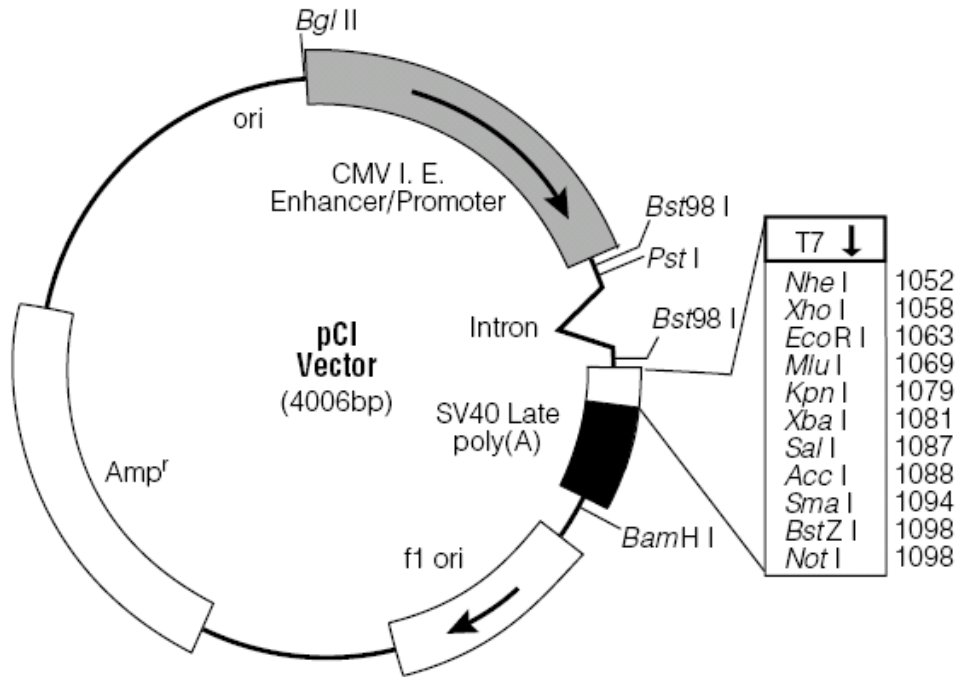
3061 ccgcatggtc agaagccggg cacatcagcg cctggcagca gtggcgctctg gcggaaaacc
 3121 tcagtgtgac gctccccgcc gogtcccacg ccatcccgca tctgaccacc agcgaaaatgg
 3181 atttttgcat cgagctgggt aataagcgtt ggcaatttaa ccgccagtca ggctttcttt
 3241 cacagatgtg gattggcgat aaaaaacaac tgctgacgcc gctgocgat cagttcacc
 3301 gtgcaccgct ggataacgac attggcgtaa gtgaagcgac ccgcatgac cctaagcct
 3361 gggctgaacg ctggaagcgg ggggtgcatt accaggccga agcagcgttg ttgcagtga
 3421 gggcagatac acttgetgat ggggtgctga ttacgaccgc tcacgcgtgg cagcatcagg
 3481 ggaaaacctt atttatcagc cggaaaacct accggattga tggtagtggg caaatggcga
 3541 ttaccgttga tgttgaagtg gcgagcgata caccgcatcc ggcgcggtt ggccgtgaact
 3601 gccagctggc gcaggtagca gagcgggtaa actggctcgg attagggccg caagaaaact
 3661 atcccagacc ccttactgcc gcctgttttg accgctggga tctgccattg tcagacatgt
 3721 ataccccgta cgtcttcccg agogaaaacg gtctgcgctg cgggacgcgc gaattgaatt
 3781 atggcccaca ccagtggcgc ggcgacttcc agttcaacat cagccgctac agtcaacagc
 3841 aactgatgga aaccagccat ccgatctgc tgcacgcgga agaaggcaca tggctgaata
 3901 tcgacggttt ccatatgggg attggtggcg acgactcctg gagcccgtca gtatcggcgg
 3961 aattacagct gagcgcgggt cgctaccatt accagttggg ctggtgtcaa aaataataat
 4021 aaccgggcag gccatgtctg ccogtatttc gcgtaaggaa atccattatg tactatttaa
 4081 aaaacacaaa cttttggatg ttoggtttat tctttttctt ttactttttt atcatgggag
 4141 cctacttccc gtttttcccg atttggctac atgacatcaa ccatatcagc aaaagtgata
 4201 cgggtattat ttttgccgct atttctctgt tctcgtatt attccaaccg ctgtttggtc
 4261 tgctttctga caaactcggc ctogactcta ggcggcgcgc gggatccaga catgataaga
 4321 tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt
 4381 gaaatttgtg atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac
 4441 aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggtttttcgg
 4501 gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt
 4561 cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag
 4621 tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg
 4681 cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg
 4741 gggagagggc gtttgogtat tgggogctct tccgcttcc cgtcactga ctcgtcgcg
 4801 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc
 4861 acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
 4921 aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgttt tccataggg tccgcccccc tgacgagcat
 4981 cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaaccga caggactata aagataccag
 5041 gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga
 5101 tacctgtccg cttttctccc ttogggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg
 5161 tatctcagtt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt
 5221 cagcccagacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac
 5281 gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcag gtatgtaggc
 5341 ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggct aactacggct acactagaag gacagtattt
 5401 ggtatctcgc ctctgtgaa gccagttacc ttoggaaaaa gagtggtag ctctgtatcc
 5461 ggcaacaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc
 5521 agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtg
 5581 aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag
 5641 atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg
 5701 tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg
 5761 tcatccatag ttgcctgact cccogtctgt tagataacta cgatacggga gggcttacca
 5821 tctggcccca gtgctgcaat gataccgoga gaccacgct caccggctcc agatttatca
 5881 gcaataaacc agccagccgg aaggcccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc
 5941 tccatccagt ctattaattg ttgcgggaa gctagagtaa gtagttcggc agttaatagt
 6001 ttgcgcaacg ttgttgccat tgetacagge atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtag
 6061 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc
 6121 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcc atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg
 6181 ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga
 6241 tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga
 6301 ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta
 6361 aaagtgtcctc tcattggaaa acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg
 6421 ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatctcagc atctttact
 6481 ttaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata
 6541 agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctctccttt ttcaatatta ttgaagcatt
 6601 tatcagggtt attgtctcat gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaaca
 6661 ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt
 6721 atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagge cctttcgtct cgcgcgtttc
 6781 ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg

```

6841 taagcggatg cggggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt
6901 cggggctggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg
6961 tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttgccattc
7021 aggctgcgca actggtggga agggcgatcg gtgcgggctt cttcgtattt acgccagctg
7081 gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca
7141 cgacgttgta aaacgacggc cagt

