

**Induktion tolerogener dendritischer Zellen
zur Suppression von experimenteller
autoimmuner Enzephalomyelitis und
Kontaktallergie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Timo Castor

geb. am 16.07.1979 in Bad Kreuznach

Mainz, den 17.11.2014

Aus der
Hautklinik
Klinische Forschergruppe Allergie
Universitätsmedizin Mainz

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der Promotion

12.02.2015

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Klinischen Forschergruppe Allergie an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz erarbeitet.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit und sämtliche Ergebnisse selbstständig verfasst und erarbeitet wurden und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Köln, den 17.11.2014

(Timo Castor)

Publikationen

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Castor T, Sudowe S, Grabbe S, Reske-Kunz AB.
„A novel plasmid DNA electroporation method allows transfection of murine DC“ J Immunol Methods. 2009 Mar 31;343(1):13-20. Epub 2009 Jan 30.

Reuter S, Dehzad N, Martin H, Heinz A, Castor T, Sudowe S, Reske-Kunz AB, Stassen M, Buhl R, Taube C.
„Mast cells induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease.“ Int Arch Allergy Immunol. 2010;151(3):214-22. Epub 2009 Sep 29.

Besche V, Wiechmann N, Castor T, Trojandt S, Höhn Y, Kunkel H, Grez M, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.
„Dendritic cells lentivirally engineered to overexpress interleukin-10 inhibit contact hypersensitivity responses, despite their partial activation induced by transduction-associated physical stress.“ J Gene Med. 2010 Mar;12(3):231-43.

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Castor T, Glowacki C, Dang N, Grabbe S, Reske-Kunz AB.
“Murine bone marrow cells differentiated in the presence of GM-CSF and glucocorticoid acquire a phenotype reminiscent of myeloid suppressor cells and exert tolerogenic function.” Manuskript in Vorbereitung

Castor T, Yogev N, Waisman A, Grabbe S, Bros M, Sudowe S, Reske-Kunz AB.
„DNA-based co-expression of IL-10 or TGF- β enhances the protective effect of biolistic DNA vaccination with MOG-encoding plasmids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).“ Manuskript in Vorbereitung

Kongressbeiträge

Bros M, Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Castor T, Bellinghausen I, Saloga J, Grabbe S and Reske-Kunz AB. *In Anwesenheit von Glucocorticoid generierte myeloide dendritische Zellen üben tolerogene Funktion aus.* **20. Mainzer**

Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 07./08. März 2008, Mainz. *Allergo-Journal* 17: 39 (Abstract V12).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic antigen presenting cells. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13. März 2008, Mainz. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 197).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Dendritic cells generated in the presence of glucocorticoid induce regulatory T cells. World Immune Regulation Meeting II, 17. - 20. März 2008, Davos, Schweiz.* Kongressband.

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic murine DC. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 3. - 6. September 2008; Wien, Österreich. Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine* 120 (Suppl. 1): 126 (Abstract P219).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Differentiation of murine myeloid DC progenitors in the presence of glucocorticoid results in the induction of tolerogenic APC. 2nd European Congress of Immunology, 13. - 16. September 2009, Berlin. European Journal of Immunology* 39 (Suppl. 1): 649 (Abstract PA10/16).

Castor T, Yogev N, Waisman A, Grabbe S, Bros M, Sudowe S, Reske-Kunz AB. *DNA-based co-expression of IL-10 or TGF- β enhances the protective effect of biolistic DNA vaccination with MOG-encoding plasmids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Cell Symposia Inflammation and Disease, 26. - 28. September 2010, Lissabon.* Kongressband

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 16 |
| 1.1 Autoimmune neuroinflammatorische Erkrankungen | 16 |
| 1.1.1 Das Krankheitsbild der multiplen Sklerose | 16 |
| 1.1.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)..... | 17 |
| 1.2 Aufgaben und Prinzipien des Immunsystems | 18 |
| 1.3 Die immunologische Toleranz | 21 |
| 1.4 Dendritische Zellen (DC) | 22 |
| 1.4.1 Bedeutung und Funktion von myeloiden DC | 23 |
| 1.4.2 Tolerogene DC und periphere Toleranz | 25 |
| 1.5 T-Zellpopulationen und ihre Bedeutung in ZNS-Autoimmunität | 26 |
| 1.5.1 CD8+ T-Zellen | 26 |
| 1.5.2 CD4+ T-Zellen | 27 |
| 1.5.3 Regulatorische T-Zellen..... | 30 |
| 1.6 Antigen-spezifische Therapie autoaggressiver ZNS-Inflammation | 32 |
| 1.6.1 Toleranzinduktion mittels in vivo DNA-Immunsierung | 32 |
| 1.6.2 Toleranzinduktion durch in vitro tolerogenisierte DC | 36 |
| 1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit | 38 |
| 2. Material und Methoden | 40 |
| 2.1 Material | 40 |
| 2.1.1 Laborgeräte | 40 |
| 2.1.2 Material | 42 |
| 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien..... | 44 |
| 2.1.4 Puffer und Lösungen | 46 |
| 2.1.5 Medien und Medienzusätze | 49 |
| 2.1.6 Molekulargewichtsstandards | 51 |
| 2.1.7 Oligonukleotide | 51 |
| 2.1.8 Vektoren und Plasmide..... | 52 |
| 2.1.9 Enzyme | 53 |
| 2.1.9.1 Allgemeine Enzyme | 53 |
| 2.1.9.2 Restriktionsendonukleasen | 54 |
| 2.1.10 Antikörper | 54 |
| 2.1.10.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen | 54 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.10.2 | Antikörper zur Zellseparation | 56 |
| 2.1.10.3 | Antikörper für ELISA | 57 |
| 2.1.11 | Peptide..... | 58 |
| 2.1.12 | Fertigsysteme | 58 |
| 2.1.13 | Bakterienstamm..... | 58 |
| 2.1.14 | Mausstämme | 59 |
| 2.2 | Molekularbiologische Arbeiten | 59 |
| 2.2.1 | Herstellung elektrokompenter E. coli TOP10-Zellen..... | 59 |
| 2.2.2 | Transformation elektrokompenter E.coli TOP10-Zellen..... | 60 |
| 2.2.3 | Koloniefilterhybridisierung zur Identifizierung rekombinanter Plasmid-DNA in transformierten Klonen | 61 |
| 2.2.4 | Aufreinigung von DNA | 63 |
| 2.2.4.1 | DNA-Isolierung zur Analyse transformierter Klone | 63 |
| 2.2.4.2 | Minipräparation von Plasmid-DNA | 64 |
| 2.2.4.3 | Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen | 65 |
| 2.2.4.4 | Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA | 65 |
| 2.2.4.5 | DNA-Aufreinigung durch Elution aus Agarose-Gelen | 65 |
| 2.2.4.6 | DNA-Aufreinigung nach enzymatischen Reaktionen | 66 |
| 2.2.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 66 |
| 2.2.6 | Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 69 |
| 2.2.7 | Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA..... | 69 |
| 2.2.8 | DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen | 70 |
| 2.2.9 | Generierung von blunt end-DNA | 71 |
| 2.2.10 | Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA..... | 72 |
| 2.2.11 | Ligation von DNA..... | 73 |
| 2.2.12 | DNA-Sequenzanalyse | 75 |
| 2.2.13 | Präparation von Gesamt-mRNA..... | 77 |
| 2.2.14 | Reverse Transkription zur Generierung von cDNA | 77 |
| 2.3 | Zellbiologische Arbeiten..... | 78 |
| 2.3.1 | Bestimmung der Zellzahl | 78 |
| 2.3.2 | Generierung von BM-DC | 79 |
| 2.3.2.1 | Isolierung von Knochenmarkszellen | 79 |
| 2.3.2.2 | Kultivierung von BM-DC-Vorläuferzellen..... | 79 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3.2.3 | Kultivierung von BM-DC-Vorläuferzellen in Anwesenheit von Dexamethason..... | 80 |
| 2.3.2.4 | Ausreifung von BM-DC | 80 |
| 2.3.2.5 | Ernten von BM-DC | 80 |
| 2.3.2.6 | Beladung der MHC-Moleküle von BM-DC mit MOGp35-55..... | 81 |
| 2.3.3 | Transfektion von BM-DC mit dem MicroPorator MP-100 | 81 |
| 2.3.4 | Präparation von Organen aus Versuchsmäusen | 83 |
| 2.3.4.1 | Präparation von Lymphknotenzellen..... | 83 |
| 2.3.4.2 | Präparation von Milzzellen | 83 |
| 2.3.4.3 | Anreicherung von Zellinfiltraten aus dem zentralen Nervensystem . | 84 |
| 2.3.5 | Aufreinigung von T-Lymphozyten aus einer Milzzellsuspension | 85 |
| 2.3.5.1 | T-Zell-Anreicherung mit Hilfe von Nylonwolle-Säulen..... | 86 |
| 2.3.5.2 | Aufreinigung von CD4+CD25- T-Zellen mit der MACS®-Methode .. | 87 |
| 2.3.6 | CFSE-Markierung von T-Zellen | 88 |
| 2.3.7 | Syngene Kokultur mit MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen | 89 |
| 2.3.8 | Antigenspezifische Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen ex vivo | 89 |
| 2.3.9 | Radioaktivitätsmessung zur Bestimmung von Proliferation..... | 90 |
| 2.3.10 | Intrazelluläre Zytokinanreicherung durch PMA, Ionomycin und Brefeldin A | 91 |
| 2.3.11 | Durchflusszytometrie | 91 |
| 2.3.11.1 | Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen..... | 93 |
| 2.3.11.2 | Fluoreszenz-Markierung von intrazellulären Zytokinen..... | 94 |
| 2.3.11.3 | Fluoreszenz-Markierung von Foxp3..... | 95 |
| 2.3.12 | Quantitative Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA..... | 95 |
| 2.4 | Histologische Untersuchungen | 97 |
| 2.5 | Tierexperimentelle Arbeiten | 98 |
| 2.5.1 | Biolistische DNA-Immunisierung mit dem Helios Gene Gun System | 98 |
| 2.5.1.1 | DNA-Gold-Patronenherstellung | 98 |
| 2.5.1.2 | DNA-Immunisierung mit der Genpistole..... | 99 |
| 2.5.2 | Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) | 100 |
| 2.5.3 | Murines Krankheitsmodell der haptensvermittelten Kontaktallergie (contact hypersensitivity, CHS)..... | 101 |

| | |
|---|------------|
| 2.6 Züchtung und Haltung der Versuchstiere | 102 |
| 2.6.1 Züchtung..... | 102 |
| 2.6.2 Typisierung von 2D2/Thy1.1-Mäusen..... | 103 |
| 2.7 Grafik und Statistik | 103 |
| 3. Ergebnisse | 104 |
| 3.1 Protektive DNA-Vakzinierung mit MOG-kodierenden Plasmiden zur Intervention einer MOGp35-55-induzierten EAE | 104 |
| 3.1.1 Klonierungsstrategie zur Generierung MOG- und MOGp35-55-kodierender Expressionsplasmide | 104 |
| 3.1.1.1 Klonierung der MOG-kodierenden Expressionsplasmide | 107 |
| 3.1.1.2 Klonierung der MOGp35-55- und li-MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide | 109 |
| 3.1.2 Funktionalität der generierten MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide | 114 |
| 3.1.2.1 Die Elektroporation mit dem MicroPorator MP-100 eignet sich zur Transfektion von BM-DC in vitro | 114 |
| 3.1.2.2 In vitro Transfektion von BM-DC mit MOG- und MOGp35-55-kodierenden Plasmiden führt zur Präsentation von MOGp35-55 über MHC-II. | 115 |
| 3.1.2.3 Die Gene Gun-basierte DNA-Immunisierung induziert in vivo MOGp35-55-präsentierende APC in den drainierenden Lymphknoten. | 118 |
| 3.1.3 Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden wirkt inhibierend auf den Verlauf einer MOGp35-55-induzierten EAE..... | 120 |
| 3.1.4 Die präventive Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt in der EAE eine Reduktion ZNS-infiltrierender Zellen und axonaler Demyelinisierung. | 123 |
| 3.1.5 Die biolistische DNA-Kovakzinierung mit MOG- plus TGF β - oder IL10-kodierenden Plasmiden führt zu einer Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort..... | 133 |
| 3.1.6 Die Th1/Th17-Inhibition kann nicht auf die Aktivität regulatorischer CD4+ T-Zellen oder auf eine Th2-Polarisierung zurückgeführt werden. | 140 |

| | |
|---|------------|
| 3.2 Dexamethason (DEX)-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige APC (DEX-APC) mit therapeutischem Potenzial in einem murinen Kontaktallergie-Modell. | 144 |
| 3.2.1 DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige APC (DEX-APC) mit protolerogenen Charakteristika..... | 144 |
| 3.2.1.1 DEX-APC besitzen ein vermindertes syngenes T-Zell-Stimulierungspotential | 144 |
| 3.2.1.2 DEX-APC zeigen eine verminderte Expression von MHC-II, kostimulatorischen Molekülen und Maturierungsmarkern. | 146 |
| 3.2.1.3 DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige CD11b+F4/80+GR-1+ APC. | 148 |
| 3.2.2 DEX-APC eignen sich zur nachhaltigen Toleranzinduktion in einem therapeutischen Ansatz der CHS. | 150 |
| 4. Diskussion | 154 |
| 4.1 EAE-Inhibition mittels biolistischer DNA-Vakzinierung | 154 |
| 4.1.1 In vivo Induktion MOGp35-55 präsentierender APC in drainierenden Lymphknoten mittels biolistischer DNA-Vakzinierung | 157 |
| 4.1.2 Die präventive biolistische DNA-Kovakzinierung mit MOG und TGF β oder IL-10 führt zu einem supprimierten EAE-Verlauf..... | 159 |
| 4.1.3 Die EAE-Suppression ist durch eine reduzierte ZNS-Infiltration von Immunzellen und weniger axonaler Demyelinisierung gekennzeichnet..... | 162 |
| 4.1.4 Die präventive DNA-Kovakzinierung mit TGF β oder IL-10 führt zu einer antigenspezifischen Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort..... | 164 |
| 4.2 Inhibition einer Kontaktallergie durch in vitro tolerogenisierte DC | 166 |
| 4.2.1 In vitro Generierung tolerogener APC mit MDSC-Charakteristik durch Kultivierung von BM-DC in Gegenwart von DEX | 166 |
| 4.2.2 Therapeutischer Transfer von DEX-APC führt zu Toleranz im murinen Krankheitsmodell der CHS. | 169 |
| 5. Zusammenfassung | 171 |
| 6. Abstract | 173 |
| 7. Literaturverzeichnis | 175 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 193 |
| 9. Anhang | 197 |

10. Lebenslauf.....199

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Molekulargewichtsstandards..... | 50 |
| Abbildung 2: Mikroglia-Anreicherung durch Percoll®-Gradient-Dichtezentrifugation. | 84 |
| Abbildung 3: pCDH1-MCS1..... | 104 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der generierten MOG- und MOGp ³⁵⁻⁵⁵ - Expressionkonstrukte..... | 105 |
| Abbildung 5: PCR-Amplifikation von MOG..... | 106 |
| Abbildung 6: Restriktionsanalysen von pCDH1-CMV-MOG und pCDH1-Fscn-MOG | 107 |
| Abbildung 7: PCR-Amplifikation der invarianten Kette (Ii)..... | 109 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung der Generation von MOGp ³⁵⁻⁵⁵ und Ii- MOGp ³⁵⁻⁵⁵ | 110 |
| Abbildung 9: Restriktionsanalyse von pCDH1-CMV-Ii-MOGp ³⁵⁻⁵⁵ und pCDH1-Fscn-Ii- MOGp ³⁵⁻⁵⁵ | 111 |
| Abbildung 10: Restriktionsanalyse von pCDH1-CMV-MOGp ³⁵⁻⁵⁵ und pCDH1-Fscn- MOGp ³⁵⁻⁵⁵ | 112 |
| Abbildung 11: Titration der Plasmid-DNA-Menge zur Optimierung der Transfektionseffizienz von BM-DC mittels Elektroporation..... | 114 |
| Abbildung 12: Eine Transfektion von BM-DC mit dem <i>MicroPorator</i> hat keinen Einfluss auf deren T-Zellstimulierungspotenzial..... | 115 |
| Abbildung 13: <i>In vitro</i> -Transfektion von BM-DC mit MOG und MOGp ³⁵⁻⁵⁵ kodierenden Plasmiden..... | 116 |
| Abbildung 14: Die biolistische DNA-Vakzinierung mit MOG- und MOGp ³⁵⁻⁵⁵ - kodierenden Plasmiden induziert eine <i>in vivo</i> Proliferation von CFSE- markierten 2D2 T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten..... | 118 |
| Abbildung 15: Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden wirkt inhibierend auf den Verlauf einer MOGp ³⁵⁻⁵⁵ -induzierten EAE..... | 121 |
| Abbildung 16: Die EAE-Inhibition mittels präventiver biolistischer DNA-Vakzinierung mit MOG- + TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden erfolgt antigenspezifisch..... | 126 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 17: Histologische Analysen des ZNS von EAE-Mäusen zeigen reduzierte Zellinfiltration und Demyelinisierung nach Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden..... | 127 |
| Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analysen des ZNS von EAE-Mäusen zeigen eine Reduktion infiltrierender Immunzellen nach Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden..... | 131 |
| Abbildung 19: Die präventive Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt eine Reduktion ZNS-infiltrierender Th1 und Th17 nach EAE-Induktion. | 133 |
| Abbildung 20: MOG- und TGFβ-Plasmid-DNA-immunisierte Mäuse besitzen höhere Anteile CD8 ⁺ IFNγ ⁺ T-Zellen nach EAE-Induktion..... | 135 |
| Abbildung 21: Milzzellen aus MOG- und TGFβ- oder IL-10-DNA-immunisierten Mäusen weisen eine inhibierte antigenspezifische IFNγ und IL-17-Produktion nach MOGp ³⁵⁻⁵⁵ -Restimulation auf..... | 137 |
| Abbildung 22: Milzzellen aus MOG- und TGFβ-DNA-immunisierten Mäusen weisen eine inhibierte antigenspezifische Proliferation nach MOGp ³⁵⁻⁵⁵ -Restimulation auf. | 138 |
| Abbildung 23: Milzzellen aus MOG- und TGFβ- oder IL-10-DNA-immunisierten Mäusen weisen keine erhöhte antigenspezifische TGFβ, IL-10 und IL-5-Produktion nach MOGp ³⁵⁻⁵⁵ -Restimulation auf. | 140 |
| Abbildung 24: Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt keine Induktion Foxp3 ⁺ Treg nach EAE-Induktion. | 141 |
| Abbildung 25: DEX-APC besitzen ein vermindertes T-Zellstimulierungs-potential . | 144 |
| Abbildung 26: DEX-APC zeigen eine verminderte Expression von MHC-II, costimulatorischen Molekülen und DC-Reifungsmarkern. | 146 |
| Abbildung 27: DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen führt zu MDSC-artigen CD11b ⁺ F4/80 ⁺ GR-1 ⁺ APC..... | 148 |
| Abbildung 28: DEX-APC supprimieren eine CHS in einem therapeutische Ansatz. | 150 |
| Abbildung 29: DEX-APC reduzieren CHS-Symptomatik mit Nachhaltigkeit..... | 151 |
| Abbildung 30: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse nach Anreicherung von 2D2 T-Zellen aus der Milz mittels Nylonwolle-Säulen (siehe 2.3.5.1)..... | 197 |

Abbildung 31: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse nach Anreicherung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Milz mit der MACS[®]-Methode (siehe 2.3.5.2) 197

Abbildung 32: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse zur Typisierung der 2D2-Mauszucht (siehe 2.5.2) 198

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. 1: Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung | 52 |
| Tab. 2: Ausgangsplasmide | 52 |
| Tab. 3: Generierte Plasmide..... | 53 |
| Tab. 4: Allgemeine Enzyme..... | 53 |
| Tab. 5: Restriktionsendonukleasen | 54 |
| Tab. 6: Primärantikörper für durchflusszytometrische Analysen | 54 |
| Tab. 7: Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Analysen | 56 |
| Tab. 8: Streptavidin-Konjugate für durchflusszytometrische Analysen | 56 |
| Tab. 9: Antikörper für Zellseparation | 56 |
| Tab. 10: <i>Capture</i> -Antikörper für ELISA..... | 57 |
| Tab. 11: Detektionsantikörper für ELISA | 57 |
| Tab. 12: Peptide | 58 |
| Tab. 13: Fertigsysteme..... | 58 |
| Tab. 14: Bakterienstamm | 58 |
| Tab. 15: Mausstämme..... | 59 |
| Tab. 16: Komponenten der PCR | 67 |
| Tab. 17: Amplifikationszyklus einer PCR..... | 67 |
| Tab. 18: Amplifikationszyklen der <i>Touch Down</i> -PCR..... | 68 |
| Tab. 19: Reaktionsansatz für die Generierung von <i>blunt end</i> -DNA | 72 |
| Tab. 20: Komponenten der <i>sticky end</i> -Ligationsreaktion | 74 |
| Tab. 21: Komponenten der <i>blunt end</i> -Ligationsreaktion..... | 74 |
| Tab. 22: Komponenten der DNA-Sequenzierungsreaktion | 76 |
| Tab. 23: Amplifikationszyklen der Sequenzierungs-PCR..... | 76 |
| Tab. 24: Komponenten der cDNA-Synthese-Reaktion..... | 77 |
| Tab. 25: cDNA-Synthese-Zyklus einer reversen Transkription | 78 |
| Tab. 26: MicroPorator MP-100 -Einstellungen zur Transfektion von BM-DC | 82 |
| Tab. 27: Bewertung der EAE-Symptome (EAE Score) | 100 |

1. Einleitung

1.1 Autoimmune neuroinflammatorische Erkrankungen

1.1.1 Das Krankheitsbild der multiplen Sklerose

Autoimmunerkrankungen betreffen in den industrialisierten Ländern wie Mitteleuropa und Nordamerika etwa 5% der Bevölkerung. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine besonders häufig auftretende Autoimmunerkrankung und die häufigste neuroinflammatorische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Nach Angaben der *Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft* sind circa 130.000 Menschen in Deutschland und circa 2,5 Millionen Menschen weltweit an MS erkrankt. Vor allem bei jungen Erwachsenen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren wird diese Krankheit diagnostiziert und Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer ¹.