```

2. pCI Vectorkarten



pCI Mammalian Expression Vector sequence reference points.

| | |
|--|-----------|
| Cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region | 1-742 |
| Chimeric intron | 857-989 |
| T7-EEV sequencing primer binding site | 1020-1041 |
| T7 RNA Polymerase Promoter (-17 to +2) | 1034-1052 |
| T7 promoter transcription start site | 1051 |
| Multiple cloning region | 1052-1104 |
| SV40 late polyadenylation signal | 1111-1332 |
| Phage f1 region | 1422-1877 |
| β -lactamase (Amp^r) coding region | 2314-3174 |
| Col/EI-derived origin of replication | 3936 |

E. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| AHR | Atemwegshyperreaktivität |
| Amp | Ampicillin |
| β -Gal | β -Galaktosidase |
| BAL | Bronchioalveoläre Lavage |
| BALF | BAL-Flüssigkeit |
| bio | biotinyliert |
| bp | Basenpaare |
| BZ | B-Zelle |
| bzw. | Beziehungsweise |
| β Gal | β -Galaktosidase |
| cDNA | complementary DNA |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten |
| DC | Dendritische Zelle |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| ELISpot | enzyme linked immunospot assay |
| h | Stunde |
| HPLC | „High pressure liquid chromatography“ |
| IDO | Indolamin-2,3-Dioxygenase |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IMDM | „Iscove´s Modified Dulbecco´s Media“ |
| IRES | internal ribosomal entry sequence |
| kb | Kilobasen |
| LN | Lymphknoten |
| LNC | Lymphknotenzellen |
| MCS | multiple cloning site |
| min | Minute |
| mRNA | messenger RNA |
| OD | optische Dichte |

| | |
|-------|---------------------------------------|
| OPD | Orthonitrophenoldiamin-Dihydrochlorid |
| ORF | open reading frame |
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |
| PCR | polymerase chain reaction |
| Pen | Penizillin |
| Psi | pound per square inches |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RPMI | „Roswell Park Memorial Institute“ |
| SA | Streptavidin |
| SA-PO | Streptavidin-Peroxidase |
| SC | Milzzellen |
| SD | Standardabweichung |
| sec | Sekunde |
| SIT | spezifische Immuntherapie |
| Std. | Stunde |
| Strep | Streptomycin |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| Treg | regulatorische T-Zellen |
| TZ | T-Zelle |
| u.a. | unter anderem |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| z.B. | zum Beispiel |

F. Lebenslauf