Der Krankheitsverlauf kann sich von Patient zu Patient unterscheiden. Bei 80% aller MS-Betroffenen beginnt die Krankheit mit einem schubartigen Verlauf bestehend aus Episoden neurologischer Störungen und symptomfreien Intervallen ². Diese Phase der Krankheit wird als *relapsing-remitting multiple sclerosis* (RRMS) bezeichnet. Die Rückfälle gehen nach 10 Jahren RRMS zurück und bei etwa 50% der Patienten stellt sich ein progressiver Verlauf mit ansteigenden Symptomen ein (*secondary progressive multiple sclerosis*; SPMS) ². 10 bis 15% der MS-Betroffenen erfahren jedoch keinen schubartigen Verlauf mit Rückfällen, sondern die Symptome verschlechtern sich von Beginn an kontinuierlich ohne zwischenzeitliche Anzeichen von Verbesserung. Man spricht bei diesem Krankheitsverlauf von einer *primary progressive multiple sclerosis* (PPMS) ². MS-Erkrankte leiden mitunter an Sehstörungen, Gefühlsstörungen der Haut, Nervenschmerzen und Muskellähmungen mit zunehmender Behinderung. Eine Vielzahl von klinischen Befunden und Forschungsergebnissen deuten auf eine unkontrollierte autoaggressive Immunreaktion hin, die sich gegen körpereigene Strukturen im ZNS richtet und zu Demyelinisierung, Beschädigung von Axonen, neuronaler Degeneration und ZNS-Atrophie führt. Obwohl die Ätiologie zur Zeit noch unbekannt ist, wird bei MS eine multifaktorielle Krankheitsentstehung vermutet. So werden nicht nur genetische Prädisposition und Umweltfaktoren als Ursache in Betracht gezogen, sondern auch Infektionen mit Viren oder Bakterien, die zu antigenspezifischen

Immunantworten mit Kreuzreaktivität gegen körpereigene ZNS-Peptide (molekulares Mimikry) und zum Verlust der Selbst-Toleranz führen^{3,4}. Bisher stehen noch keine kausalen Therapieansätze für diese schwere Autoimmunerkrankung zur Verfügung und angewandte Behandlungsstrategien führen nicht zur Heilung der Betroffenen. Therapien sind langwierig und kostenintensiv, so dass MS auch von zunehmender sozioökonomischer Bedeutung für die Gesellschaft ist. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist das Verständnis über die komplexen Vorgänge des Immunsystems im Allgemeinen sowie im speziellen Fall der MS zwingend erforderlich. Erkenntnisse aus Grundlagen- und medizinisch angewandter Forschung sowie aus klinischen Befunden können in ihrer Gesamtheit dazu dienen, neue Therapien zur Heilung von MS-Erkrankten zu etablieren.

1.1.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein gut etabliertes und intensiv untersuchtes Tiermodell in der medizinischen Forschung. Die EAE ermöglicht die Reproduktion vieler klinischer, neuropathologischer und immunologischer Aspekte der humanen MS⁵. Verschiedene EAE-Modelle stehen zur Verfügung, welche sich in der Versuchstierart, der Induktionstechnik, den pathologischen Mechanismen und dem Krankheitsverlauf unterscheiden können. Experimentell kann die EAE durch Immunisierung mit ZNS-Homogenat, mit Myelin-Proteinen wie zum Beispiel MBP (Myelin Basisches Protein)⁶, MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein)⁷ und PLP (Myelin Proteolipid Protein)⁸ oder mit bestimmten Autoantigen-determinierenden Peptidsequenzen dieser Myelin-Proteine aktiv induziert werden. Eine weitere Möglichkeit der EAE-Induktion besteht außerdem durch adoptiven Transfer von myelinspezifischen T-Helferzellen (TH)^{9,10}. MOG ist unter den Myelin-Proteinen in der Hinsicht einzigartig, dass es sowohl eine ZNS-reaktive T-Zellantwort als auch eine demyelinisierende Antikörperantwort auslösen kann und somit die komplexen Pathomechanismen der MS widerspiegelt⁵. Die in dieser Arbeit verwendete MOG Peptidsequenz 35-55 (MOGp35-55)-induzierte EAE in C57BL/6-Mäusen zeichnet sich durch eine hohe Inzidenz, eine gute Reproduzierbarkeit sowie einen homogenen und monophasischen Krankheitsverlauf aus⁵. Der Krankheitsverlauf äußert sich in Versuchsmäusen ca. 9 Tage nach EAE-Induktion mit dem Verlust des Schwanztonus und nachfolgend mit zunehmender

Lähmung der Hinterläufe und Vorderläufe. Dieses EAE-Modell ist ein häufig verwendeter Ansatz für in vivo Experimente in der klinischen Forschung und hat in zahlreichen Studien zum Verständnis der komplexen Pathomechanismen neuroinflammatorischer Erkrankungen und MS wesentlich beigetragen.

1.2 Aufgaben und Prinzipien des Immunsystems

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Krankheitserregern (Pathogenen) wie z.B. Viren, Bakterien, Pilzen, Protisten und Parasiten zu schützen. Um eine sowohl schnelle als auch wirkungsspezifische Schutzfunktion gegen solche Pathogene zu ermöglichen, besteht das Immunsystem höherer Organismen aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

Dringen Pathogene über die Haut in das Gewebe eines Organismus ein, fungiert das angeborene Immunsystem als erste und schnelle Verteidigungslinie. Um auf eingedrungene Krankheitserreger reagieren zu können, müssen körperfremde Strukturen erkannt werden. Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (dendritic cells; DC) besitzen Mustererkennungsrezeptoren (pathogen recognition receptors, PRRs), mit denen sie evolutionär konservierte, ubiquitär vorkommende Strukturen von Mikroorganismen, sogenannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), detektieren können. Die Rezeptorbindung führt zur Aktivierung dieser Immunzellen, zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle. Diese Prozesse führen zu einer entzündlichen Reaktion im infizierten Gewebe mit dem Ziel, den Infektionsherd einzudämmen, die Krankheitserreger zu beseitigen und somit den Wirt vor Infektionen zu schützen.

Gelingt es eingedrungenen Pathogenen den unspezifischen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems zu entkommen, können sie sich im Gewebe vermehren und über den Blutkreislauf und das lymphatische System im Wirt ausbreiten. Unter diesen Umständen besteht für den Organismus eine erhöhte Gefahr für die Entstehung von bedrohlichen Infektionskrankheiten. Um eine wirkungsvolle Immunantwort gezielt gegen Pathogene zu richten, besitzen höhere Organismen als weitere Verteidigungsmaßnahme das adaptive Immunsystem. Im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem setzt die Immunantwort des

adaptiven Immunsystems zeitlich später ein. Jedoch ist sie spezifisch gegen den Krankheitserreger gerichtet und es wird dabei ein immunologisches Gedächtnis gebildet, um eine schnelle Immunreaktion auf erneute Infektionen durch das gleiche Pathogen zu ermöglichen.

Dendritische Zellen fungieren nicht nur als erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems, sondern auch als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität und sind bei der Einleitung einer adaptiven Immunantwort maßgeblich beteiligt. Sie gehören zu der Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen (APC). DC nehmen durch rezeptorvermittelte Phagozytose und unspezifische Makropinozytose Pathogene im infizierten Gewebe auf. Proteinstrukturen der aufgenommenen Pathogene werden intrazellulär zu kleinen Polypeptidfragmenten abgebaut und an MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle gebunden. Während dieser Antigenprozessierung migrieren DC zu den lokalen Lymphknoten oder der Milz. Dort präsentieren sie den Peptid:MHC-Komplex Zellen des adaptiven Immunsystems – den sogenannten T-Lymphozyten (T-Zellen). Die Bindung des T-Zellrezeptors (t cell receptor, TCR) an den Peptid:MHC-Komplex führt zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen zu einer Aktivierung und Proliferation der T-Zellen mit antigenspezifischem TCR. Durch diesen als klonale Selektion bezeichneten Prozess expandieren die reaktiven T-Zellen zu einer hohen Anzahl spezifischer T-Effektorzellen, die durch Aktivierung und Mobilisierung anderer Immunzellen eine zellvermittelte Immunantwort induzieren, die sich gezielt gegen den eingedrungenen Krankheitserreger richtet. Um auf das hohe Spektrum unterschiedlicher Pathogene bzw. deren Antigene molekülspezifisch reagieren zu können, hat der TCR eine hochvariable Antigenbindungsstelle. Seine Proteinstruktur ist nicht in der Keimbahn genetisch festgelegt, sondern entsteht durch DNA-Rearrangements von Gensegmenten sowie durch somatische Hypermutationen. T-Zellen können nicht durch die Bindung von freien Antigenen aktiviert werden, sondern nur durch Peptid:MHC-Komplexe. Somit unterliegt die T-Zellaktivierung einer MHC-Restriktion und ist abhängig von der Spezifität des Antigens und seiner Präsentation über MHC-Moleküle. Während CD8+ (cluster of differentiation) T-Zellen Antigen erkennen, die von MHC-Klasse-I (MHC-I)-Molekülen präsentiert werden, werden CD4+ T-Zellen durch Peptid:MHC-II-Komplexe aktiviert. Die Peptid bzw. Antigen-Präsentation extrazellulär aufgenommener Proteine erfolgt durch MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II). MHC-II werden von DC, Makrophagen und auch B-Zellen exprimiert.

Extrazelluläre Antigene wie Bakterien oder Parasiten werden durch diese APC zunächst in intrazelluläre Vesikel, sogenannten Endosomen, aufgenommen. Während das Endosom ins Zellinnere gelangt, sinkt der pH-Wert und es kommt zur Fusion mit Lysosomen. Die in Endosomen und Lysosomen enthaltenen Proteasen sind bei saurem pH-Wert aktiv, und prozessieren das Antigen in Peptidfragmente. MHC-II-Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Damit dort die Bindung zelleigener Peptide und damit deren Präsentation verhindert wird, wird die Peptidbindungsfurche neu synthetisierter MHC-II-Moleküle zunächst durch ein nicht-kovalent gebundenes Protein, der MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii), blockiert. Die Ii steuert zudem die Verlagerung des MHC-II-Moleküls aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Endosomen, wo es nun mit dem prozessierten Antigenpeptid beladen werden kann. Zu diesem Zweck schneiden Proteasen wie Cathepsin S die Ii bis auf ein kurzes Stück, dem so genannten CLIP-Fragment (class-II-associated invariant chain peptide). Antigenpeptide verdrängen das CLIP-Fragment, um an das MHC-II binden zu können. Der Peptid:MHC-II-Komplex wird folglich an die Zelloberfläche transportiert, wo das Peptid nun Antigen-spezifischen CD4+ T-Zellen präsentiert werden kann. Im Gegensatz zu MHC-II befinden sich MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche von nahezu allen Zellen des Organismus. Diese Moleküle werden unmittelbar im endoplasmatischen Retikulum mit Peptiden von zytosolisch abgebauten Proteinen beladen und an die Zelloberfläche transportiert. Auf diese Weise können Antigene von Viren oder intrazellulär vorkommenden Mikroorganismen den CD8+ T-Zellen präsentiert werden und somit infizierte Zellen für das Immunsystem erkenntlich gemacht werden.

Eine weitere Klasse von Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, die B-Lymphozyten (B-Zellen), induzieren die humorale Immunantwort. B-Lymphozyten besitzen zur spezifischen Antigenerkennung Immunglobuline (Ig). Diese Moleküle weisen eine hochvariable Antigenbindungsstelle auf, bedingt durch vergleichbare genetische Mechanismen wie beim TCR von T-Zellen. Jede B-Zelle exprimiert Immunglobuline mit einer einzigen Spezifität und die Antigenerkennung unterliegt keiner MHC-Restriktion. Somit können extrazelluläre Antigene bzw. Proteine in ihrer nativen Form erkannt und gebunden werden. Immunglobuline werden in ihrer membranständigen Form als B-Zellrezeptor (b cell receptor, BCR) bezeichnet. Nach Aktivierung durch Bindung des spezifischen Antigens und durch kostimulatorische Signale expandieren B-Zellen und differenzieren zu Plasmazellen. Als Effektorzellen

der humoralen Immunantwort sezernieren sie Antikörper mit entsprechender Spezifität für das Antigen, welches zu ihrer Aktivierung führte. Die Funktion der Antikörper besteht darin, sowohl das Pathogen spezifisch zu binden und zu neutralisieren als auch zu markieren und andere Immunzellen gegen den Krankheitserreger zu mobilisieren. Durch das komplexe Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunität können Organismen auf die biologische Vielfalt bedrohlicher Krankheitserreger reagieren, körperfremde Pathogene erkennen, Infektionsherde lokal eindämmen, Mikroorganismen und Parasiten beseitigen und Virus-befallene oder anomale Zellen vernichten.

Da Immunantworten eine zerstörerische Kraft auf infizierte Zellen bzw. infizierte Gewebe ausüben, ist es von elementarer Wichtigkeit für die Funktionsweise des Immunsystems, körpereigene oder fremde aber für den Organismus ungefährliche Antigene von fremden krankheitsverursachenden Antigenen unterscheiden zu können. Man spricht in diesem Zusammenhang von der immunologischen Toleranz des Immunsystems gegenüber harmlosen Antigenen. Eine Störung dieser Eigenschaft kann zu entzündlichen Reaktionen in nicht-infizierten Geweben führen, welche sich nachteilig für den Organismus auswirken. Richtet sich eine solche fehlerhafte Entzündungsreaktion gegen körpereigenes Gewebe, wird dies als Autoimmunerkrankung bezeichnet. Ist der Auslöser einer solchen Überempfindlichkeitsreaktion jedoch ein harmloses Umweltantigen, so spricht man von einer allergischen Reaktion.

1.3 Die immunologische Toleranz

Die immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen oder ungefährlichen Antigenen ist eine grundlegende Eigenschaft des Immunsystems. Um eine immunologische Toleranz aufrecht zu erhalten, müssen potenziell autoreaktive Lymphozyten identifiziert und funktionell inaktiviert oder eliminiert werden. Dies wird durch die Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz erzielt.

Der Thymus spielt insbesondere in der zentralen Toleranz eine übergeordnete Rolle. Das Prinzip der zentralen Toleranz ist es, potenziell autoreaktive T-Zellen zu vernichten, bevor sie im peripheren Gewebe Schaden anrichten können. Während der T-Zellentwicklung gelangen doppelt-negative (CD4- CD8-) T-Zellvorläufer

zunächst vom Knochenmark in das zentrale lymphatische Organ. Nach Durchlaufen mehrerer Entwicklungsstadien einschließlich der Ausbildung des T-Zellrezeptors finden Selektionsmechanismen im Thymus statt, die potenziell autoreaktive oder zu schwach reagierende T-Zellen herausfiltern. Bei der Positivselektion werden den doppelt-positiven CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen körpereigene Proteine über MHC-I- und MHC-II-Rezeptoren von corticalen Thymusepithelzellen präsentiert. Bindet die T-Zelle den Peptid:MHC-I-Komplex, entwickelt sie sich zur CD8⁺ T-Zelle. Erkennt die T-Zelle jedoch den Peptid:MHC-II-Komplex, so differenziert sie zur CD4⁺ T-Zelle.

Des Weiteren durchlaufen T-Zellen bei ihrer Entwicklung eine Negativselektion. Hierbei präsentieren Makrophagen und DC im Thymus Peptide, wobei die Bindungsaffinität des jeweiligen TCR an den Peptid:MHC-Komplex über das weitere Schicksal der T-Zelle entscheidet. Bindet die T-Zelle mit einer zu starken Affinität an den Rezeptor, handelt es sich um eine potenziell autoreaktive T-Zelle, die durch programmierten Zelltod (Apoptose) beseitigt wird. Ähnlich verhält es sich mit T-Zellen, die mit ihrem TCR zu schwach oder gar nicht an Peptid:MHC-Komplexe binden. Diese T-Zellen gehen ebenfalls in Apoptose. Lediglich die T-Zellen, deren TCR das präsentierte Peptid mit einer mittleren Affinität binden, überleben und gelangen aus dem Thymus in die Peripherie. Insbesondere durch die Negativselektion gehen mehr als 90% der aus dem Knochenmark eingewanderten T-Zellen verloren. Trotz dieser Selektionsmechanismen kommt es vor, dass potenziell autoreaktive T-Zellen im Thymus nicht eliminiert werden und in die Peripherie geraten. In diesem Fall sorgen die Komponenten der peripheren Toleranz dafür, Immunreaktionen gegen Selbstantigene zu kontrollieren. Dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg) spielen insbesondere innerhalb der peripheren Toleranz eine maßgebliche Rolle. Ihre Mechanismen zur Unterdrückung einer Immunantwort werden in späteren Abschnitten beschrieben.

1.4 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit in einem antigenspezifischen Kontext sowohl entzündliche Immunantworten, als auch T-Zellenergie, regulatorische T-Zellen und somit periphere Toleranz einzuleiten, von besonderem immunologischen Interesse. Innerhalb eines Organismus repräsentieren die DC eine

sehr heterogene Leukozytengruppe mit sowohl phänotypischen, als auch funktionellen Unterschieden. Die phänotypische Unterscheidung erfolgt anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und der zellulären Morphologie, wodurch sich die DC in unterschiedliche Subpopulationen einteilen lassen. Konventionelle myeloide DC exprimieren vornehmlich die Marker der myeloiden Vorläuferzellen CD11c, CD13 und CD33 und besitzen eine verhältnismäßig große, Monozyten-ähnliche Gestalt ¹¹. Im Gegensatz dazu sind plasmazytoide DC (pDC) wesentlich kleiner, exprimieren keine oder nur wenige der genannten myeloiden Marker, weisen aber dafür eine charakteristische B220-Expression auf ¹². Eine weitere Subpopulation von DC, die sogenannten follikulären DC, sind mesenchymalen Ursprungs und exprimieren keine hämatopoetischen Marker ¹³.

1.4.1 Bedeutung und Funktion von myeloiden DC

Konventionelle myeloide DC entwickeln sich im Knochenmark und migrieren als Vorläuferzellen über die Blutzirkulation in die peripheren Gewebe. Unter normalen, homöostatischen Bedingungen besiedeln myeloide DC im unreifen Zustand vornehmlich Gewebe, durch die pathogene Erreger in den Organismus eindringen können wie zum Beispiel die Haut und mukosale Gewebe. Sowohl dermale DC als auch die in der Epidermis vorkommenden Langerhans-Zellen übernehmen eine Wächterfunktion für das immunologische System ^{14,15}. Als gewebsresidente, immature DC (iDC) weisen sie eine hohe endozytotische Aktivität auf ¹⁶. Durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose und Makropinozytose nehmen DC Antigene aus der Umgebung auf, migrieren über das lymphatische System in die sekundären lymphoiden Organe und präsentieren dort die aufgenommenen und prozessierten Peptide den T-Zellen ^{17,18}. Bei Anwesenheit inflammatorischer Stimuli kommt es während der Antigenaufnahme zur Aktivierung und Maturierung der DC. Pathogene Komponenten, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) oder unmethylierte DNA mit CpG (Cytidin-Phosphat-Guanosin)-Motiven, werden über verschiedene Rezeptoren, die zur Gruppe der TLR (toll-like receptor) gehören, detektiert. Bindet der Ligand an den Rezeptor, werden Signalkaskaden induziert, die in der Aktivierung von immunrelevanten Transkriptionsfaktoren wie NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) resultieren und zur DC-Maturierung führen. Dieser Reifungsprozess führt zu grundlegenden Veränderungen im

Expressionsprofil, in der Morphologie und der Funktionalität von DC. Als mature DC (mDC) verliert sie ihre endozytotische Aktivität. Außerdem erfolgt die verstärkte Expression von MHC sowie von kostimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD80, CD83 und CD86, und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-12 oder TNF- α . Morphologisch verändert sich die mDC, indem sie vermehrt zelluläre Fortsätze, die sogenannten Dendriten, ausbildet. Dabei akkumuliert sowohl in der humanen als auch in der murinen mDC das Aktinbündelungsprotein Fascin und trägt zur Dendritenbildung bei ^{19,20,21}. Zusätzlich erhöht die mDC die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CCR7, wodurch sie entlang eines Chemokingradienten in die drainierenden Lymphknoten eintreten kann ²². Diese maturierungsbedingten Zustandsveränderungen befähigen die mDC zur Aktivierung von naiven T-Zellen und somit zur Einleitung einer adaptiven Immunantwort ²³. Im Lymphknoten kommt es zur Interaktion zwischen der mDC und der zirkulierenden, naiven T-Zelle, die spezifisch das präsentierte Antigen erkennt ²³. Um eine adäquate Immunantwort auszulösen, werden insgesamt drei Signale auf die naive T-Zelle übertragen ²⁴. Das erste Signal wird über die Erkennung des Peptid:MHC-Komplexes auf der Oberfläche der mDC durch den spezifischen TCR vermittelt, wodurch die Antigenspezifität der auszulösenden Immunreaktion gewährleistet wird. Das zweite Signal entsteht durch die Wechselwirkung der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 bzw. CD86 auf der mDC und CD28 auf der T-Zelle ²⁵. Durch diese beiden Signale exprimiert die T-Zelle verstärkt CD40L, was durch die Bindung an CD40 auf der mDC die Interaktion zwischen den beiden Zellen stabilisiert. Anhand dieser Signale, ist die mDC in der Lage, die Polarisierung der naiven T-Zelle in Th (T-Helferzellen)-Subpopulationen zu induzieren. In welche Richtung die T-Zelle polarisiert wird, hängt unter anderem an der dritten Signalgebung durch das vorherrschende Zytokinmilieu ab. Das Zytokinmilieu wird wiederum durch die Zytokinsekretion der interagierenden mDC beeinflusst und somit spielt es eine Rolle, unter welchen Bedingungen, die ursprüngliche iDC das Antigen anfangs im infizierten Gewebe aufgenommen hat. Die iDC wird demnach durch das Pathogen selbst aber auch durch Signalmoleküle, die von den infizierten Zellen der Umgebung sezerniert wurden, zu einer funktionell polarisierten immunogenen mDC konditioniert ²⁶.

1.4.2 Tolerogene DC und periphere Toleranz

Während immunogene mDC T-Effektorzellen induzieren, können unreife iDC, die keine hochregulierte Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen sowie Produktion proinflammatorischer Zytokine aufweisen, auf naive T-Zellen tolerogen wirken, Treg induzieren und somit die Mechanismen der peripheren Toleranz steuern²⁷. Unter homöostatischen Bedingungen, d.h. wenn keine Infektion bzw. Entzündung vorliegt, nehmen DC statt PAMPs harmlose, körpereigene Strukturen aus ihrer Umgebung auf, werden nicht stimuliert und verbleiben im unreifen Zustand. Unter solchen nicht-inflammatorischen Bedingungen befinden sich nur wenige T-Zellen in den peripheren Geweben. Treffen sie dort auf iDC, die Selbst-Antigene endozytiert haben und präsentieren, werden die T-Zellen aufgrund der moderaten MHC-II-Peptid-Präsentation und fehlender Kostimulation anergisiert²⁸. Unter homöostatischen Bedingungen sind iDC nur in geringem Maße migrationsfähig. Langerhans-Zellen bleiben etwa einen Monat in der Epidermis, bis sie spontan in die lymphatischen Gewebe wandern²⁹. Gewebsresidente iDC können spontan und nur teilweise ausreifen und als sogenannte semi-mature DC (smDC) in die peripheren Lymphknoten gelangen²⁸. Semi-mature DC können zwar Antigene von Selbstpeptiden in den Lymphknoten präsentieren, allerdings sind sie aufgrund fehlender Stimulation nicht in der Lage, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α oder IL-12 zu produzieren, und die Differenzierung zu T-Effektorzellen zu induzieren²⁸. Die Induktion von smDC ließ sich in diversen Studien und durch unterschiedliche Mechanismen beobachten. Beispielsweise generierte Menges et al. smDC in vitro durch Kultivierung von knochenmarksabgeleiteten DC mit TNF- α . Nach adoptivem Transfer induzierten diese smDC IL-10-produzierende CD4+ regulatorische T-Zellen in einem peptidspezifischen Kontext und nahmen so einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EAE³⁰.

Die Ausreifung von humanen und murinen DC kann auch durch Anwesenheit anti-inflammatorischer Zytokine verhindert werden und somit zu Immunsuppression führen³¹. Tolerogene DC (tDC), die in vitro mit IL-10 behandelt werden, sind in ihrer Maturierung inhibiert, weisen eine reduzierte Expression von MHC-II, CD83 und CD86 auf und wirken anergisierend auf T-Zellen^{32,33}. Die Anwesenheit von IL-10 ermöglicht außerdem die Polarisierung von naiven T-Zellen zu IL-10 produzierenden regulatorischen Tr1 Zellen³⁴. Einige Studien zeigten, dass die IL-10-Sekretion von

tDC eine solche Differenzierung zu Tr1 Zellen ermöglicht ^{35,36}. TGF β (transforming growth factor β) ist ein anderes anti-inflammatorisches Zytokin mit der Fähigkeit regulatorische T-Zellen und periphere Toleranz zu induzieren. TGF β -konditionierte tDC sind in ihrer Aktivierung und Maturierung inhibiert und exprimieren nur geringe Mengen an MHC sowie den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 ³⁷. Aufgrund des tolerogenen Phänotyps sind diese tDC in der Lage, eine Differenzierung von naiven CD4+CD25- T-Zellen zu CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen zu induzieren ³⁸. Durch weitere Studien konnte gezeigt werden, dass TGF- β für die Differenzierung TGF- β produzierender regulatorischer Th3 Zellen entscheidend ist und die Entstehung von ZNS-Autoimmunität supprimieren kann ^{39,40,41}.

1.5 T-Zellpopulationen und ihre Bedeutung in ZNS-Autoimmunität

T-Zellen lassen sich anhand ihrer Effektorfunktionen sowie anhand ihres Expressionsprofils von Markermolekülen, Transkriptionsfaktoren und Zytokinen in unterschiedliche Zellpopulationen einteilen. Eine übergeordnete Unterteilung in die zwei Hauptklassen von CD4+ und CD8+ T-Zellen erfolgt durch die Expression des entsprechenden Korezeptors für die Peptid:MHC-Komplex-Erkennung.

1.5.1 CD8+ T-Zellen

CD8+ T-Zellen erkennen über ihren TCR in Kombination mit dem Korezeptor CD8 intrazelluläre Antigene, die über MHC-I präsentiert werden ⁴². Durch Antigenaktivierung differenzieren diese Zellen zu IFN (Interferon) γ -produzierenden zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic t lymphocyte, CTL, Tc1). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Immunabwehr von intrazellulären Erregern wie z.B. Viren oder zytosolisch vorkommenden Mikroorganismen. Nach ihrer Aktivierung sezernieren CTL in Granula gespeicherte Effektormoleküle wie Perforin und Granzyme und induzieren über diverse Mechanismen Apoptose und Zellyse in den infizierten Zielzellen ^{43,44}.

CD8+ T-Zellen scheinen jedoch nicht nur an der zytotoxischen Immunabwehr beteiligt zu sein, sondern auch bei der Regulation von Immunantworten. Verschiedene CD8+ T-Zellsubpopulationen wurden identifiziert, die sowohl durch

direkten Zellkontakt mit Zielzellen als auch über Zytokinsekretion zellkontaktunabhängig und durch Anergieinduktion in APC zur Suppression von Autoimmunität beitragen können^{45,46,47,48}. Im Fall von MS wurden durch bisherige Studien sowohl eine pathogene als auch eine regulative Rolle für CD8+ T-Zellen aufgezeigt^{49,50,51}. Durch verschiedene Studien im EAE-Modell konnte diese heterogene Funktion von CD8+ T-Zellen in ZNS-Autoimmunität bekräftigt werden^{52,53,54,55}. Sun et al. konnte zeigen, dass adoptiver Transfer von angereicherten MOG-spezifischen CD8+ T-Zellen in der Entwicklung einer schweren Form von EAE in C57BL/6 Wirtsmäusen resultiert⁵³. Die Publikation von York et al. schlägt hingegen eine regulative Rolle und einen zytotoxisch-suppressiven Mechanismus CD8+ T-Zellen in der MOGp35-55-induzierten EAE vor⁵⁶. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass adoptiver Transfer von MOGp35-55-spezifischen CD8+ T-Zellen die EAE-Induktion in C57BL/6-Mäusen supprimiert und eine bereits manifestierte EAE in ihren Symptomen inhibiert. Die in dieser Arbeit identifizierten regulatorischen CD8+ T-Zellen produzieren IFN γ und Perforin und sind in der Lage MOG-beladene CD4+ T-Zellen und CD4-depletierte APC zu zerstören. Auf Grund der sehr diversen Forschungsergebnisse bleibt die exakte Rolle von CD8+ T-Zellen in der MS- und EAE-Pathologie weiterhin unklar.

1.5.2 CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen erkennen über ihren TCR in Kombination mit dem Korezeptor CD4 Antigene, die über MHC-II von APC präsentiert werden. Anhand ihres unterschiedlichen Expressionsprofils von Zytokinen und der damit einhergehenden Funktion lassen sich CD4+ T-Helferzellen in diverse Subpopulationen wie Th1, Th2, Th9, Th17 und Th22 einteilen^{57,58,59,60}. In welchen T-Helferzelltyp die T-Zelle nach ihrer Aktivierung polarisiert, ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie die präsentierte Antigenendosis, die Expression kostimulatorischer Moleküle und dem vorherrschenden Zytokinmilieu.

Eine Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen in CD4+ Th1 Zellen wird in Gegenwart von IFN γ und Zytokinen der IL-12-Familie (IL-12, IL-23 und IL-27) sowie bei hohen Dosen des Antigens durch DC-Präsentation initiiert^{61,62,63}. IFN γ bindet dabei an den konstitutiv exprimierten IFN γ -Rezeptor (IFN γ R) auf der Oberfläche der naiven CD4+ T-Zelle. Dies führt im Zytosol zur Phosphorylierung von STAT1 (*Signal*

Transducer and Activator of Transcription) und der Translokation von pSTAT1 in den Zellkern. Dort induziert pSTAT1 die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet, der wiederum die Transkription von STAT1 unterstützt. Durch diese positive Rückkopplung zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren wird die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ Th1-Zellen verstärkt. Des Weiteren führt pSTAT1 zu einer erhöhten Bildung von heterodimeren IL-12-Rezeptoren (IL-12R) auf der Zelloberfläche von CD4⁺ T-Zellen. Aktivierter IL-12R führt zur Phosphorylierung von STAT4. Es konnte gezeigt werden, dass pSTAT1, pSTAT4 und T-bet an den IFN γ -Promotor binden, die Produktion von IFN γ induzieren und somit die Differenzierung zu Th1-Zellen antreiben. Aktivierte CD4⁺ Th1 Zellen sind entzündungsfördernde Lymphozyten und sezernieren vornehmlich IFN γ , Lymphotoxin und TNF α und aktivieren somit Makrophagen, Neutrophile und NK-Zellen im infizierten Gewebe. Außerdem wird die Produktion von IgG2a-Antikörpern durch aktivierte B-Zellen induziert. Somit sind CD4⁺ Th1 Zellen mit ihren Effektorfunktionen maßgeblich an der zellvermittelten Immunantwort zur Verteidigung gegen intrazelluläre Pathogene und der Induktion von DTH (delayed type hypersensitivity)-Antworten beteiligt ⁶⁴. Eine pathogene Bedeutung von CD4⁺ Th1 Zellen bei organspezifischen Autoimmunreaktionen wie der EAE und MS konnte durch diverse Studien aufgezeigt werden. So infiltrieren zum Beispiel inflammatorische CD4⁺ T-Zellen mit einem Zytokinprofil vom Th1-Typ das Gehirn von Mäusen mit Peptid-induzierter EAE ⁶⁵ und der adoptive Transfer von myelinreaktiven CD4⁺ Th1-Zellen führt zur Entwicklung von EAE in naiven Empfängermäusen ^{66,67}. Des Weiteren zeigen transgene Mäuse, die defizient für die Th1-Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 sind, eine Resistenz gegen die Induktion von EAE ^{68,69}. Befunde, die eine erhöhte Konzentration von IFN γ in ZNS-Läsionen von Mäusen mit EAE ⁷⁰ oder Patienten mit MS ⁷¹ aufzeigen, bekräftigen die Bedeutung von Th1-Immunreaktionen sowohl in der EAE als auch in der MS-Pathologie. Bereits 1996 entstanden jedoch erste Zweifel an der alleinigen Verantwortung von Th1-Zellen für die EAE-Pathologie und insbesondere der Initiierung der Krankheit, da IFN γ -KO (knock out) Mäuse sowie Mäuse, die für die Th1-Moleküle IFN γ R, STAT1 oder IL12p35 defizient waren, entgegen der Erwartungen anfälliger für EAE-Induktion waren und einen stärkeren EAE-Krankheitsverlauf aufzeigten ^{69,72,73}.

Während die Zytokine IFN γ und IL-12p70 eine Entwicklung in CD4⁺ Th1-Zellen begünstigen und der Differenzierung zu CD4⁺ Th2-Zellen entgegenwirken, wird die Polarisierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ Th2-Zellen durch IL-4 sowie zum Beispiel durch Kostimulation über OX40-Ligand initiiert^{74,75,76}. Die Signalgebung des IL-4-Rezeptors führt auf der Oberfläche der naiven CD4⁺ T-Zelle zur zytosolischen Phosphorylierung von STAT6 und nachfolgend zur Translokation von pSTAT6 in den Zellkern. Dies induziert die Produktion des Transkriptionsfaktors GATA-3, der wiederum zur Transaktivierung der typischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 führt. Gleichzeitig wird die Transkription Th1-bedingter Faktoren wie STAT4 und IL12R β 2 supprimiert und damit eine Th1-Differenzierung unterbunden^{77,78}. Die von CD4⁺ Th2 Zellen sezernierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 regen die Immunglobulinbildung vom Typ IgG1 und IgE durch B-Zellen an und steuern insbesondere die humorale Immuntantwort gegen extrazelluläre Parasiten wie z.B. Helminthen. Th2-Zellen sind zudem in der Lage, im Zuge einer lokalen Entzündungsreaktion eosinophile Granulozyten zu rekrutieren. Hyperreaktive Th2-Zellen werden für allergische Reaktionen verantwortlich gemacht und spielen beispielsweise eine zentrale Rolle in der Entstehung von allergischem Asthma⁷⁹. Bei den meisten organspezifischen Autoimmunreaktionen wie der EAE scheinen Th2-Zellen jedoch keinen pathogenen Einfluss zuzunehmen. So sind zum Beispiel im Gegensatz zu CD4⁺ Th1-Zellen myelinreaktive CD4⁺ Th2-Zellen nicht gleichermaßen dazu in der Lage, EAE durch adoptiven Transfer auf die Rezipientenmäuse zu übertragen^{66,80,81,82}.

Anfang des 21. Jahrhunderts wurde mit Th17-Zellen eine weitere Subpopulation von CD4⁺ T-Helferzellen identifiziert, die eine antagonistische Rolle in der Induktion und der Pathologie von EAE einnimmt. Ihre Differenzierung erfolgt in gemeinsamer Gegenwart der Zytokine TGF β und IL-6^{83,84,85}. IL-6 induziert die Phosphorylierung von zytosolischem STAT3 und zusammen mit TGF β weiterhin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR γ t⁸⁶. ROR γ t scheint wiederum für die Transaktivierung einer Reihe von Molekülen der Th17-Differenzierung wie IL-17A, IL-17F und IL23R verantwortlich zu sein⁸⁷. Die Polarisierung zu Th17-Zellen kann jedoch auch in Abwesenheit von IL-6 durch die Kombination von TGF β mit IL-21 erfolgen⁸⁸. CD4⁺ Th17-Zellen produzieren charakteristischerweise die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-26 sowie Chemokine wie beispielsweise CCL-20⁸⁹. CD4⁺ Th17-Zellen agieren vornehmlich in mukosalen Geweben als entzündungsfördernde Effektorzelle und rekrutieren neutrophile Granulozyten. Des

Weiteren sind Th17-Zellen maßgeblich an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie der EAE beteiligt⁹⁰. Die Arbeiten von Cua et al. und anderen Wissenschaftlern mit IL12p35 und IL12p40-defizienten Mäusen zeigten, dass nicht das Th1-Zytokin IL-12, sondern vielmehr das Th17-Zytokin IL-23 für die EAE-Induktion entscheidend ist^{73,91,92}. Im Jahr 2005 wurde außerdem gezeigt, dass IL-23 die Expansion von IL-17 produzierenden myelin-spezifischen Th17-Zellen aus MOG-immunisierten Mäusen unterstützt und dass diese myelin-reaktiven Th17-Zellen dazu in der Lage sind, EAE durch adoptiven Transfer auf Rezipientenmäuse zu übertragen⁹³.

1.5.3 Regulatorische T-Zellen

Bereits Anfang der 70er Jahre wurden erstmals T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften beschrieben, die einen inhibitorischen Einfluss auf andere T-Zellen nehmen können und dadurch die immunologische Toleranz unterstützen⁹⁴. Diese zunächst als Suppressorzellen bezeichnete Zellgruppe erfuhr damals großes Interesse seitens der Forschung, war aber auch lange umstritten, da eine genaue Charakterisierung sowie spezifische Marker zur Identifizierung fehlten⁹⁵. Erst Mitte der 90er Jahre gelang es Sakaguchi et al. CD4⁺ T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften zu beschreiben, die fortan als regulatorische T-Zellen bezeichnet und den konventionellen T-Effektorzellen gegenüber gestellt wurden⁹⁶. Diese Studie deckte auf, dass die Depletion der CD4⁺CD25⁺ Treg die Expansion von autoreaktiven T-Zellen und damit die Entstehung von Autoimmunreaktionen förderte. Die hier beschriebene Population der Treg, wird heute expliziter als natürliche Treg (nTreg) bezeichnet, die von der Gruppe der induzierten Treg (iTreg) unterschieden wird. Während sich nTreg vollständig im Thymus entwickeln und ihre Funktion in der Peripherie ausüben, verlassen iTreg, wie Tr1 oder Th3-Zellen, den Thymus zunächst als konventionelle, naive CD4⁺ T-Zelle und erlangen erst in der Peripherie ihre suppressiven Eigenschaften. Zusätzlich unterscheiden sich iTreg und nTreg in ihren präferierten Suppressionsmechanismen sowie in der inhibitorischen Effektivität⁹⁷. iTreg wirken vornehmlich über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine. Tr1 Zellen sezernieren das antiinflammatorische Zytokin IL-10^{34,35} während Th3 Zellen vor allem TGF- β und nur geringe Mengen an IL-10 produzieren³⁹. Hingegen

vermitteln nTreg ihre suppressive Kapazität über einen zellkontaktabhängigen Mechanismus auf die Zielzelle ⁹⁸.

Die Population der nTreg erstreckt sich in einem Organismus über etwa 5 – 10% aller peripheren CD4+ T-Zellen. nTreg exprimieren konstitutiv GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-induced tumor antigen 4) und das IL-2 Rezeptorprotein CD25. Diese Oberflächenmoleküle werden ebenfalls von konventionellen CD4+ T-Effektorzellen nach ihrer Aktivierung exprimiert, weshalb sie als zelltypspezifische Marker für nTreg ausscheiden. T-Lymphozyten mit dem $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor und suppressiver Kapazität exprimieren jedoch im Gegensatz zu T-Effektorzellen den Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box protein), welcher somit zur Unterscheidung zwischen suppressiven Treg und T-Effektorzellen dienen kann ^{99,100}. iTreg, die erst in der Peripherie ihre Fähigkeit zur Immunregulation erworben haben, weisen eine heterogene Expression von GITR, CD25 und Foxp3 auf. IL-10 produzierende Tr1 Zellen beispielsweise sind CD4+, exprimieren aber im Ruhezustand kein Foxp3. Werden die Zellen aktiviert, kommt es allerdings zur verstärkten Ausprägung des Transkriptionsfaktors ^{34,101}. Bislang konnten keine eindeutig iTreg-spezifischen Expressionsmarker identifiziert werden, was eine genaue Unterscheidung zwischen iTreg und nTreg erschwert. Die Bedeutung der Foxp3-Expression für einen Organismus erklärt sich bei Betrachtung des Phänotyps von Mäusen, die eine *loss-of-function*-Mutation im *foxp3* Gen tragen. Diese Mäuse besitzen einen deutlich erkennbaren Phänotyp, der als „schuppig“ (engl. *scurfy*) bezeichnet wird. Aufgrund eines Defekts in der thymischen nTreg-Entwicklung, herrscht in den Tieren ein extremes Ungleichgewicht durch hochproliferatives Verhalten von Effektorlymphozyten, was zu schweren, unkontrollierten Autoimmunreaktionen und zum frühen Tod der Tiere führt ¹⁰². Eine analoge Mutation im *foxp3* Gen im Menschen induziert eine multiple Autoimmunerkrankung, das sogenannte IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome). IPEX-Patienten weisen diverse Krankheitsbilder auf, wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, autoimmune Enteropathy oder Diabetes mellitus, und entwickeln vermehrt starke Allergien. Bei männlichen Neugeborenen führt das IPEX-Syndrom zum frühen Tod ¹⁰³. Da Foxp3+ Treg für die Suppression autoreaktiver T-Zellantworten entscheidend sind, werden diese Zellen als therapeutisches Mittel zur Unterdrückung von Autoimmunkrankheiten besonders in Betracht gezogen und sind deswegen

Gegenstand vieler aktueller Forschungsarbeiten. Ihre Bedeutung in der murinen EAE wurde bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. In zahlreichen Studien war ein supprimierter EAE-Krankheitsverlauf auf Treg-Aktivität zurückzuführen^{104,105,106,107}. Allerdings konnte durch die Arbeiten von Korn et al. gezeigt werden, dass bei einer MOGp35-55-induzierten EAE MOG-reaktive Foxp3+ Treg in den peripheren lymphoiden Organen expandieren und im ZNS akkumulieren, diese Zellen aber nicht dazu in der Lage sind, die Entstehung der EAE zu verhindern¹⁰⁸.

1.6 Antigen-spezifische Therapie autoaggressiver ZNS-Inflammation

Die gegenwärtigen Behandlungsansätze zur Therapie von autoimmunen ZNS-Erkrankungen sind zum Großteil auf die antigen-un-spezifische Unterdrückung der autoaggressiven Immunreaktion durch immunsuppressive Medikation (zum Beispiel therapeutische Glucocorticoide, Natalizumab oder Fingolimod) gerichtet und können daher unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. MS-Behandlungsstrategien sollten darauf abzielen, die immunologische Selbst-Toleranz gegen das Autoantigen wiederherzustellen ohne das gesamte Immunsystem zu beeinträchtigen¹⁰⁹. Aufgrund der vielseitigen Fähigkeiten tolerogener DC, in einem antigen-spezifischen Kontext regulatorische T-Zellen zu induzieren und inflammatorische Immunantworten zu supprimieren, sind diese Zellen seit geraumer Zeit im Fokus der klinischen Forschung. Bei DC-bedingten Behandlungsansätzen besteht generell die Möglichkeit, DC in vitro zu kultivieren, mit immunsuppressiven Zytokinen oder pharmakologischen Substanzen zu tolerogenisieren und anschließend in den Rezipienten zu transferieren. Eine Alternative dazu ist die DNA-Immunisierung, bei der in vivo DC im Organismus angezielt werden.

1.6.1 Toleranzinduktion mittels in vivo DNA-Immunisierung

Konventionelle Vakzine bestehen aus pathogenen Mikroorganismen (z.B. attenuierten Viren oder Bakterien), aus Tumorzelllysaten oder aus Proteinen bzw. Peptiden¹¹⁰. Bei der DNA-Immunisierung hingegen wird die pathogene Komponente

auf Ebene der DNA zum Beispiel in Form von antigenkodierender Plasmid-DNA eingesetzt. Grundprinzip dieser Immunisierungsvariante ist eine transiente Transfektion, die zur intrazellulären Transkription und Translation des kodierten Antigens in Zielzellen führt. Die Induktion einer antigenspezifischen T-Zellimmunantwort mittels DNA-Immunisierung erfordert jedoch die MHC-restringierte Präsentation des Antigens durch APC und vor allem DC in drainierenden Lymphknoten^{111,112}. Eine direkte Transfektion von DC resultiert in einer intrazellulären Produktion des Antigens und nachfolgend in dessen Präsentation über MHC-I-Moleküle. Auf diesem Weg können CD8+ T-Zellen aktiviert werden und eine CTL-Immunantwort eingeleitet werden. DC können außerdem sekretiertes Antigen oder lösliches Antigen, das z.B. von transfizierten apoptischen Zellen stammt, durch Phagozytose aufnehmen und dieses somit über MHC-II-Moleküle CD4+ Th-Zellen präsentieren¹¹³. Wenn die DNA-Vakzinierungsstrategie darauf abzielt, eine antigenspezifische CD4+ Th-Zellantwort zu induzieren, kann eine MHC-II-Präsentation des transfizierten Antigens durch gentechnologische Methoden forciert werden. Hierfür sollte die Transkriptionskassette der Plasmid-DNA für ein Fusionsprotein aus Invarianter Kette und dem relevanten Antigen kodieren. Diebold et al. konnten zeigen, dass bei in vitro Transfektion von knochenmarksabgeleiteten murinen DC die Verwendung von Plasmid-DNA, die für ein Fusionsprotein aus Invarianter Kette und Ovalbumin (OVA) kodiert, zu einer verstärkten Präsentation des transgenen OVA über MHC-II-Moleküle führt¹¹⁴. Die grundsätzlichen Vorteile einer DNA-Immunisierung gegenüber traditionellen Vakzinen liegen in der *in situ* Induktion nativer Antigenexpression und der verlängerten in vivo Antigenproduktion durch transfizierte Zellen, in der effizienten Einleitung humoraler und zellulärer Immunantworten, die Vernachlässigbarkeit der Sicherheitsbedenken beim Einsatz von attenuierten Lebendvakzinen und in der einfacheren sowie kostengünstigeren Handhabung von Plasmid-DNA-Vakzinen bei der Produktion, Lagerung und dem Transport¹⁰⁹. Das potenzielle Risiko von Plasmid-DNA-Vakzinen in das Genom der Wirtszelle zu integrieren und Mutagenese auszulösen, konnte durch bisherige Studien nicht belegt werden^{115,116}.

Bei DNA-Immunisierungen können die Immunisierungsstrategie, die Art der Verabreichung, das gewählte Krankheitsmodell und die Eigenschaften der Plasmid-DNA beeinflussen, welche Zellen angezielt werden und welche immunologischen Mechanismen daraus resultieren. Die Verabreichung von Plasmid-DNA kann nicht-

invasiv durch topische Applikation auf die Haut oder Mucosa erfolgen, durch intravenöse (i.v.), intramuskuläre (i.m.) oder intradermale (i.d.) Nadelinjektion, oder durch i.d. Applikation mittels biolistischem *Gene Gun*-Verfahren¹¹⁷. Die i.m. Injektion von Plasmid-DNA resultiert zum Beispiel vornehmlich in der Transfektion von Myozyten und in geringerem Maße von APC¹¹³. Die in der Plasmid-DNA vorkommenden CpG-Motive führen dabei über TLR9-Signalgebung und NFκB-Aktivierung in der APC zur Einleitung einer Immunantwort vom Th1-Typ. Die Arbeiten von Lobell et al. konnten veranschaulichen, dass bei i.m. DNA-Vakzinierungen die Anwesenheit von CpG-Motiven in der Plasmid-DNA und womöglich die Einleitung einer Th1-Immunantwort notwendig sind, um eine MOGp91-108-induzierte EAE in Versuchsratten erfolgreich zu supprimieren¹¹⁸. In diesem EAE-Suppressionsmodell konnte weiterhin eine reduzierte IL17-Immunantwort und die Beteiligung von IFNβ, jedoch keine verstärkte Treg-Aktivität in Form von erhöhter Foxp3- und TGFβ-Expression festgestellt werden¹¹⁹. Eine simultane Koadministration von Autoantigenkodierender Plasmid-DNA und Plasmid-DNA, die für IL-4-, IL-10- oder TNFα-kodiert, verhinderte in einem MBPp68-85-induzierten DNA-Immunisierungsmodell den suppressiven Effekt¹²⁰. In einer anderen Studie von Schiff-Zuck et al. war hingegen eine i.m. Koadministration von MBP- und IL-10-kodierender Plasmid-DNA notwendig, um eine antigenspezifische EAE-Suppression in Lewis-Ratten zu induzieren¹⁰⁵. Die Inhibition der EAE-Symptome war IL-10 abhängig und wurde mit einer erhöhten Tr1-Aktivität erklärt. Die alleinige i.m. Gabe von MBP-kodierender Plasmid-DNA führte in diesen Ansätzen zu keinem supprimierten Krankheitsverlauf. In der erst kürzlich publizierten Studie von Fissolo et al. wiederum führte eine i.m. DNA-Immunisierung von MOG-kodierender Plasmid-DNA ohne zusätzliche Administration von Plasmid-DNA, die für immunsuppressive Zytokine kodiert, zu supprimierten klinischen Symptomen in einem prophylaktischen und therapeutischen Ansatz MOGp35-55-induzierter EAE. Die EAE-Inhibition war in diesem Ansatz von einer reduzierten antigenspezifischen Th1- und Th17-Immunantwort begleitet, einer Expansion von CD4+CD25+Foxp3+ Treg in der Peripherie und einer transkriptionellen Aufregulation von Genen, die für neurotrophe Faktoren und Proteine kodieren und an der Remyelinisierung beteiligt sind¹⁰⁷. Bei der biolistischen DNA-Immunisierung mit der *Gene Gun* werden vornehmlich Keratinozyten sowie Langerhans-Zellen und dermale DC transfiziert. Bei diesem Verfahren wird die Plasmid-DNA an Gold-Partikel gebunden und durch Helium-Druck auf die Haut appliziert. Durch ein solches

Bombardement penetrieren die Plasmid-DNA-Goldkomplexe die Haut und die Plasmid-DNA kann direkt in die Zielzellen der Haut gelangen. Durch diesen Mechanismus wird eine 10 bis 100-fach geringere Plasmid-DNA-Menge benötigt als bei Nadelinjektionen, da in diesem Fall die Plasmid-DNA aktiv von Zellen aufgenommen werden muss¹²¹. Ramshaw et al. konnte durch präventive biolistische DNA-Immunisierungen mit MBP-kodierender Plasmid-DNA eine protektive Immunantwort vom Th2-Typ auslösen und als Resultat einen reduzierten Krankheitsverlauf im MBP-induzierten EAE-Modell in Lewis-Ratten feststellen¹²². Beachtenswert ist, dass in dieser Arbeit eine präventive DNA-Applikation per i.m. Nadelinjektion zu keinem inhibierenden Effekt auf den EAE-Krankheitsverlauf führte. Jedoch nicht nur die Vakzinierungsstrategie und die Verabreichungsart von Plasmid-DNA, sondern auch die Wahl des Promotors kann bei DNA-Immunisierungen die Art der Zielzellen sowie resultierende immunologische Mechanismen beeinflussen. Steht die Transkriptionskassette der Plasmid-DNA unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors, wie zum Beispiel dem Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor, so wird das Transgen von allen erfolgreich transfizierten Zellen, also auch von nicht-hämatopoetischen Zellen, exprimiert. Unter diesen Umständen können nicht-transfizierte residente DC das Antigen von transfizierten somatischen Zellen aufnehmen und über MHC-II-Moleküle sozusagen kreuzpräsentieren. Da Plasmid-DNA-Applikationen generell zu physikalischen Mikroverletzungen und lokaler Gewebsirritation führen, können demnach nicht-transfizierte antigenkreuzpräsentierende DC maturieren und zu den drainierenden Lymphknoten migrieren¹¹¹. Zielt die DNA-Vakzinierungsstrategie allerdings auf die antigenspezifische Induktion tolerogener DC ab, könnten solche Antigenkreuzpräsentierenden mDC einen kontraproduktiven immunogenen Einfluss auf das Vakzinierungssystem nehmen. Eine spezifische Expression des transfizierten Antigens durch DC scheint unter diesen theoretischen Aspekten sinnvoll zu sein. Der Promotor des Aktinbündelungsprotein Fascin stellt ein genregulatorisches Element dar, dass eine solche DC-fokussierte Transgenexpression ermöglicht^{123,124}. Fascin wird zwar nicht nur von DC¹⁹, sondern auch von neuronalen Zellen und Gliazellen¹²⁵ sowie von kapillaren Endothelzellen¹²⁶ exprimiert, jedoch werden diese Zellen bei einer intradermalen DNA-Vakzinierung nicht angezielt und spielen somit bei dieser Applikation keine Rolle. In iDC, wie z.B. den Langerhans-Zellen, findet eine geringe Fascin-Expression auf einem Grundlevel statt. Da Fascin funktionell an der

zytoskeletalen Umstrukturierung beteiligt ist, wie sie bei der Bildung von dendritischen Fortsätzen während der DC-Maturierung erfolgt, findet eine starke Aufregulation der Fascin-Promotoraktivität in reifenden und migrationsfähigen DC statt ²¹. Somit eignet sich der Fascin-Promotor besonders für eine DC-fokussierte DNA-Immunisierung. Die Arbeiten von Ross et al. zeigten, dass eine *Gene Gun*-basierte DNA-Immunisierung mit einem Reporterkonstrukt unter der Expressionskontrolle des Fascin-Promotors zur in vivo Transfektion von Langerin+ Langerhans-Zellen geeignet ist ¹²³. Die biolistische DNA-Immunisierung resultierte in der Induktion transgenspezifischer CD8+ T-Zellen, die IFN γ produzieren. Die Quantität der induzierten CD8+ T-Zellen war in diesem Ansatz vergleichbar wie bei Verwendung des ubiquitär aktiven CMV-Promotors ¹²³. Sudowe et al. konnten weiterhin veranschaulichen, dass die biolistische Transfektion unter Verwendung des Fascin-Promotors zu einer Immunantwort vom Th1-Typ mit Induktion von IFN γ produzierenden T-Helferzellen, einer erhöhten Konzentration von IgG2a-Antikörpern und Aktivierung von antigenspezifischen CD8+ CTL führt ¹²¹. In nachfolgenden Studien konnte in einem in vivo Typ I Allergiemodell außerdem dargestellt werden, dass die präventive biolistische DNA-Immunisierung in einer reduzierten antigenspezifischen IgE-Produktion resultiert. Diese Inhibition wurde durch CD4+ und CD8+ T-Zellen vermittelt und war abhängig von IFN γ ¹²⁷. Da bei diesen Experimenten nicht nur der DC-spezifische Fascin-Promotor sondern auch der Keratinozyten-spezifische Keratin-5-Promotor verwendet wurde, konnte im Kontext der *Gene Gun*-vermittelten DNA-Immunisierung die weitere Schlussfolgerung getroffen werden, dass nicht nur direkt transfizierte DC eine effiziente Immunantwort einleiten können, sondern auch untransfizierte DC, die das Antigen von transfizierten Keratinozyten exogen aufgenommen haben ¹²⁷. Jedoch stellten sich qualitative Unterschiede bei der induzierten Immunantwort heraus. Bei Verwendung des Fascin-Promotors wurde eine Immunreaktion vom Th1-Typ induziert während die Verwendung des Keratin-5-Promotors in einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort resultierte ¹²⁷.

1.6.2 Toleranzinduktion durch in vitro tolerogenisierte DC

Neben der in vivo Tolerogenisierung von DC mittels DNA-Immunisierung ist die in vitro Kultivierung von DC unter tolerogenisierenden Bedingungen mit

anschließendem Transfer eine weitere klinisch intensiv erforschte Strategie, um eine antigenspezifische Immunantwort in Rezipienten zu induzieren. Bei dieser als DC-Vakzinierung bezeichneten Methode ist der Reifungszustand der DC von entscheidender Bedeutung¹²⁸. Während mDC ein immunogenes Potenzial aufweisen und inflammatorische Immunreaktionen auslösen, gelten iDC, smDC sowie tDC als Initiatoren von Immunsuppression und Toleranz (siehe Abschnitt 1.4 und 1.4.2). Die Ausreifung von humanen und murinen DC kann durch Behandlung mit immunregulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF β oder mit pharmakologischen Substanzen beeinflusst werden. Synthetische Glucocorticoide (GC), zum Beispiel Dexamethason (DEX) oder Prednisolon, finden in der Klinik immer häufiger Verwendung bei der Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen¹²⁹. GC werden als natürlich vorkommende Corticosteroidhormone während des Verlaufs einer Immunreaktion produziert¹³⁰, um in einer negativen Rückkopplung als Regulator der Inflammation zu fungieren¹³¹. GC können auf unterschiedliche Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen, DC oder T-Zellen modulatorisch wirken. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft diffundieren GC durch die Zellmembran und aktivieren im Zytoplasma den Glucocorticoidrezeptor (GR). Der aktivierte GR bindet nach seiner Translokation in den Nukleus an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten Glucocorticoid-responsive Elemente (GRE), und kann auf diese Weise die Transkription von Genen positiv oder negativ beeinflussen. Außerdem kann der aktivierte GR andere immunrelevante Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF κ B^{132,133}, NFAT (nuclear factor of activated t cells)¹³⁴ oder AP-1 (activator protein-1)¹³⁵ über Protein-Protein-Wechselwirkungen in ihrer Funktion inhibieren¹³⁶. GC bewirken eine reduzierte Expression proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel IL-2¹³⁴, IL-6¹³⁷, IL-12¹³⁸ und TNF α ¹³⁹. Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Differenzierung und Ausreifung muriner¹⁴⁰ und humaner DC¹⁴¹. Humane Monozyten-abgeleitete und mit DEX behandelte DC weisen eine reduzierte Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II sowie den kostimulatorischen Molekülen CD40 und CD86 auf und zeigen dementsprechend eine reduzierte Fähigkeit zur Stimulation allogener T-Zellen¹⁴¹. Außerdem zeichnen sich die Zellen durch eine verminderte Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-12p70 und TNF α nach LPS-Stimulation aus¹⁴¹. Durch die Publikation von Bros et al. konnte gezeigt werden, dass DEX-behandelte Zellen der murinen myeloiden DC-Zelllinie SP37A3 nach LPS-Stimulation einen semi-maturen Phänotyp annehmen

und in vitro Treg induzieren können ¹⁴². In einer weiteren Studie wurde weiterhin dargestellt, dass murine Knochenmark-abgeleitete Vorläuferzellen, die unter DC-differenzierenden Bedingungen und in Gegenwart von DEX kultiviert wurden, die Fähigkeit besitzen in vitro Treg zu induzieren ¹⁴³.

1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die antigenspezifische DNA-Immunisierung ist eine innovative Behandlungsstrategie und ihr Potenzial zur Therapie von MS wird in der klinischen Forschung intensiv untersucht. In einer doppelt-randomisierten Placebo-kontrollierten klinischen Studie wurde MBP-kodierende Plasmid-DNA als Vakzine eingesetzt ¹⁴⁴. In dieser Studie konnte nach DNA-Immunisierung eine reduzierte Proliferation Myelin-reaktiver CD4+ T-Zellen und ein reduzierter Titer von Myelin-spezifischen Antikörpern im Liquor cerebrospinalis der MS-Patienten detektiert werden. Mit Hilfe der EAE, dem experimentellen Tiermodell der MS, konnten verschiedene relevante Autoantigene, wie MBP, PLP oder MOG identifiziert werden. Durch diverse DNA-Immunisierungsexperimente mit Plasmid-DNA, die zum Beispiel für MBPp68-85 ¹⁴⁵ oder MOGp91-108 ¹¹⁸ kodiert, konnte eine Inhibition des EAE-Krankheitsverlaufs induziert werden. Jedoch unterschieden sich in diesen Studien die Vakzinierungsstrategien und die induzierten immunologischen Mechanismen beträchtlich (siehe Abschnitt 1.6.1). In dieser Arbeit sollte das Potenzial einer alternativen DNA-Immunisierungsstrategie zur Inhibition einer MOGp35-55-induzierten EAE untersucht werden. Es sollten Expressionskonstrukte generiert werden, die für MOG oder die Peptidsequenz MOGp35-55 unter der Kontrolle des Fascin-Promotors kodieren, um eine spezifische Expression des Autoantigens in DC zu ermöglichen. Die DNA-Applikation sollte durch das biolistische *Gene Gun*-Verfahren erfolgen, dass auf eine Transfektion von Langerhans-Zellen und dermale DC der Haut abzielt. Durch die Koapplikation mit Plasmid-DNA, die für die immunregulatorischen Zytokine IL-10 oder TGF β kodieren, sollten transfizierte DC bei gleichzeitiger Expression des Autoantigens in einen tolerogenen Zustand versetzt werden, um in vivo eine antigenspezifische regulatorische Immunantwort zu induzieren. Außerdem sollte der Effekt dieser DNA-Vakzinierungsstrategie auf den

EAE-Krankheitsverlauf geprüft und die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den tolerogenisierenden Einfluss des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason auf antigenpräsentierende Zellen zu untersuchen. Hierzu sollten murine Knochenmarkzellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Gegenwart von DEX kultiviert und phänotypisch sowie funktionell in vitro charakterisiert werden. Durch therapeutischen Zelltransfer sollte das Potenzial dieser DEX-konditionierten APC zur in vivo Inhibierung einer Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion in einem antigenspezifischen Kontext untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|------------------------------|---|---|
| Agarose-Gel-Kammer | Wide Mini-Sub Cell GT Cell VARIA 1 | Bio-Rad, München Roth, Karlsruhe |
| Analysenwaage | Precisa 120A | Sartorius AG, Göttingen |
| Autoklav | V-150 | Systemec GmbH, Wettenberg |
| Bakterienschüttler | MaxQ 4000 Incubator Shaker | Thermo Scientific |
| Bakterienbrutschrank | BF | Binder, Tutlingen |
| Bestrahlungsgerät | Gammacell 2000 | Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark |
| Brutschrank | CB 150, CB 210 | Binder, Tutlingen |
| Digitalwaage | Basic Typ 1202 | Sartorius AG, Göttingen |
| Dispensor | Polytron PT 2100 | Kinematica AG, Littau, Schweiz |
| Durchflusszytometer | FACScan™ FACSCanto™ II | Becton Dickinson, Franklin, Lakes, USA |
| Elektroporator | Gene Pulser™ MicroPorator MP100 | Bio-Rad, München Peqlab, Erlangen |
| ELISA-Washer | Ultrawash plus | Dynex, Chantilly, USA |
| Geldokumentations- system | Quantum 3000 | Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich |
| Hämozytometer | Neubauer, Improved Bright Line, 0,1 mm | AO Spencer, Buffalo, USA |
| Helios® Gene Gun System | Helios® Gene Gun, Tubing Prep Station, tubing cutter | Bio-Rad, München |
| Magnetrührer | IKAMAG® REO | Janke & Kunkel, Staufen |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-----------------------------------|---|--|
| Mehrkanalpipette | m 300: 30 – 300 µl | Biohit, Rosbach |
| Mikrometer | | Mitutoyo, Tokyo |
| Mikroskop | Labormikroskop CH-2 (4-40x), Inverses Mikroskop CK-2 (4-20x) | Olympus, Hamburg |
| Mikrowelle | Microchef FM 2915 Q | Moulinex |
| pH-Meter | CG 840 mit Einstabmesskette N2042 | Schott, Hofheim am Taunus |
| Pipetten | Finnpipetten: 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 30 - 300 µl, 200 - 1000 µl | Finpipette, Helsinki, Finnland |
| Pipettierhilfe | pipetus®-akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Präparierbesteck | | Hammacher, Solingen |
| Präzisions- Mikroplatten Leser | | MWG Biotech, Ebersberg |
| Spannungsgerät | Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Spektrophotometer | Ultrospec 1100 rp | Pharmacia, Freiburg |
| Sterile Werkbank | Heraeus Air® | Heraeus, Hanau |
| Stickstofftank | BT 40 | L'air liquid, Wiesbaden |
| Szintillationszähler | 1205 Betaplate | LKB Wallac, Freiburg |
| Thermocycler | 7300 Real-Time PCR System DNA Thermocycler 480 | Applied Biosystems, Foster City, USA Perkin Elmer, Belgien |
| Vortexer | Vortex Genie 2™ | Bender & Hobein, Zürich, Schweiz |
| UV-Leuchtkasten | N90 MW 312 NB | Faust, Schaffhausen, Schweiz |
| Waage | Basic | Sartorius, München |
| Wasserbad | GFL Typ 1012 | Labortechnik, Burgwedel |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-----------------------------|--|---|
| Wasser-deionisierungsanlage | Aktivkohlepatrone, 2 x Reistharz-Patrone, Membranfilterkerze 0,2 µm | Milipore, Bergisch-Gladbach |
| Zählhilfe | Laboratory Counter | Becton Dickinson |
| Zellerntegerät | 295-001 Cell Harvester | LKB Wallac, Freiburg |
| Zentrifuge | Sorvall (Modelle RT 6000D und RC5C) Multifuge 1 L-R Mikrozentrifuge SIGMA 1-14 | Du Pont, Bad Homburg Heraeus, Wiesbaden Sigma, Osterode |

2.1.2 Material

| Material | Modell | Hersteller |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|
| Abdeckfolie für ELISA Platten | EASYseal™ | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Bakteriologische Petrischalen | Ø 94mm, Höhe 16mm (no 633161) | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Dispensiergerät-Aufsatz | PD-Tips (0,5 ml, 2,5 ml) | Brand, Wertheim/Main |
| Einfrierdose | CN5100-0001 | Nalge, Meckenheim |
| Einmalspritzen | 10 mL, Discardit™ II | BD GmbH, Heidelberg |
| Entsalzungsanlage | Millipore | Molsheim, Frankreich |
| ELISA-Platten | 96-Loch-Flachbodenplatten, high binding | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| FACS-Röhrchen | Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen | Becton Dickinson, USA |
| Filtermembran | | Perkin Elmer, Wellesley, USA |
| Glaspipetten | Precicolor: 5 ml und 10 ml | HBG Henneberg-Sander, Giessen |
| Gold microcarriers | 1,6 µm | Bio-Rad, München |

| Material | Modell | Hersteller |
|------------------------------------|--|--|
| Handschuhe | Sempercare® | Semperit, Österreich |
| Kanülen | 0,7 x 30 mm; 0,4 x 12 mm; 0,9 x 40 mm; 0,9 x 70 mm | Becton Dickinson, USA B. Braun, Melsungen |
| Kulturschalen | Cellstar: Tissue Culture Plate, 96 well (Flat Bottom und U-Bottom) und 24 well | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Küvetten | Einmal-Küvetten, 1,5 ml | Brand GmbH, Wertheim |
| Mattrand-Objektträger | | Diagonal GmbH, Münster |
| Nylonwolle | MKN-100 Nylon Wool Fiber | Kisker Biotech, Steinfurt |
| Pasteurpipetten | | Roth, Karlsruhe |
| PCR-Reaktionsgefäße | | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen | Weißer Spitzen: bis 2 µl, Gelbe Spitzen: bis 200 µl Blaue Spitzen: bis 1000 µl | Roth, Karlsruhe, Sarstedt, Nümbrecht, Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Plastikpipetten | Costar 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Corning Incorporated, Corning, USA |
| Reaktionsgefäße | 15 ml, 50ml, | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Schlauch für Gene Gun- Patronen | Tefzel tubing | Bio-Rad, München |
| Sicherheitsreaktions- gefäße | 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Spritzen | Omnifix® 1 ml, Terumo® Syringen 10 ml | Braun, Terumo, Melsungen Europe, Leuven, Belgien |
| Sterilfilter | 0,2 µm 0,45 µm | Sarstedt AG, Nümbrecht Schleicher & Schuell, Dassel |
| Thermo-96-Loch-Platten | 96-Loch-Mikrotestplatte, Thermowell® GOLD | Corning Incorporated, USA |
| Ultra-Turrax® | T10 basic | Staufen |
| Zellsieb | Ø 40 µm | B&D Bioscience, Erembodegem, Belgien |

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| 2-β-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Aceton | Riedel-de Haen, Seelze |
| Agarose | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Alkopharm 70 (70% (v/v) Alkohol) | Brüggemann, Heilbronn |
| Ammoniumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumsulfat | Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Ratiopharm, Ulm |
| Bacto-Agar | Difco, Hedinger, Stuttgart |
| Bacto-Trypton | Difco, Hedinger, Stuttgart |
| Borsäure | Roth, Karlsruhe |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | PAA Laboratories, Cölbe |
| Brefeldin A | AppliChem, Gatersleben |
| Bromphenolblau, Na-Salz | Roth, Karlsruhe |
| Calciumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| CFA (Komplettes Freund's Adjuvans) | Difco, Hedinger, Stuttgart |
| CDP-Star™-Reagenz | Roche |
| Dexamethason (Dex) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth, Karlsruhe |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| DNBS (2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DNFB (2,4-Dinitrofluorbenzol) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Essigsäure (100%) | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol (96%) | BDH, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid, 1% Lösung (v/v) | Roth, Karlsruhe |
| Ethyldiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O (EDTA) | Roth, Karlsruhe |

| Substanz | Hersteller |
|--|---|
| Fötale Kälberserum (FCS) | PAA, Pasching, Österreich, PAN-Biotech, Aidenbach |
| L(+)-Glutamin | Roth, Karlsruhe |
| Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| ³ H-Thymidin (³ HTdR) | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Hefe-Extrakt | Gibco BRL, Karlsruhe |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Ionomycin | Invitrogen |
| Isopropanol (2-Propanol) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumacetat | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogencarbonat | Riedel-de Haën, Seelze |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) | Roth, Karlsruhe |
| Mycobacterium tuberculosis | Difco, Hedinger, Stuttgart |
| Natrium-Acetat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natrium-Citrat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Roth, Karlsruhe |
| Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | Cambrex, Charles City, USA |

| Substanz | Hersteller |
|---|--------------------------------|
| Pepton | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Pertussis Toxin (Bordetella pertussis) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth, Karlsruhe |
| PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| D(+)-Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure, 37 % | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure, 95 | Roth, Karlsruhe |
| Szintillatorflüssigkeit | Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim |
| Tri-Natriumcitrat | Roth, Karlsruhe |
| Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tris/HCl | Roth, Karlsruhe |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tween®-20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Wasser / Aqua bidest. (steril, pyrogenfrei) | Braun, Melsungen |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem H₂O aus einer Entsalzungsanlage angesetzt und, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Allgemeine Puffer und Lösungen

| | |
|-----------------|--|
| 1 x PBS | 0,14 M NaCl; 0,01M NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 |
| 20 x SSC-Puffer | 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7 |
| 50 x TAE-Puffer | 2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,5 mM Na ₂ EDTA; pH 8,5 |

| | |
|-------------------|---|
| 1 x TBE-Puffer | 89,15 mM Tris; 89 mM Natriumborat; 1,25 mM Na ₂ EDTA; pH 8,3 |
| 1 x TE-Puffer | 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM Na ₂ EDTA |
| Maleinsäurepuffer | 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5 |

DNA-Analyse

| | |
|----------------|--|
| Bromphenolblau | 4 M Harnstoff, 50% (v/v) Saccharose; 0,1 M Na ₂ EDTA; 0,1% (w/v) Bromphenolblau |
|----------------|--|

Durchflusszytometrische Analyse

| | |
|--------------|---|
| FACS-Medium | 2% (v/v) FCS (PAN), sterilfiltriert in 1 x PBS; 4°C |
| Fixierlösung | 0,7% (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS |

EAE-Induktion

| | |
|------------------------|---|
| MOGp35-55/CFA-Emulsion | Gemisch aus 1 Teil 5 mg/ml MOGp35-55, 5 Teilen CFA + 1% (v/w) Mycobacterium tuberculosis und 4 Teilen 1 x PBS, frisch angesetzt |
| Pertussis Toxin | 1 µg/ml in 1 x PBS gelöst, -20°C |

ELISA

| | |
|---------------------|---|
| Blockierungspuffer | 1% (w/v) BSA in 1 x PBS, 4°C (bei IL-17 zusätzlich 5% (w/v) Saccharose) |
| Beschichtungspuffer | 0,1 M NaHCO ₃ in H ₂ O; pH 8,2 |
| OPD-Substratpuffer | 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O; 0,1 M Na-Citrat x H ₂ O; 1 mg/ml OPD; 1 µl/ml H ₂ O ₂ |
| Stopplösung | 1 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) |
| Waschpuffer | 0,1% (v/v) Tween [®] 20 in 1 x PBS |

Erythrozyten-Lyse

| | |
|-------------------|---|
| Gey's Lyse Puffer | 10 mM KHCO ₃ ; 155 mM Ammoniumchlorid; 100 µM EDTA; pH 7,5; sterilfiltriert; 4°C |
|-------------------|---|

Gene Gun-Patronenherstellung

| | |
|---|--|
| CaCl ₂ -Lösung | 1 M CaCl ₂ in Aqua bidest.; 4°C |
| PVP(1-Ethenyl-2-pyrrolidon-Homopolymer) -Lösung | 0,075 mg/ml in EtOH abs.; frisch angesetzt |
| Spermidin-Lösung | 7,26 mg/ml in Aqua bidest.; 4°C |

Koloniefilterhybridisierung

| | |
|-------------------------------|--|
| Denaturierungslösung | 0,1 M NaOH; 1,5 M NaCl |
| Neutralisierungslösung | 0,2 M Tris/HCl; 0,3 M NaCl; 30 mM Na-Citrat; pH 7,5 |
| Blockierungslösung | 1% (w/v) Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer |
| Waschpuffer | Maleinsäurepuffer; 0,3% (v/v) Tween [®] 20 |
| Detektionspuffer | 0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; pH 9,5 |
| DIG Easy Hyb | Hybridisierungspuffer (Roche) |
| CPD-Star [™] -Lösung | 16,67 mM CDP-Star [™] (Roche) in Detektionspuffer |

Kontaktallergie

| | |
|-------------------------|--|
| Avertin-Stammlösung | 1 g/ml 2,2,2,-Tribromoethanol in tert. Amylalkohol (2-Methyl-2-butanol) gelöst |
| Avertin-Gebrauchslösung | 2,5% (v/v) Avertin-Stammlösung in 1 x PBS |
| DNBS-Lösung | 0,2% oder 0,4% (v/v) DNBS in einem Gemisch aus 4 Teilen Aceton und 1 Teil Olivenöl |
| DNFB-Lösung | 5 µM DNFB in 1 x PBS, sterilfiltriert |

MACS

| | |
|-------------|---|
| MACS-Puffer | 0,5% (v/v) FCS sterilfiltriert in 1 x PBS / 2 mM EDTA |
|-------------|---|

Plasmidisolierung

| | |
|----------|--|
| Puffer 1 | 50 mM Tris/HCl; 10 mM Na ₂ EDTA; pH 8,0; 100 µg/ml RNase; 4°C |
|----------|--|

| | |
|----------|--|
| Puffer 2 | 0,2 M NaOH; 1% (v/v) SDS |
| Puffer 3 | 3 M Kaliumacetat |
| QC | 1 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7; 15% (v/v) Isopropanol |
| QBT | 0,75 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0,15% (v/v) Triton X-100 |
| QF | 1,25 M NaCl; pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol |

Präparation von Zellinfiltraten aus dem ZNS

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) | 4°C; Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Percoll® | 4°C; Sigma-Aldrich, Steinheim |

Zellzahlbestimmung

| | |
|------------|---|
| Trypanblau | 0,01% (w/v) Trypanblau; 0,001% (w/v) Na-Azid in 1 x PBS |
|------------|---|

2.1.5 Medien und Medienzusätze

Sämtliche Medien für Bakterien- oder Zellkultur wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Lagerung von Medienzusätzen für die Zellkultur erfolgte bei -20°C.

Medien für *Escherichia coli*

| | |
|----------------------|---|
| Luria-Bertani-Medium | 1% (w/v) Trypton |
| (LB-Medium) | 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt |
| | 1% (w/v) NaCl, pH 7,5 |
| | 1,5% (w/v) Bacto-Agar bei Festmedien |
| | 100 µg/ml Ampicillin bei Selektionsmedien |

Medienzusätze für Zellkultur

| | |
|---------------------------------|--|
| Dexamethason (DEX) | 3,9247 mg Dex in 1 ml Ethanol (10^{-2} M), 20°C |
| Glutamin | 200 mM L(+)-Glutamin in 1 x PBS, sterilfiltriert, 4°C |
| β -Mercaptoethanol (5 mM) | 40 μ l β -Mercaptoethanol in 114 ml IMDM, sterilfiltriert, 4°C |
| Pen/Strep | 10^4 I.U. / ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 4°C |

Kulturmedium für BM-DC

| | |
|---|-------------------------------------|
| IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Gibco / Invitrogen) | |
| 10% (v/v) | FCS (PAA Laboratories) |
| 2 mM | Glutamin |
| 50 μ M | β -Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 μ g/ml | Streptomycin |
| 5% (v/v) | GM-CSF-haltiger X63-Kulturüberstand |

Kulturmedium für T-Zellen

| | |
|---|--------------------------|
| IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Gibco/Invitrogen) | |
| 5% (v/v) | FCS (PAN-Biotech) |
| 2 mM | Glutamin |
| 50 μ M | β -Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 μ g/ml | Streptomycin |

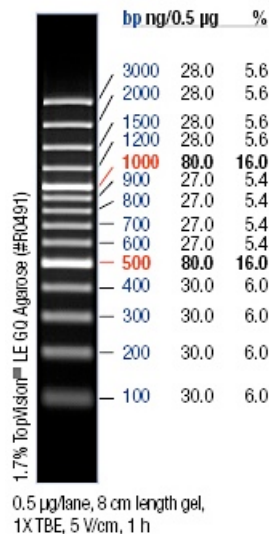
Zellkultur-Waschmedium

| | |
|---|-------------------|
| EMEM (Eagle's Minimum Essentiell Medium, Bio Whittaker/Cambrex) | |
| 2% (v/v) | FCS (PAN-Biotech) |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 μ g/ml | Streptomycin |

2.1.6 Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen wurden die Molekulargewichtsstandards *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* (Fermentas) oder *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas) parallel mit den Proben auf das Agarose-Gel aufgetragen.

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus



GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

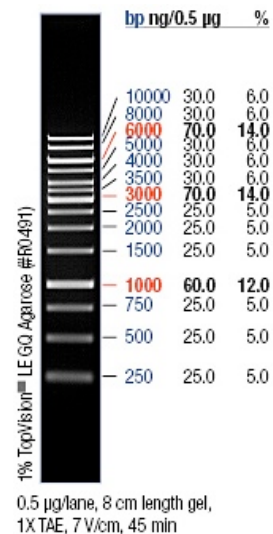


Abbildung 1: Molekulargewichtsstandards.

Zur Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel wurden die Molekulargewichtsstandards *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* oder *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* der Firma Fermentas verwendet.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Oligonukleotide wurden in deionisiertem H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Berechnung der *Annealing*-Temperatur T_A erfolgte anhand der Schmelztemperaturen T_M unter Verwendung folgender Formel:

$$T_A [^{\circ}\text{C}] = [(T_{M1} + T_{M2}) / 2] - 3$$

(Quelle: <http://www.eurofinsdna.com/service-corner/faqs-products-services/faqs-oligonucleotides.html>)

Tab. 1: Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung

| Bezeichnung | Nukleotidsequenz (5'-3') * | T _M [°C] | Verwendung |
|----------------|---|---------------------|---------------|
| li-[576]-s | AAGATCTTCGAGAGCTGGATG | 60,61 | Sequenzierung |
| li-[641]-s | ACCGAGGCTCCACCTAAAGTA | 62,57 | Sequenzierung |
| mli-ORFBam-s | <u>AGCGGCCGCGCCAT</u> GGATGACCAAC | 72,78 | Klonierung |
| mli-214Xho-as | <u>ACTCGAGCTTGGGACGGAACGCACC</u> | 71,14 | Klonierung |
| mMOG-ORFXho-s | <u>ACTCGAGATGGCCTGTTTGTGGAGC</u> | 67,86 | Klonierung |
| mMOG-ORFSal-as | <u>AGTCGACACAACCATCACTCAA</u> AAG | 62,94 | Klonierung |
| mMOG35-55-s | <u>GGCTCGAGATGGAGGTGGGTTGGTACCG</u> TTCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCTCT ACC | 79,8 | Klonierung |
| mMOG35-55-as | <u>GGGTCGACTTACTTGCCATTTTCGGTAGAG</u> GTGAACCACTCTTGAGAA | 74,33 | Klonierung |
| pCDH1-s | CAACGGGACTTTCCAAAATG | | Sequenzierung |
| pCDH1-as | GGCATTAAAGCAGCGTATCC | | Sequenzierung |

*: Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen; ATG-Startcodons sind fett markiert
s: sense; as: antisense; T_M: Schmelztemperatur

2.1.8 Vektoren und Plasmide

Tab. 2: Ausgangsplasmide

| Konstrukt-Bezeichnung | Alternative Bezeichnung | Transgen-Promotor | Resistenzgen | Größe [Bp] | Hersteller / Bezug |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|------------------|------------|-----------------------------------|
| pCDH1-MCS1 | pCDH1 | CMV | Amp ^R | 6226 | System Biosciences, Mountain View |
| pCDH1-Fscn | | Fscn | Amp ^R | 8826 | Dr. rer. nat. V. Besche |
| pCI-CMV-TGFβ | CMV-TGFβ | CMV | Amp ^R | | Dr. rer. nat. C. Barwig |
| pCI-CMV-IL10 | CMV-IL10 | CMV | Amp ^R | | Dr. rer. nat. M. Bros |

Amp^R: Ampicillin Resistenzgen; Bp: Basenpaare; CMV: Cytomegalie Virus Promotor; Fscn: Fascin Promotor

Tab. 3: Generierte Plasmide

| Konstrukt-Bezeichnung | Alternative Bezeichnung | Transgen-Promotor | Insert [Bp] | Resistenzgen |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|------------------|
| pCDH1-CMV-MOG | CMV-MOG | CMV | 758 | Amp ^R |
| pCDH1-CMV-MOGp35-55 | CMV-MOGp35-55 | CMV | 63 | Amp ^R |
| pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 | CMV-li-MOGp35-55 | CMV | 642 + 63 | Amp ^R |
| pCDH1-Fscn-MOG | Fscn-MOG | Fscn | 758 | Amp ^R |
| pCDH1-Fscn-MOGp35-55 | Fscn-MOGp35-55 | Fscn | 63 | Amp ^R |
| pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 | Fscn-li-MOGp35-55 | Fscn | 642 + 63 | Amp ^R |

Amp^R: Ampicillin Resistenzgen; Bp: Basenpaare; CMV: Cytomegalie Virus Promotor; Fscn: Fascin Promotor; li: Invariante Kette; MOG: Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein; MOGp35-55: MOG-Peptid 35-55.

2.1.9 Enzyme

2.1.9.1 Allgemeine Enzyme

Tab. 4: Allgemeine Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) | MBI Ferments, St. Leon-Rot |
| DNAse I | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Extravidin (Streptavidin-Peroxidase Konjugat) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| GoTaq [®] DNA Polymerase | Promega, Heidelberg |
| Klenow Fragment | MBI Ferments, St. Leon-Rot |
| Kollagenase Typ II | Gibco, Karlsruhe |
| RNAse A | MBI Ferments, St. Leon-Rot |
| SYBR [®] Green 490 Q-PCR Mastermix | Thermo-Abgene, Hamburg |
| T4 DNA-Ligase | MBI Ferments, St. Leon-Rot |

2.1.9.2 Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Tab. 5: Restriktionsendonukleasen

| Bezeichnung | Erkennungssequenz (5'-3') * |
|--------------|-----------------------------|
| <i>Apal</i> | GGGCC/C |
| <i>BamHI</i> | G/GATCC |
| <i>BcuI</i> | A/CTAGT |
| <i>EcoRI</i> | G/AATTC |
| <i>KpnI</i> | GGTAC/C |
| <i>NheI</i> | G/CTAGC |
| <i>SalI</i> | G/TCGAC |
| <i>XhoI</i> | C/TCGAG |

*: Die Schnittstelle innerhalb der Erkennungssequenz ist durch einen Schrägstrich (/) gekennzeichnet

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet. 2.4G2 ist ein Ratte-anti-Maus FcγRII/III (CD16/32) Antikörper vom Isotyp Ratte-IgG2b ¹⁴⁶ und wurde aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2 gewonnen. Der Antikörper wurde 1:100 verdünnt in PBS / 2% FCS eingesetzt (0,25 µg pro Probe).

Tab. 6: Primärantikörper für durchflusszytometrische Analysen

| Spezifität | Isotyp | Fluorochrom | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|------------|----------------|-------------|------------|--------|---------------|
| CD4 | Ratte-IgG2a, κ | PE-Cy5 | 1:200 | RM4-5 | BD Pharmingen |
| | Ratte-IgG2b, κ | PE-Cy7 | 1:800 | GK.1.5 | eBioscience |
| | Ratte-IgG2a, κ | PerCP | 1:200 | RM4-5 | BD Pharmingen |
| | Ratte-IgG2a, κ | Cy-Chrome™ | 1:400 | RM4-5 | BD Pharmingen |

2. Material und Methoden

| Spezifität | Isotyp | Fluorochrom | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|---|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|
| CD8 α | Ratte-IgG2a, κ | PerCP | 1:200 | 53-6.7 | BD Pharmingen |
| CD11b (Mac-1) | Ratte-IgG2b, κ | FITC | 1:50 | M1/70 | BD Pharmingen |
| | Ratte-IgG2b, κ | PE-Cy7 | 1:500 | M1/70 | eBioscience |
| CD11c | Hamster-IgG | FITC | 1:50 | HL3 | BD Pharmingen |
| | IgG | APC | 1:100 | N418 | eBioscience |
| CD14 | Ratte-IgG1, κ | FITC | 1:100 | rmC5-3 | BD Pharmingen |
| CD25 | Ratte-IgG2b, κ | PE | 1:100 | 3C7 | BD Pharmingen |
| | Ratte-IgM, κ | FITC | 1:100 | 7D4 | BD Pharmingen |
| CD40 | Ratte-IgG2a | FITC | 1:50 | 1C10 | Southern Biotech |
| CD44 | Ratte-IgG2b, κ | Biotin | 1:100 | IM7 | BD Pharmingen |
| CD45.2/Ly5.2 | Maus-IgG2a, κ | Biotin | 1:100 | 104 | eBioscience |
| | Maus-IgG1 | FITC | 1:100 | His41 | eBioscience |
| CD45R (B220) | Ratte-IgG2a, κ | APC-Cy7 | 1:400 | RA3-6B2 | BD Pharmingen |
| CD62L | Ratte-IgG2a, κ | FITC | 1:100 | MEL-14 | BD Pharmingen |
| CD80 | Hamster-IgG | FITC | 1:100 | 16-10A1 | eBioscience |
| CD83 | Ratte-IgG1 | PE | 1:50 | Michel-17 | eBioscience |
| CD86 | Ratte-IgG2a, κ | FITC | 1:100 | GL1 | BD Pharmingen |
| CD90 | Ratte-IgG2b | FITC | 1:100 | 30-H12 | Miltenyi |
| CD90.1/Thy1.1 | Maus-IgG2a, κ | PE-Cy5 | 1:500 | HIS-51 | eBioscience |
| CD90.2/Thy1.2 | Ratte-IgG2a, κ | APC | 1:1200 | 53-2.1 | eBioscience |
| | Ratte-IgG2a, κ | FITC | 1:200 | 53-2.1 | eBioscience |
| | Ratte-IgG2a, κ | PE | 1:600 | 30-H12 | BD Pharmingen |
| F4/80 | Ratte-IgG2a | FITC | 1:100 | BM8 | Biolegend |
| Fascin | Maus-IgG1 | pure | 1:50 | 55K-2 | Dako |
| Foxp3 | Ratte-IgG2a, κ | FITC | 1:100 | FJK-16s | eBioscience |
| | Maus-IgG1 | PE | 5 μ l/Probe | 3G3 | Miltenyi |
| GR-1 | Ratte-IgG2b, κ | FITC | 1:50 | RB6-8C5 | BD Pharmingen |
| I-A ^d /I-E ^d (MHCII) | Ratte-IgG2b, κ | FITC | 1:100 | 2G9 | BD Pharmingen |
| | Ratte-IgG2b | PE | 1:500 | M5/114.15.2 | eBioscience |
| IFN- γ | Ratte-IgG1, κ | FITC | 1:500 | MXG1.2 | BD Pharmingen |

| Spezifität | Isotyp | Fluorochrom | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|---------------|-----------------------|-------------|------------|------------|---------------|
| IL-17A | Ratte-IgG1, κ | PE | 1:200 | TC11-18H10 | BD Pharmingen |
| Ly6-C | Ratte-IgM | FITC | 1:50 | AL-21 | BD Pharmingen |
| Ly6-G | Ratte-IgG2a | PE | 1:50 | IA8 | BD Pharmingen |
| PD-1 | Arm.Hamster-IgG | PE | 1:100 | J43 | eBioscience |
| V β -11 | Ratte-IgG2b, κ | PE | 1:200 | RR3-15 | BD Pharmingen |

Tab. 7: Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Analysen

| Spezifität | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|------------|-------------|------------|------------------|
| Maus IgG1 | FITC | 1:50 | Southern Biotech |

Tab. 8: Streptavidin-Konjugate für durchflusszytometrische Analysen

| Spezifität | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|------------|-------------|------------|---------------|
| Biotin | PE | 1:400 | BD Pharmingen |
| Biotin | PerCP | 1:100 | BD Pharmingen |

2.1.10.2 Antikörper zur Zellseparation

Tab. 9: Antikörper für Zellseparation

| Antikörper | Klon | Hersteller / Bezug |
|-------------------|-------|----------------------------------|
| PC61-bio (CD25) * | PC-61 | Dipl. Biol. N. Dehzad (AG Taube) |
| CD4 | L3T4 | Miltenyi |

*: PC61-bio wurde in Kombination mit Streptavidin-MicroBeads (Miltenyi) eingesetzt.

2.1.10.3 Antikörper für ELISA

Tab. 10: Capture-Antikörper für ELISA

| Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Endkonzentration) | Hersteller / Bezug |
|--|----------------|-----------|---|--------------------------------------|
| Anti-Maus-IFN- γ | Ratte-IgG1 | R4-6A2 | (1:1000 in 0,1 M NaHCO ₃) | Eigenproduktion in der Arbeitsgruppe |
| Anti-Maus IL-5 | Ratte-IgG1 | 11B11 | 0,5 mg/ml (1 ng/ml in 0,1 M NaHCO ₃) | BD Pharmingen |
| Anti-Maus IL-10 | Ratte-IgG2b, k | JESS-16E3 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml in 1x PBS) | eBiosciences |
| Anti-Maus IL-17 | Ratte-IgG2a | 50101 | 0,5 mg/ml (5 μ g/ml in 1 x PBS) | R&D Systems |
| Rekombinante humane TGF- β sRII/Fc Chimäre | - | - | 0,5 mg/ml (0,2 μ g/ml in 1x PBS) | R&D Systems |

Tab. 11: Detektionsantikörper für ELISA

| Antikörper (Biotin-Konjugate) | Isotyp | Klon | Konzentration (Endkonzentration) Inkubation | Hersteller / Bezug |
|----------------------------------|---------------|------------|---|--------------------------------------|
| Anti-Maus IFN- γ | Ratte-IgG1 | AN18.17.24 | (1:5000 verdünnt) 60 min, 37°C | Eigenproduktion in der Arbeitsgruppe |
| Anti-Maus IL-5 | Ratte-IgG2a | TRFK4 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 60 min, 37°C | BD Pharmingen |
| Anti-Maus IL-10 | Ratte-IgG1, k | JESS-2A5 | 0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml) 60 min, RT | eBiosciences |
| Anti-Maus IL-17 | Ziege-IgG | 50101 | 50 μ g/ml (0,25 μ g/ml) 2 h, RT | R&D Systems |
| Anti-Mensch TGF- β | Huhn-IgY | - | 050 μ g/ml (0,1 μ g/ml) 2 h, RT | R&D Systems |

2.1.11 Peptide

Tab. 12: Peptide

| Peptid * | Konzentration | Aminosäuresequenz | Hersteller |
|-----------|---------------|-----------------------|--|
| MOGp35-55 | 5 mg/ml | MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK | Research Genetics, Huntsville, Alabama, USA |

*: MOGp35-55 wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. A. Waisman zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Fertigsysteme

Tab. 13: Fertigsysteme

| Substanz | Hersteller |
|---|----------------|
| Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit | BD Biosciences |
| DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set | Roche |
| Mouse Regulatory T Cell Staining Kit | eBioscience |
| Plasmid Mini / Midi / Maxi Kit | Qiagen |
| RNeasy® Plus Mini Kit | Qiagen |

2.1.13 Bakterienstamm

Tab. 14: Bakterienstamm

| Stamm | Genotyp |
|----------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | $F'\{proAB, lacIq, lacZDM15, Tn10 (TetR)\} mcrA, D(mmr-hsdRMS-mcrBC), f80lacZDM15, DlacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rspL(StrR), endA1, nupGI-$ |

2.1.14 Mausstämme

Tab. 15: Mausstämme

| Spezies | Zucht-name | H-2 Haplo-typ | Transgen-Beschreibung |
|---------------------|-----------------|------------------|---|
| <i>Mus musculus</i> | C57BL/6 | H-2 ^b | - |
| <i>Mus musculus</i> | Thy1.1 (CD90.1) | H-2 ^b | Thy1.1 ist ein Allel zu Thy1.2 (wird von den meisten Mausstämmen exprimiert; z.B. C57BL/6) und unterscheidet sich von diesem durch die Aminosäure Arginin anstatt Glutamin an Position 108. |
| <i>Mus musculus</i> | 2D2 / Thy1.1 | H-2 ^b | spezifischer T-Zellrezeptor für MOGp35-55 (V α 3.2 and V β 11) ¹⁴⁷ ; Thy1.1 (siehe oben). |

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Alle bakteriologischen Arbeiten wurden mit sterilen oder sterilisierten Materialien sowie mit autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Kulturen erfolgte stets unter aeroben Bedingungen in einem Brutschrank bei 37°C. Flüssigkulturen wurden dabei mit einem Schüttler bei 220 upm inkubiert. Wenn Einzelkolonien, die von einem einzelnen Bakterienklon stammen, benötigt wurden, wurden Bakterien auf LB-Agarplatten herangezogen. Die Kultivierung solcher LB-Agarplatten erfolgte immer mit der Schalenunterseite nach oben bei 37°C im Brutschrank.

2.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* TOP10-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden *E. coli* TOP10 Zellen mit Hilfe eines Trizalcki-Spatels auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie entnommen und für die Inokulation einer 50 ml LB-Flüssigkultur verwendet. Diese Vorkultur wurde bei 37°C und 220 upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit dieser Vorkultur 1 Liter LB-Flüssigmedium angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen

Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3$ bis $0,4$) bei 37°C und 220 upm inkubiert. Die 1 L-Flüssigkultur wurde daraufhin auf zwei eisgekühlte Zentrifugationsbecher verteilt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei $2.000 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden daraufhin zweimal mit 500 ml autoklaviertem, eisgekühltem, doppelt deionisiertem H_2O gewaschen und bei $3.400 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellsedimente in 4 bis 6 ml eisgekühlter 10% (v/v) Glycerollösung aufgenommen und auf Eis aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation elektrokompenter *E.coli* TOP10-Zellen

Als Transformation wird im Allgemeinen die Aufnahme von Fremd-DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. In der Gentechnik kann die Transformation verwendet werden, um gezielt rekombinante Fremd-DNA in die Bakterienzelle einzuschleusen. Dabei ist das Ziel dieser Methode, die eingeschleuste Fremd-DNA unter Ausnutzung der DNA-Synthesemaschinerie der Wirtszelle zu amplifizieren. Aus diesem Grund ist die Fremd-DNA in der Regel ein zirkuläres, replikationsfähiges Plasmid, welches ein DNA-Integrat sowie ein Antibiotikum-Resistenzgen zur Selektion beinhaltet. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Transformation wird als Elektroporation bezeichnet. Hierbei wird ein elektrisches Feld genutzt, um die Zellmembran zu permeabilisieren, so dass die Fremd-DNA in die Bakterienzelle gelangen kann.

Die bei -80°C konservierten elektrokompenten *E. coli* TOP10 Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 bis 5 μl EtOH-gefälltem Ligationsansatz versetzt und für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Zellsuspension in eine eisgekühlte $0,1$ cm Elektroporationsküvette überführt und mit Hilfe eines Elektroporators ($2,1$ kV, 125 μF und 200 Ω) wurde für $4,4$ bis $4,6$ Millisekunden ein elektrisches Feld auf die DNA-Zellsuspension aufgelegt. Danach wurden die Zellen sofort in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und mit 500 μl LB-Medium versetzt. Die transformierte Zellsuspension wurde für 40 bis 60 min bei 37°C und 220 upm inkubiert, um die Expression des in dem Plasmid kodierten Resistenzgens Ampicillin (Amp) zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Zellen mit 10.000 upm für 5 min sedimentiert und in 100 μl LB/Amp-Flüssigmedium

aufgenommen. Die transformierten Bakterienzellen wurden abschließend entweder auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert oder zur Inokulation 1:500 mit LB/Amp-Flüssigmedium verdünnt und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.3 Koloniefilterhybridisierung zur Identifizierung rekombinanter Plasmid-DNA in transformierten Klonen

Die Methode der Koloniefilterhybridisierung nach Grunstein und Hogness¹⁴⁸ ermöglicht die Untersuchung einer hohen Anzahl an Bakterienklonen auf das Vorhandensein eines klonierten DNA-Integrats. Im Allgemeinen basiert diese Methode auf der Fähigkeit von zwei komplementären DNA-Einzelsträngen untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können, die sogenannte Hybridisierungsreaktion. Bei der Koloniefilterhybridisierung werden zunächst unter alkalischen Bedingungen Bakterienzellen lysiert und die freigesetzte DNA einzelsträngig auf Filter fixiert. Daraufhin können komplementäre DNA-Einzelstränge einer markierten DNA-Sonde mit der Basensequenz des potentiell vorhandenen DNA-Integrats hybridisieren. Abhängig von der Art der Markierung lassen sich die DNA-Sonden anschließend nachweisen, was letztendlich auf das Vorhandensein des klonierten DNA-Integrats hinweist. In dieser Arbeit wurden Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden eingesetzt, welche sich mit spezifischen DIG-Antikörpern markieren lassen. Der Nachweis erfolgt über die an die DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase. Diese spaltet das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star™ (Roche). Dabei wird Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert, welches mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Zur Vorbereitung wurden MOG-spezifische, DIG-markierte DNA-Sonden durch chemische Markierung mit dem *DIG-Chem-Link Labelling and Detection Kit* (Roche) hergestellt. Bei dieser Art der DNA-Markierung werden die DIG-Moleküle koordinativ an die N7-Position des Adenosins und Guanosins der Nukleinsäure gebunden. Als Nukleinsäure wurde aus Gehirn-cDNA mittels PCR amplifizierte und mittels Gelelektion aufgereinigte MOG-Template-DNA verwendet. Zunächst wurden 3 µg der MOG-Template-DNA mit 3 µl *DIG-Chem-Link* gemischt und bei 85°C für 30 min inkubiert und anschließend 5 µl einer Stop-Lösung hinzugegeben. Bis zur Verwendung wurde die DIG-markierte MOG-DNA-Sonde bei -20°C aufbewahrt.

Zur weiteren Vorbereitung wurden zwei Nylonmembranen (\varnothing 82 mm; Roche) durch Aufzeichnen eines Gitternetzes in circa 200 durchnummerierte Quadrate unterteilt. Anschließend wurden die beiden identischen Nylonmembranen jeweils auf eine LB/Amp-Agarplatte, die zuvor noch mit 300 μ l LB/Amp-Flüssigmedium befeuchtet worden war, luftblasenfrei aufgelegt. Nun wurden die zu untersuchenden Bakterienkolonien, die nach erfolgter Klonierung auf einer LB/Amp-Agarplatte kultiviert wurden, mit einer Einweg-Pipettenspitze aufgenommen und durch diagonales Ausstreichen auf die Nylonmembran-Duplikate in einem Quadrat mit jeweils gleicher Nummerierung aufgetragen. Die beiden angeimpften LB/Amp-Agarplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Eines der beiden Nylonmembran-Duplikate wurde auf der LB/Amp-Agarplatte belassen und bei -4°C aufbewahrt, das andere Duplikat für die DNA-Hybridisierung verwendet. Hierzu wurde die mit den Bakterienklonen bewachsene Nylonmembran zunächst in einer alkalischen Denaturierungslösung unter leichtem Schwenken für 15 min bei RT inkubiert, um die Bakterienzellen zu lysieren und die Plasmid-DNA-Doppelstränge von einander zu trennen. Anschließend erfolgte unter leichtem Schwenken in Neutralisierungslösung eine Inkubation für 15 min bei RT. Zuletzt wurde die Nylonmembran für 10 min in einem äquilibrierenden Natriumcitratpuffer inkubiert. Um die DNA kovalent an die Nylonmembran zubinden, wurde die Nylonmembran für 40 Sekunden mit 0,36 J/cm² UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Nylonmembranhaftende Bakterienüberreste wurden durch Inkubation mit einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml; 1:10 in 2 x SSC verdünnt) für 1 Stunde bei 37°C und unter leichtem Schwenken degradiert. Um die Bakterienreste vollständig zu entfernen, wurde die Nylonmembran anschließend in doppelt deionisiertem Wasser durch Schwenken in einer großvolumigen Schale gewaschen und zwischen zwei mit 2 x SSC getränkten Lagen 3 MM Whatman-Papier gepresst.

Vor der Hybridisierungsreaktion wurde die mit einzelsträngiger Plasmid-DNA beschichtete Nylonmembran prähybridisiert, um potentiell unspezifische DNA-Sonden-Bindungsstellen abzusättigen. Hierzu wurde die Nylonmembran in circa 50 ml *DIG Easy Hyb* bei 37°C unter leichtem Schwenken für 2 Stunden inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung (DIG-markierter DNA-Sonde gelöst in *DIG Easy Hyb*) ersetzt und bei 37°C unter leichtem Schwenken über Nacht inkubiert. Ungebundene DNA-Sonde wurde durch zweimaliges Waschen in 2 x SSC / 0,1% (w/v) SDS bei RT entfernt. Danach wurde die Nylonmembran zwei

Mal mit 0,5 x SSC / 0,1% (w/v) SDS bei 68°C für 10 min gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für den anti-DIG-Antikörper wurde die Nylonmembran für 1 Stunde bei RT in circa 20 ml Blockierungslösung inkubiert. Der anti-DIG-Antikörper wurde vor Gebrauch bei 6.000 upm zentrifugiert und danach 1:20.000 in 1 ml Blockierungspuffer verdünnt und anschließend auf die mit Blockierungslösung befeuchtete Nylonmembran gegeben. Die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper erfolgte für 30 min bei RT. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen der Nylonmembran in Waschpuffer (Maleinsäurepuffer + 0,3% (v/v) Tween[®] 20 für 15 min bei RT entfernt. Für die abschließende Antikörperdetektion wurde die Nylonmembran für 5 min in Detektionspuffer inkubiert. Währenddessen wurde das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star[™] 1:150 in Detektionspuffer verdünnt. Die Nylonmembran wurde mit der Substratlösung benetzt, mit einer Plastikfolie versiegelt und für 2 Stunden bei RT in Dunkelheit aufbewahrt. Zuletzt wurde die versiegelte Nylonmembran zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Expositionskammer eingelegt. Der Röntgenfilm wurde auf diese Weise für 1 bis 12 min exponiert und anschließend entwickelt. Durch Übereinanderlegen des entwickelten Röntgenfilms mit der Nylonmembran auf einem Durchlichttisch konnte die Position bzw. Nummerierung der Bakterienklone ermittelt werden, die ein positives Signal ergaben. Die entsprechenden Bakterienkolonien auf der bei 4°C gelagerten Duplikat-Nylonmembran wurden zum Animpfen einer LB/Amp-Flüssigkultur verwendet.

2.2.4 Aufreinigung von DNA

2.2.4.1 DNA-Isolierung zur Analyse transformierter Klone

Diese Methode nach Beuken et al.¹⁴⁹ ermöglicht eine effiziente und schnelle Analyse von transformierten Bakterienkulturen nach einer Klonierung. Hierbei wird die bakterielle Nukleinsäure aufgereinigt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dadurch werden die Plasmide von dem Bakterienchromosom getrennt. Anhand der unterschiedlichen Laufweiten der Plasmide kann auf potentiell positive Klone geschlossen werden.

Nach einer Klonierung wurden die transformierten Bakterien auf LB/Amp-Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt und

5 ml LB/Amp-Flüssigmedium damit inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 220 upm über Nacht. Anschließend wurden 200µl der Bakterienkulturen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4.000 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 35 µl Bromphenolblau aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann mit 25 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (PCI) gemischt und zur vollständigen Zellyse für 5 min bei RT inkubiert. Um die wässrige, nukleinsäurehaltige Bromphenolblau-Phase von der farblosen proteinhaltigen PCI-Phase zu trennen, wurde das Gemisch bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert. Abschließend wurden 15 µl der nukleinsäurehaltigen Phase entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Diese Methode wurde zur Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab ohne Benutzung von kommerziellen Fertigsystemen verwendet. Hierzu wurden 4 ml einer Bakterienkultur in zwei Portionen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und jeweils bei 6.000 x g für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Puffer P1 aufgenommen. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer P2. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und für 5 min stehen gelassen. Durch Zugabe von 350 µl des neutralisierenden Puffers P3 und gründliches Schütteln des Reaktionsgefäßes wurde die alkalische Lyse gestoppt. Die Zellüberreste wurden mit 13.000 upm abzentrifugiert und der Plasmid-DNA-haltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA. Hierzu wurde der Überstand mit 1 ml Isopropanol gemischt und für 30 min bei -20°C aufbewahrt. Die ausgefällte DNA wurde mit 13.000 upm für 20 min pelletiert und um Salze zu entfernen nochmals mit 70% Ethanol gewaschen. Das Reaktionsgefäß wurde für 8 min mit 13.000 upm zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette entfernt. Das ausgefällte DNA-Pellet wurde daraufhin für 5 bis 10 min mit geöffnetem Deckel getrocknet, in 20 µl doppelt deionisiertem H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen

Die Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen erfolgte mittels der Fertigsysteme von QIAGEN. Abhängig von der benötigten DNA-Menge wurde das QIAGEN *Plasmid Mini Kit* für eine 5 ml Bakterienkultur, das QIAGEN *Plasmid Midi Kit* für eine 250 ml Bakterienkultur oder das QIAGEN *Plasmid Maxi Kit* für eine 500 ml Bakterienkultur verwendet. Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Durchführung die Angaben des Herstellers befolgt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde abschließend in doppelt deionisiertem H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA

Für in vitro Experimente mit BM-DC und in vivo Experimente mit Mäusen wurde die Plasmid-DNA endotoxinfrei aufgereinigt. Hierfür wurde das Fertigsystem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* von QIAGEN verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte, endotoxinfreie Plasmid-DNA wurde abschließend in 300 bis 500 µl doppelt deionisiertem H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.5 DNA-Aufreinigung durch Elution aus Agarose-Gelen

Um spezifische DNA-Fragmente nach einer PCR (siehe 2.2.5) oder einem DNA-Verdau (siehe 2.2.8) aus den Lösungen aufzureinigen, wurden diese zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.7) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Rückgewinnung der DNA durch Elution aus dem Agarose-Gel. Hierfür wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die DNA wurde in doppelt deionisiertem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.6 DNA-Aufreinigung nach enzymatischen Reaktionen

Um DNA nach enzymatischen Reaktionen wie der Dephosphorylierung (siehe 2.2.10) und der Ligation (siehe 2.2.11) aufzureinigen, wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde in doppelt deionisiertem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein schnelles und effizientes Verfahren, um einen definierten Nukleinsäurebereich in großen Mengen zu amplifizieren. Kary B. Mullis entwickelte diese Methode 1983¹⁵⁰ und erhielt 1993 dafür den Nobelpreis der Chemie.

Das Prinzip der PCR beruht auf der *in vitro* Synthese von doppelsträngiger DNA anhand einer einzelsträngigen Nukleinsäure, welche als Matrize dient. Die PCR setzt voraus, dass die flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden Nukleinsäureabschnitts in ihrer Sequenz bekannt sind, damit geeignete Oligonukleotide spezifisch binden und als Primer dienen können. Die DNA-Synthese erfolgt an der 3'-Hydroxyl-Gruppe der Primer und wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert. Prinzipiell lässt sich der Amplifikationszyklus einer PCR in drei Phasen unterteilen. In der ersten Phase wird die DNA auf 94°C erhitzt, um eine Denaturierung der doppelsträngig vorliegenden DNA-Matrize zu induzieren. Anschließend können in der sogenannten *Annealing*-Phase die als Primer dienenden Oligonukleotide binden. Die *Annealing*-Temperatur ist dabei von dem durch Länge und GC-Gehalt bedingtem T_M -Wert (Schmelztemperatur) der Oligonukleotide abhängig. Nach der Primerhybridisierung erfolgt in der Elongationsphase die DNA-Synthese durch die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C . Nach dem ersten Amplifikationszyklus wird somit aus den beiden einzelsträngigen DNA-Matrizen der Bereich zwischen den beiden Primern zu doppelsträngiger DNA synthetisiert. In den weiteren Amplifikationszyklen können die neu synthetisierten DNA-Moleküle ebenfalls als Matrize dienen, wodurch der entsprechende DNA-Abschnitt bei jedem weiteren Zyklus exponentiell amplifiziert wird.

Bei den durchgeführten PCR wurde die *GoTaq*[®]-DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Dieses Enzym ist eine modifizierte Form der aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* stammenden *Taq*-DNA-Polymerase, welcher die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Desweiteren wurde der *5 x Green GoTaq*[®] *Reaction Buffer* von Promega benutzt. Dieser Reaktionspuffer enthält bereits das für die PCR notwendige MgCl₂ in einer Konzentration von 7,5 mM.

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tab. 16: Komponenten der PCR

| Reagenz | Volumen |
|---|---------|
| DNA-Matrize (100 bis 250 ng) | 1 µl |
| <i>Sense</i> Primer (10 pmol/µl) | 2 µl |
| <i>Antisense</i> Primer (10 pmol/µl) | 2 µl |
| dNTP-Mix (je 10 mM) | 0,5 µl |
| 5 x Reaktionspuffer (7,5 mM MgCl ₂) | 4 µl |
| <i>GoTaq</i> [®] DNA-Polymerase | 0,5 µl |
| Doppelt deionisiertes H ₂ O | 10 µl |

Für die PCR wurde der *Gradient Cycler MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200* der Firma MJ Research Inc. benutzt.

Nachdem die DNA-Proben zu Beginn für 2 Minuten bei 95°C denaturiert wurden, durchliefen diese folgenden Amplifikationszyklus 33 Mal:

Tab. 17: Amplifikationszyklus einer PCR

| | Temperatur | Zeit | Zyklus |
|---------------|------------|-------|--------|
| Denaturierung | 94 °C | 1 min | x 33 |
| Annealing | x °C * | 1 min | |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |

* Die *Annealing*-Temperatur T_A wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur T_M der Primer gewählt (siehe 0)

Es folgte eine abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 Minuten.

Um die Spezifität der Primer-Hybridisierung und somit spezifische Amplifikation des I PCR-Produkts zu erhöhen, wurde in einigen Fällen eine so genannte *Touch Down-PCR* durchgeführt. Hierbei wird in dem ersten Amplifikationszyklus eine besonders hohe *Annealing*-Temperatur gewählt, um eine unspezifische Primerbindung zu verhindern. Nachdem eine spezifische Amplifikation des relevanten DNA-Abschnitts stattgefunden hat und diese als Matrize dient, wird in den weiteren Amplifikationszyklen sukzessive die *Annealing*-Temperatur bis zum optimalen T_M -Wert erniedrigt. Auch bei der *Touch Down-PCR* wurde eine anfängliche Denaturierung der DNA für 2 Minuten bei 95°C durchgeführt. Anschließend wurden folgende Amplifikationszyklen gewählt:

Tab. 18: Amplifikationszyklen der *Touch Down-PCR*

| | Temperatur | Zeit | Zyklus |
|---------------|------------|-------|--------|
| Denaturierung | 94 °C | 1 min | |
| Annealing | 68 °C | 1 min | x 1 |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |
| Denaturierung | 94 °C | 1 min | |
| Annealing | 66 °C | 1 min | x 1 |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |
| Denaturierung | 94 °C | 1 min | |
| Annealing | 64 °C | 1 min | x 1 |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |
| Denaturierung | 94 °C | 1 min | |
| Annealing | 62 °C | 1 min | x 34 |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |

Es folgte eine abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 Minuten. Die DNA der PCR-Proben wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Des Weiteren wurden PCR-Produkte, die für nachfolgende Experimente benötigt

wurden, mittels Gel-Elution (2.2.4.5) aufgereinigt. Die Lagerung der PCR-Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen erfolgte durch Messung der Extinktion in einem Photometer. Bei dieser Messung wird die Absorption bzw. Abschwächung der Strahlungsintensität bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, da hier Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum besitzen. Die DNA-Konzentration (c) wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz durch Multiplikation der Extinktion E_{260} mit dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) und dem Verdünnungsfaktor ermittelt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht hierbei eine Extinktion von 1 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml.

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

Neben der Extinktion E_{260} wurde auch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt, da aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan Strahlung dieser Wellenlänge stärker absorbieren. Durch die Bildung des Quotienten (E_{260}/E_{280}) konnte somit eine Einschätzung über die Reinheit bzw. Protein-Kontamination der DNA-Lösung getroffen werden. Eine reine DNA-Lösung sollte hierbei einen E_{260}/E_{280} -Quotienten von 1,8 bis 2,0 haben.

In allen Fällen wurden von den DNA-Lösungen jeweils drei Verdünnungen mit doppelt deionisiertem Wasser in einem Verhältnis von 1:100 angesetzt und zur Bestimmung der Konzentration ihre Mittelwerte berechnet.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte durch Elektrophorese in einem horizontalen Agarose-Gel. In einem elektrischen Spannungsfeld wandert hierbei die bipolare DNA in Abhängigkeit von ihrer Fragmentlänge und im Falle von ringförmiger Plasmid-DNA in Abhängigkeit von ihrer dreidimensionalen Struktur durch die Agarose-Gelmatrix in Richtung Anode und wird dabei aufgetrennt.

Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1 × TAE-Puffer gelöst, wobei die Konzentration der Agarose in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht der erwarteten DNA-Fragmente zwischen 1 % und 2 % (w/v) gewählt wurde. Nach dem Aufkochen kühlte die homogene, flüssige Agarose-Gel-Lösung bis auf eine Temperatur von circa 60 °C ab, wurde dann mit 10 µl Ethidiumbromid-Lösung versehen, und in eine Gelkammer gegossen. Nach einer Polymerisierungsdauer von ca. 30 Minuten war das Agarose-Gel fest geworden und wurde anschließend in die mit 1 × TAE-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer platziert. Der Kamm wurde entfernt und die DNA-Proben in die Gel-Taschen pipettiert. Um die Laufgrenze während der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die DNA-Proben vor dem Auftragen mit $\frac{1}{6}$ Volumen 6 × *Loading Dye Solution* (Fermentas) versehen. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen wurde zusätzlich als Molekulargewichtstandard der *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* (Fermentas) oder der *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas) auf das Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.1.6).

Die DNA-Proben wurden bei einer Spannung von 70 bis 120 Volt bei 150 mA aufgetrennt. Die Laufzeit betrug zwischen 45 Minuten und 2 Stunden.

Anschließend wurde das Agarose-Gel auf einem Transilluminator mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm bestrahlt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid emittiert dabei Licht in einer Wellenlänge von 590 nm. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Geldokumentationssystems *Quantum 3000* (Vilber Lourmat) und dem Programm *Vision-Capt* (Vers. 15.06; Vilber Lourmat) dokumentiert.

2.2.8 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind seit der Aufklärung ihres molekularen Funktionsprinzips durch W. Arber et al. ein wichtiges Instrument der Molekularbiologie geworden. Hierfür erhielt 1978 W. Arber zusammen mit D. Nathans und H.O. Smith den Nobelpreis für Medizin. Die biologische Bedeutung von Restriktionsendonukleasen liegt im Schutz der Wirtszelle vor eindringender Fremd-DNA. Dies erfolgt durch eine sequenzspezifische, hydrolytische Spaltung der Fremd-DNA. Die DNA der Wirtszelle wird dabei mittels Methylierung durch zelleigene Methylasen vor diesem Verdau geschützt¹⁵¹.

Die Typ II Restriktionsendonukleasen sind auf Grund ihrer Eigenschaften für molekularbiologische Arbeiten von besonderer Bedeutung. Diese homodimeren

Enzyme schneiden die DNA innerhalb der Erkennungssequenz, was ein gezieltes Fragmentieren der DNA ermöglicht. Die Erkennungssequenz sind Palindrome mit einer Länge von 4 bis 8 Basenpaaren. Für die Enzymaktivität werden freie Mg^{2+} -Ionen benötigt und die Trennungen der 3'-5'-Phosphodiesterbindungen der beiden DNA-Stränge resultieren in 3'-Hydroxyl-Gruppen und 5'-Phosphat-Gruppen. Je nach Spezifität der Typ II Restriktionsendonuklease können dabei so genannte „*sticky ends*“ mit 3'- oder 5'-Sequenzüberhang oder sogenannte *blunt ends* ohne Überhang an den DNA-Strängen entstehen.

Für Restriktionen wurden ausschließlich Enzyme und Puffer der Firma MBI Fermentas verwendet und bei der Durchführung der Reaktionen wurden die Instruktionen des Herstellers befolgt. Für Klonierungsexperimente wurden Doppelverdauungen mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt. Dies ermöglichte gerichtete Klonierungen von DNA-Fragmenten in Plasmid-DNA.

Die Restriktionen wurden in 20 μ l Ansätzen mit 500 bis 1000 ng DNA und mit 3 bis 6 Units Enzym durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 3 bis 16 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C. Anschließend wurden die Restriktionsansätze für 20 Minuten bei 80 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNA auf einem Agarose-Gel (siehe 2.2.7). DNA-Fragmente von Restriktionsansätzen, die für weitere Klonierungen von Bedeutung waren, wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.5) aufgereinigt. Die restringierten DNA-Proben wurden zur Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.9 Generierung von blunt end-DNA

Um nichtkompatible DNA-Sequenzüberhänge miteinander ligieren zu können, wurden diese mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I behandelt. Dieses Enzym verfügt über eine 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch ist es in der Lage, überstehende 5'-DNA-Enden aufzufüllen und überstehende 3'-DNA-Enden zu entfernen.

In dieser Arbeit wurde das Klenow-Fragment von Fermentas nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Tab. 19: Reaktionsansatz für die Generierung von *blunt end*-DNA

| Komponente | Menge |
|------------------------------|----------------------|
| lineare DNA | 0,1 bis 4 µg |
| dNTPs (je 2 mM) | 0,5 µl |
| 10x Klenow Reaktionspuffer | 2 µl |
| Klenow-Fragment (10 u/µl) | 0,5 µl |
| Doppelt deionisiertes Wasser | bis 20 µl Endvolumen |

Das Enzym wurde nach der Reaktion durch Inkubation bei 80°C für 20 min inaktiviert. Linearisierte Plasmid-DNA wurde anschließend dephosphoryliert (siehe 2.2.10), aufgereinigt (siehe 2.2.4.6) und in einer *blunt end*-Ligation (siehe 2.2.11) eingesetzt.

2.2.10 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Linearisierte Plasmid-DNA wurde für nachfolgende Klonierungen dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung des Vektors zu unterbinden. Hierfür wurde die *FastAP™ Alkaline Phosphatase* von Fermentas verwendet. Dieses Enzym ist eine alkalische Phosphatase, welche die Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern katalysiert. Bei dieser Reaktion kommt es zur Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmid-DNA. Da die linearisierte Plasmid-DNA somit keine 5'-Phosphatgruppen besitzt, kann bei einer anschließenden Ligationsreaktion die Ligase nicht die Bildung von 5'-3'-Phosphodiesterbindung zwischen den freien Plasmid-DNA-Enden katalysieren. Somit wird eine intramolekulare Reaktion verhindert.

Für die Dephosphorylierung von verdauter Plasmid-DNA wurde 1 µl *FastAP™ Alkaline Phosphatase* (1 u/µl; Fermentas) in den Reaktionsansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 bis 40 Minuten. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 75°C für 5 min gestoppt. Es folgte eine Aufreinigung der Plasmid-DNA (siehe 2.2.4.6), bevor sie für eine Ligation (siehe 2.2.11) eingesetzt wurde.

2.2.11 Ligation von DNA

Das Enzym T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen von doppelsträngigen Nukleinsäuren mit *sticky* oder *blunt ends*¹⁵². Des Weiteren ermöglicht die T4 DNA-Ligase die Reparatur von Einzelstrangbrüchen bei doppelsträngigen Nukleinsäuren. Um die chemische Reaktion katalysieren zu können, benötigt die T4 DNA-Ligase Adenosintriphosphat als Cofaktor. Bei der Reaktion wird Pyrophosphat abgespalten und Adenosinmonophosphat energiereich an die Aminogruppe eines Lysinrestes des Enzyms gebunden. Anschließend wird Adenosinmonophosphat auf die 5'-Phosphatgruppe der Nukleinsäuren übertragen und so die Bildung der Phosphodiesterbindung mit der freien 3'-Hydroxylgruppe katalysiert.

Bei der Plasmid-Integrat-Klonierung kann neben der intermolekularen Ligation zwischen den zwei DNA-Molekülen auch eine unerwünschte, intramolekulare Reaktion durch Religation des DNA-Plasmids ablaufen. Um dies zu verhindern, wurde die Plasmid-DNA zuvor dephosphoryliert (siehe 2.2.10).

Die molekularen DNA-Mengen für eine Plasmid-Integrat-Ligation wurden wie folgt berechnet:

$$\text{ng}[\text{Integrat}] = \frac{\text{ng}[\text{Plasmid}] \times \text{kb}[\text{Integrat}]}{\text{kb}[\text{Plasmid}]} \times \frac{\text{Integrat}}{\text{Plasmid}}$$

In allen Fällen wurden 200 bis 400 ng Plasmid-DNA eingesetzt, ein Integrat/Plasmid-Verhältnis von 3, 5 oder 10 zu 1 gewählt und so die entsprechende DNA-Menge an Integrat berechnet. Für die Ligrationsreaktion wurde die T4 DNA-Ligase und der entsprechende Puffer der Firma Fermentas verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 20: Komponenten der *sticky end*-Ligationsreaktion

| Komponente | Menge |
|------------------------------------|--------------------------|
| Plasmid-DNA | 200 bis 400 ng |
| Integrat-DNA | x ng (siehe Formel) |
| 10x T4 DNA-Ligase Puffer | 2 μ l |
| T4 DNA-Ligase (1 Weiss u/ μ l) | 1 μ l |
| Doppelt deionisiertes Wasser | ad 20 μ l Endvolumen |

Handelte es sich bei der Reaktion um eine Ligation zwischen *blunt end*-DNA-Fragmenten, so wurde der Ansatz wie folgt gewählt:

Tab. 21: Komponenten der *blunt end*-Ligationsreaktion

| Komponente | Menge |
|------------------------------------|--------------------------|
| Plasmid-DNA | 200 bis 400 ng |
| Integrat-DNA | x ng (siehe Formel) |
| 10x T4 DNA-Ligase Puffer | 2 μ l |
| 50% PEG 4000 Lösung | 2 μ l |
| T4 DNA Ligase (1 Weiss u/ μ l) | 5 μ l |
| Doppelt deionisiertes Wasser | ad 20 μ l Endvolumen |

Die Ligationsansätze wurden über Nacht in einem Wasserbad bei 21°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN) (siehe 2.2.4.6) oder durch Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Hierzu wurde der Ligationsansatz mit 40 μ l Ethanol und 4 μ l Natriumacetat [3 M; pH = 5,2] vermischt. Es folgte eine Inkubation bei -20°C für 30 min. Die DNA wurde mit 13.000 upm/min für 20 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 300 μ l 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 13.000 upm/min für 8 min wurde das DNA-Pellet für 10 min getrocknet und zuletzt in

10 µl doppelt deionisiertem H₂O aufgenommen. Für die Transformation in elektrokompetente Bakterien wurden von diesem aufgereinigten Ligationsansatz 1 bis 2 µl für die Elektroporation verwendet (siehe 2.2.2).

2.2.12 DNA-Sequenzanalyse

In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenzierung nach dem Prinzip von Sanger, Nicklen und Coulson durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer in vitro Replikation des zu sequenzierenden DNA-Bereichs in Kombination mit der sogenannten Kettenabbruchsreaktionen durch 2',3'-dideoxy-Nukleosidtriphosphaten (2',3'-ddNTPs) ¹⁵³. Wie bei einer gewöhnlichen PCR dient die zu sequenzierende, einzelsträngige Nukleinsäure als Matrize für eine DNA-Polymerase. Das 5'-Ende der Nukleinsäure muss in seiner Sequenz bekannt sein, damit Oligonukleotide eingesetzt werden können, die spezifisch am 5'-Ende hybridisieren und als Primer fungierend der DNA-Polymerase eine 3'-Hydroxylgruppe liefern, an der die DNA-Gegenstrangsynthese erfolgen kann. In den Reaktionsansätzen werden neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-ddNTPs eingesetzt. Während der Elongationsphase kommt es mit Hilfe der dNTPs zur Synthese des Gegenstranges bis es zum sequenzspezifischen Einbau eines 2',3'-ddNTPs kommt. Dies resultiert in einer Kettenabbruchsreaktion, da den 2',3'-ddNTPs in der 3'-Position die notwendige Hydroxylgruppe für die Verknüpfung mit dem nächsten NTP fehlt. Nach einer Vielzahl von exponentiellen Amplifikationszyklen führt dies zu einer vielfachen Kopie von DNA-Fragmenten in allen möglichen Fragmentlängen, die mit dem entsprechenden sequenzspezifischen, fluoreszenzmarkierten 2',3'-ddNTP enden. Nach fragmentlängenspezifischer Auftrennung kann somit die Sequenz der amplifizierten DNA ermittelt werden.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Big Dye Terminator Kit (Version 1.1 Cycle; Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 25 µl nach Angaben des Herstellers angesetzt:

Tab. 22: Komponenten der DNA-Sequenzierungsreaktion

| Komponente | Volumen |
|---|---------|
| DNA-Matrize (200 ng) | 1 µl |
| Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Big Dye Mix (inklusive Taq-DNA-Pol, dNTPs, fluoro-2',3'-ddNTPs) | 6 µl |
| Big Dye 5x Sequenzierungspuffer | 5 µl |
| steriles, doppelt deionisiertes H ₂ O | 12 µl |

Die Sequenzierungs-Amplifikation wurde mit dem *Gradient Cycler MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200* der Firma MJ Research Inc. durchgeführt und erfolgte mit folgenden Parametern:

Tab. 23: Amplifikationszyklen der Sequenzierungs-PCR

| | Temperatur | Zeit | Zyklus |
|---------------|------------|--------|--------|
| Denaturierung | 96°C | 2 min | x 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 45 sek | x 30 |
| Annealing | 56 °C | 45 sek | |
| Elongation | 60 °C | 1 min | |

Die Reaktionsansätze wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA wurde durch Zugabe von 500 µl EtOH abs., 50 µl Na-Acetat (3M, pH 5,2) und 1 µl Blue Dextran für 30 min bei -20°C ausgefällt. Anschließend wurde die DNA für 30 min bei 14000 upm sedimentiert und einmal mit 70 % EtOH (v/v) gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und zuletzt in 25 µl Template Suppression Reagenz (TSR) gelöst und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

Die Sequenzierung der aufbereiteten Sequenzierungsprodukte wurde vom DNA-Sequenzierungs-Service des Instituts für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Das erhaltene DNA-Sequenzchromatogramm wurde manuell editiert und die Basensequenz EDV-gestützt ausgewertet.

2.2.13 Präparation von Gesamt-mRNA

Gewebe-Lysate bzw. Zellen, aus denen die Gesamt-mRNA isoliert werden sollte, wurden mit Hilfe von *QIAshredder*-Säulen (QIAGEN) homogenisiert. Die Präparation der zellulären Gesamt-mRNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in allen Fällen mit RNase-freiem H₂O eluiert und die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.14 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase von einer RNA-Matrize ausgehend eine sequenzkomplementäre cDNA (complementary DNA) synthetisiert¹⁵⁴.

In dieser Arbeit wurde das *iScript™ cDNA Synthesis Kit* der Firma Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers verwendet. Bei diesem Fertigsystem erfolgt die reverse Transkription mit Hilfe von zwei verschiedenen Primern; Oligo(dT)-Primer, die an dem Poly(A)-Schwanz von mRNA hybridisieren und sogenannte „random Hexamer-Primer“, die statistisch verteilt an eine RNA-Sequenz binden.

Die reverse Transkriptionsreaktion wurde in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tab. 24: Komponenten der cDNA-Synthese-Reaktion

| Reagenz | Volumen |
|---|---------|
| RNA-Matrize | 10 µl |
| 5 x iScript Reaktions-Mix (enthält Primer, dNTPs und Puffer) | 2 µl |
| iScript Reverse Transkriptase | 1 µl |
| Nuklease-freies H ₂ O | 10 µl |

Die cDNA-Synthese-Reaktionen wurde mit dem *Gradient Cycler MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200* der Firma MJ Research Inc. und folgenden Parametern durchgeführt:

Tab. 25: cDNA-Synthese-Zyklus einer reversen Transkription

| Temperatur | Zeit | Zyklus |
|------------|--------|--------|
| 25 °C | 5 min | |
| 42 °C | 60 min | x 1 |
| 85 °C | 5 min | |

Nach der cDNA-Synthese wurde die Konzentration der cDNA photometrisch bestimmt (siehe 2.2.6) und die Probe bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3 Zellbiologische Arbeiten

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren sowie autoklavierte Materialien und sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO₂-begasteten Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Zunächst wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit einer physiologischen Trypanblaulösung 1:10 oder 1:20 verdünnt. Das Trypanblau kann durch die permeable Membran toter Zellen diffundieren und bindet als Indikator-Farbstoff an zytosolische Proteine, sodass zwischen ungefärbten lebenden Zellen und blaugefärbten toten Zellen differenziert werden kann. Es wurden 10 µl dieser Verdünnung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops bei einer 20-fach-Vergrößerung. Die Anzahl der ungefärbten Zellen wurde in einem Großquadrat (enthält 16 Kleinquadrate) ermittelt und die Konzentration lebender Zellen in der Zellsuspension mit folgender Formel quantifiziert:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{ermittelte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

Durch Multiplikation der ermittelten Zellkonzentration (Zellzahl/ml) mit dem Volumen (ml) der Zellsuspension wurde die Gesamtzellzahl der Zellsuspension errechnet.

2.3.2 Generierung von BM-DC

2.3.2.1 Isolierung von Knochenmarkszellen

Die Isolierung und Kultivierung knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen (bone marrow-derived dendritic cells, BM-DC) erfolgte nach der von Scheicher und Mitarbeitern beschriebenen Methode ¹⁵⁵ mit Modifikationen nach Lutz und Mitarbeitern ¹⁵⁶. Hierzu wurden Femur und Tibia der beiden Hinterläufe von 4 bis 6 Wochen alten C57BL/6-Mäusen steril präpariert und mit einem in 70% (v/v) EtOH getränkten Zellstoff gereinigt. Durch Abtrennung der Knochengelenksköpfe wurde das in dem Knochenkanal liegende Knochenmark zugänglich gemacht und mit Hilfe einer Spritze (Kanüle: 0,45 x 25 mm) mit kaltem Waschmedium ausgespült. Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken der Spritze homogenisiert und über ein Zellsieb (\varnothing 40 μ m) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C bei 300 x g für 8 min sedimentiert. Anschließend erfolgte die Lyse der in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml hypotonischem Gey' s Lyse-Puffer. Die Lyse wurde durch Zugabe von 30 ml kaltem Waschmedium nach einer Minute gestoppt. Die Zellen wurden 2 mal mit 20 ml kaltem Waschmedium gewaschen und zuletzt in 37°C vorgewärmtem BM-DC-Kulturmedium resuspendiert.

2.3.2.2 Kultivierung von BM-DC-Vorläuferzellen

Die aus dem Knochenmark isolierten Vorläuferzellen wurden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen in einem Volumen von 10 ml BM-DC-Kulturmedium in bakteriologische Petrischalen eingesät. An Tag 3 der Kultur wurden 5 ml frisches 37°C warmes BM-DC-Kulturmedium pro Petrischale hinzugefügt. An Tag 6 der Kultur wurden 5 ml

Medium aus der Petrischale entnommen und durch 5 ml frisches 37°C warmes BM-DC-Kulturmedium ersetzt. Für Zellen, die in nachfolgenden Experimenten unstimuliert eingesetzt werden sollten, wurde der Mediaustausch an Tag 8 wiederholt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über maximal 10 Tage.

2.3.2.3 Kultivierung von BM-DC-Vorläuferzellen in Anwesenheit von Dexamethason

Wenn BM-DC mit der immunmodulatorischen Substanz Dexamethason (DEX) konditioniert werden sollten, wurde ab Tag 3 der Kultur DEX in einer Endkonzentration von 1 µM hinzugegeben. Bei jeder Versorgung der Kultur mit frischem BM-DC-Kulturmedium wurde die entsprechende Menge DEX hinzugefügt. Derartig behandelte BM-DC werden in dieser Arbeit stets als DEX-APC bezeichnet.

2.3.2.4 Ausreifung von BM-DC

Die Ausreifung immaturer BM-DC oder DEX-konditionierter BM-DC (DEX-APC) erfolgte an Tag 8 oder 9 der Zellkultur und wurde durch Zugabe von LPS induziert. Hierzu wurden die nicht-adhärenenten Zellen geerntet und bei 300 x g für 8 min bei RT sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 37°C warmem BM-DC-Kulturmedium aufgenommen, in Gewebe-Kulturschalen transferiert und zuletzt das BM-DC-Kulturmedium mit LPS in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt. Zur Ausreifung wurden die Zellen für weitere 24 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

2.3.2.5 Ernten von BM-DC

Die BM-DC wurden entweder im immaturren oder im LPS-stimulierten Zustand als nicht-adhärenente Zellen der Kultur entnommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die BM-DC wurden bei 300 x g für 8 min bei RT sedimentiert und ein Mal mit 37°C warmen Testmedium gewaschen. Zuletzt wurden die BM-DC in Testmedium aufgenommen und die Zellzahl in der Suspension ermittelt (2.3.1).

2.3.2.6 Beladung der MHC-Moleküle von BM-DC mit MOGp35-55

In einigen in vitro Kokultur-Experimenten und in vivo Transfer-Experimenten sollten BM-DC als APC zur Aktivierung MOG-reaktiver T-Zellen fungieren. Bei solchen Ansätzen wurden die MHC-Moleküle der BM-DC bzw. DEX-APC durch exogene Zugabe von MOGp35-55 beladen.

Hierfür wurden die Zellen geerntet, einmal gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und mit 3.000 rad bestrahlt. Anschließend wurde MOGp35-55 in einer Konzentration von 25 µg/ml hinzugegeben und die Zellen bei 37°C und 10% CO₂ für 4 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen in einem 30-minütigen Zeitintervall resuspendiert. Nach der Inkubation wurde ungebundenes Peptid durch dreimaliges Waschen mit 10 ml Kulturmedium entfernt. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt und die MOGp35-55-gepulsten BM-DC bzw. DEX-APC in dem jeweiligen Experiment eingesetzt.

2.3.3 Transfektion von BM-DC mit dem MicroPorator MP-100

Die transiente Transfektion mittels Elektroporation ist eine nicht-virale Methode zur Einbringung von Fremd-DNA in Zielzellen. Bei der Elektroporation wird elektrische Energie genutzt, um Poren in der Zellmembran zu generieren. Auf diese Weise kann die Fremd-DNA in die Zielzelle gelangen und das gewünschte Transgen transient exprimiert werden. Handelt es sich bei den Zielzellen um eukaryontische Zellen, können eine geringe Zellviabilität durch den ausgesetzten „Stress“ sowie niedrige Transfektionsraten problematische Aspekte dieser Methode darstellen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die transiente Transfektion von BM-DC mit Hilfe des MicroPorators MP-100 (Digital Bio; NanoEnTek) durchgeführt. Dieses System erlaubt auf Grund seiner Bauweise eine sterile Elektroporation von Mammalierzellen mit hoher Transfektionsrate und Zellviabilität im Vergleich zu Systemen mit herkömmlichen Elektroporationsküvetten¹⁵⁷. Der MicroPorator arbeitet mit einer beweglichen goldbeschichteten Anode, die in einer Kapillare untergebracht ist. Diese wird auf eine spezielle Pipette aufgesetzt, welche wiederum mit dem Stromimpulsgenerator verkabelt ist. Diese Konstruktion ermöglicht eine exakte

Aufnahme und Abgabe eines bestimmten Volumens einer Zellsuspension. Dadurch wird die Zeitdauer für den Elektroporationsprozess minimiert und somit die Dauer der „Stress“-Situation für die Zellen reduziert. Die Pipette wird in einem speziellen Behälter platziert, der mit einem Elektrolytpuffer (Peqlab) gefüllt ist und außerdem die Kathode beinhaltet. Dabei reicht die mit Zellsuspension gefüllte Kapillare in den Elektrolytpuffer hinein, wodurch Anode und Kathode über die Elektrolyte des Puffers elektrisch verbunden sind. Zelltypoptimierte Elektroporationsbedingungen können an dem Stromimpulsgenerator über die drei Parameter elektrische Spannung, Impulsdauer und Impulsanzahl eingestellt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von BM-DC mit dem MicroPorator in allen Fällen unter den von uns (Bros et al.) optimierten Bedingungen ¹⁵⁸.

An Tag 7 der BM-DC-Kultur wurden die Zellen geerntet, einmal mit Waschmedium gewaschen und gezählt. Anschließend wurden 10^6 Zellen in 200 μ l *Resuspension*-Puffer (Peqlab) aufgenommen. Es wurde die jeweils angegebene Menge von Plasmid-DNA hinzugegeben und die Transfektion durch den MicroPorator mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tab. 26: MicroPorator MP-100-Einstellungen zur Transfektion von BM-DC

| Parameter | Einstellung |
|--------------|-------------|
| Spannung | 1450 Volt |
| Impulsdauer | 30 ms |
| Impulsanzahl | 1 |

Die elektroporierten BM-DC wurden unverzüglich in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte mit 2 ml Kulturmedium gegeben und zur Transgenexpression für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Wenn es sich bei der transfizierten DNA um den GFP-kodierenden Expressionsvektor pCDH1-copGFP handelte, wurden die Zellen nach der Inkubation mit PBS / 2% FCS gewaschen und die Transfektionseffizienz (Frequenz GFP⁺ Zellen) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Wenn BM-DC mit MOG- oder MOGp35-55-kodierenden Expressionsvektoren transfiziert worden waren und eine syngene Kokultur mit MOGp35-55-reaktiven 2D2 T-Zellen folgen sollte, wurden die Zellen für weitere 18 h in Gegenwart von 1 μ g/ml

LPS kultiviert. Dies diente der Maturierung der BM-DC und sollte eine maximierte Peptidpräsentation des transgenexprimierten und prozessierten MOG bzw. MOGp35-55 über MHC-Moleküle induzieren.

2.3.4 Präparation von Organen aus Versuchsmäusen

Die Tötung von Versuchsmäusen zur Präparation von Organen erfolgte nach tierschutzgerechten Richtlinien. Für die Präparation von lymphoiden Organen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation oder durch CO₂-Inhalation getötet. Wenn das zentrale Nervensystem präpariert werden sollte, wurden die Versuchsmäuse zunächst durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran narkotisiert und anschließend mit PBS perfundiert (siehe 2.3.4.3).

2.3.4.1 Präparation von Lymphknotenzellen

Die drainierenden Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in 3 ml kaltem Waschmedium aufgenommen. Um eine homogene Suspension von Lymphknotenzellen zu erhalten, wurden anschließend die Lymphknoten mit den rauen Seiten zweier sterilisierter Objektträger in einer Petrischale zerrieben und über ein Zellsieb (\varnothing 40 μ m) in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Lymphknotenzellen wurden bei 300 x g für 8 min bei 4°C sedimentiert und einmal mit 15 ml kaltem Waschmedium gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet in Testmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.3.4.2 Präparation von Milzzellen

Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und in 20 ml kaltem Waschmedium aufgenommen. Um eine homogene Suspension von Milzzellen zu erhalten, wurde anschließend die Milz mit den rauen Seiten zweier sterilisierter Objektträger in einer Petrischale zerrieben und über ein Zellsieb (\varnothing 40 μ m) in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Milzzellen wurden bei 300 x g für 8 min bei 4°C

sedimentiert. Anschließend erfolgte die Lyse der in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml hypotonischem Gey's Lyse-Puffer. Die Lyse wurde durch Zugabe von 30 ml kaltem Waschmedium nach einer Minute gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 20 ml kaltem Waschmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde zuletzt in Testmedium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt.

2.3.4.3 Anreicherung von Zellinfiltraten aus dem zentralen Nervensystem

Die Anreicherung von Zellinfiltraten und Mikrogliazellen aus dem zentralen Nervensystem erfolgte nach einer modifizierten Methode von Ford und Mitarbeitern¹⁵⁹. Zunächst wurde die Versuchsm Maus durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran narkotisiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit eiskaltem PBS. Hierzu wurde die Maus unterhalb des Brustkorbs geöffnet, das Zwerchfell entfernt und somit das Herz freigelegt. Um eine Perfusion des kompletten Herz-Blut-Kreislaufs (Lungen- und Körperkreislaufs) der Maus zu ermöglichen, wurde die Kanüle des Transfusionssystems in die rechte Herzkammer eingeführt und das rechte Atrium mit einem Scherenschnitt geöffnet. Nach vollständigem Ausbluten wurden das Rückenmark und Gehirn der Maus präpariert. Hierzu wurde die Wirbelsäule freigelegt und das Rückenmark mit Hilfe einer Spritze (Kanüle: 0,9 x 40 mm) mit eiskaltem PBS / 2% FCS in ein 50 ml Reaktionsgefäß ausgespült. Das Gehirn wurde durch Öffnen des Schädels präpariert und in das gleiche 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden das Rückenmark und das Gehirn mit Hilfe einer Rasierklinge mechanisch zerkleinert, das Gewebe durch kurze Zentrifugation (300 x g, 30 s) sedimentiert, das Pellet in 2 ml PBS (2 mg/ml Kollagenase Typ II, 20 U DNase I) aufgenommen und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension durch heftiges resuspendieren homogenisiert, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und mit 1.500 upm für 5 min zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Anreicherung der Mikroglia durch Gleichgewicht-Dichtezentrifugation in einem Percoll®-Gradienten.

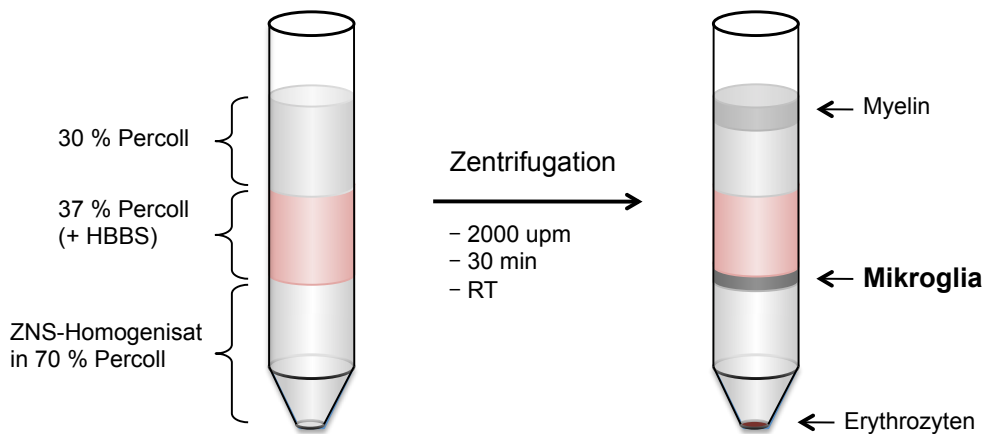


Abbildung 2: Mikrogli-Anreicherung durch Percoll[®]-Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst wurde ein physiologischer Percoll[®]-Gradient, bestehend aus 37% (v/v) Percoll[®] (verdünnt in HBSS) in der unteren Phase und 30% (v/v) Percoll[®] (verdünnt in PBS) in der oberen Phase, in einem 15 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Das Zellpellet wurde in 5 ml 70% (v/v) Percoll[®] (verdünnt in PBS) aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken einer Spritze erneut homogenisiert. Anschließend wurde der vorbereitete Percoll[®]-Gradient mit dem 70% Percoll[®]-Homogenisat mit Hilfe einer Spritze (Kanüle: 0,9 x 70 mm) unterlegt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min mit 2.000 upm bei RT. Dabei wurde die Beschleunigungs- und Bremseigenschaft der Zentrifuge aus bzw. auf die kleinste Stufe eingestellt. Nach der Dichtegradientenzentrifugation hatte sich das Myelin in der oberen Phase und die Mikroglia in Form eines weißen Rings in der Interphase zwischen der 37% und 70% Percoll[®]-Phase angereichert (siehe Abbildung 2). Die Myelin-haltige Phase wurde abgesaugt. Die Mikroglia wurde mit einer Pipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zu einem Volumen von 50 ml mit PBS / 0,5 M EDTA aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen mit 1500 upm für 5 min bei RT sedimentiert und für nachfolgende durchflusszytometrische Analysen verwendet.

2.3.5 Aufreinigung von T-Lymphozyten aus einer Milzzellsuspension

T-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden aus einer Milzzellsuspension aufgereinigt. Wenn T-Zellen in einer syngenen Kokultur eingesetzt werden sollten, so

wurden die T-Zellen über Nylonwolle-Säulen aufgereinigt (siehe 2.3.5.1). Für Transfer-Experimente, bei denen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Rezipientenmäuse injiziert werden sollten, wurden solche T-Zellen mit Hilfe der MACS[®]-Technologie (siehe 2.3.5.2) angereichert.

2.3.5.1 T-Zell-Anreicherung mit Hilfe von Nylonwolle-Säulen

Die Aufreinigung von T-Zellen über Nylonwolle-Säulen ist eine effiziente und kostengünstige Methode. Grundlage dieser Methode ist die natürliche Adhärenz vieler Leukozytenarten (z.B. B-Zellen, Makrophagen und DC) an die Oberfläche der Nylonwolle. T-Zellen hingegen binden nicht und können somit aus einer heterogenen Milzzellsuspension angereichert werden ¹⁶⁰.

Für die Herstellung einer Säule wurde zunächst 0,6 g fein gezupfte Nylonwolle in eine 10 ml Spritze gegeben und auf ein Volumen von 6 ml verdichtet. Anschließend wurde die Säule in einem 50 ml Reaktionsgefäß autoklaviert.

Die sterilen Nylonwolle-Säulen wurden mit 20 ml warmem Waschmedium äquilibriert und in einem Wasserbad bei 37°C für 45 min inkubiert. Vor Beladung der Säulen mit der Milzzellsuspension wurden weitere 10 ml warmes Waschmedium luftblasenfrei auf diese gegeben. Anschließend wurde die präparierte Milzzellsuspension (siehe 2.3.4.2) aus maximal 2 Milzen in einem Volumen von 1 ml direkt auf die Nylonwolle gegeben. Es wurde mit 1 ml warmem Waschmedium vorsichtig nachgespült, und die Säule in einem Wasserbad bei 37°C für 45 min inkubiert.

Vor der Elution der T-Zellen wurde zunächst eine Kanüle (0,7 x 30 mm) durch den Deckel eines sterilen 50 ml Reaktionsgefäßes gestoßen und dann die Säule auf diese Kanüle gesteckt. Die T-Zellen wurden mit 20 ml warmem Waschmedium in das 50 ml Reaktionsgefäß ausgewaschen. Die Tropfgeschwindigkeit wurde dabei durch Auf- bzw. Zudrehen des Deckels auf ca. einen Tropfen pro Sekunde eingestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 8 min bei RT sedimentiert, in warmem Test-Medium aufgenommen und die Zellkonzentration bestimmt.

Bei der Anreicherung von 2D2 T-Zellen durch diese Methode konnte mittels durchflusszytometrische Analysen eine Reinheit von ca. 70 % CD4⁺,CD90.1⁺,Vb11⁺ T-Zellen ermittelt werden (siehe Anhang Abbildung 30).

2.3.5.2 Aufreinigung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit der MACS®-Methode

Die MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)-Methode ermöglicht eine spezifische Anreicherung von Zellen mit Hilfe von antikörpergekoppelten MicroBeads in einem magnetischen Feld.

Die in dieser Arbeit durchgeführte MACS-Aufreinigung von naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Milzzellsuspension einer 2D2/Thy1.1 Maus erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden CD25⁺ Zellen mit biotinyliertem anti-CD25-Antikörper (Klon PC61, PC61-bio) in Kombination mit Streptavidin-MicroBeads depletiert und anschließend CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von CD4 (Klon L3T4)-MicroBeads durch „positive Selektion“ angereichert.

Zunächst wurden die Zellen einer Milzzellsuspension (siehe 2.3.4.2) über ein Zellsieb (\varnothing 40 μ m) in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben, bei 300 x g für 8 min bei 4°C sedimentiert und mit kaltem MACS-Puffer auf eine Zellkonzentration von 10⁸ Zellen/ml eingestellt. Zur Markierung der Zellen wurde der PC61-bio (1 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml hinzugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem MACS-Puffer gewaschen und erneut in einer Zellkonzentration von 10⁸ Zellen/ml in kaltem MACS-Puffer aufgenommen. In die Zellsuspension wurden dann Streptavidin-MicroBeads in einer 20-fachen Verdünnung hinzugegeben und bei 4°C für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit kaltem MACS-Puffer gewaschen, ausgezählt und in warmem MACS-Puffer (2 x 10⁸ Zellen/ml) aufgenommen.

Anschließend erfolgte die magnetische Separation der CD25-markierten Zellen durch „negative Selektion“. Hierfür wurden LS-Säulen der Firma Miltenyi Biotec in einen magnetischen MACS-Separator platziert und mit 3 ml warmem MACS-Puffer äquilibriert. Nachdem der MACS-Puffer komplett durchgelaufen war, wurden die LS-Säulen mit der Zellsuspension beladen und dabei wurde die vom Hersteller empfohlene maximale Zellzahl nicht überschritten. Bei diesem Schritt kommt es zur Zellseparation, da die CD25-markierten Zellen in dem magnetischen Feld hängen bleiben und alle unmarkierten Zellen die LS-Säule durchlaufen. Der Durchlauf mit der CD25-negativen Zellfraktion wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die LS-Säulen wurden zweimal mit 3 ml warmem MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf weiterhin gesammelt. Anschließend wurden die Zellen des Durchlaufs

sedimentiert, ihre Zahl bestimmt und mit kaltem MACS-Puffer auf eine Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt.

In dem zweiten Schritt erfolgte die Anreicherung der $CD4^+$ T-Zellen aus der $CD25^-$ negativen Zellfraktion durch „positive Selektion“. Hierfür wurden die $CD4$ (Klon L3T4)-MicroBeads und LS-Säulen der Firma Miltenyi Biotec verwendet und die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Um die Reinheit der Zellfraktionen zu überprüfen, wurden Aliquote sowohl vor als auch nach der $CD25$ -Depletion und nach der $CD4$ -Anreicherung entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Durch die oben beschriebene Methode konnte eine Anreicherung von über 90% $CD4^+CD25^-$ T-Zellen erreicht werden (siehe Anhang Abbildung 31).

2.3.6 CFSE-Markierung von T-Zellen

CFSE (Carboxyfluorescein-N-succinimidyl-ester) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich zur Zellmarkierung und somit zur Untersuchung der Migration und Proliferation von Zellen *in vivo* und *ex vivo* eignet.

In seiner nicht-fluoreszierenden, permeablen Form kann das CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) durch die Zellmembran diffundieren und wird dort durch zytoplasmatische Esterasen zu dem fluoreszierenden CFSE umgesetzt. Das CFSE wiederum kann über seine Succinimidyl-Gruppe sehr stabile, kovalente Bindungen mit den Amino-Gruppen intrazellulärer Moleküle ausbilden. Dadurch ist eine langfristige Markierung von nicht-proliferierenden Zellen über eine Zeitdauer von mehreren Monaten möglich ¹⁶¹.

Bei einer Zellteilung werden die CFSE-gekoppelten Moleküle stöchiometrisch hälftig auf die Tochterzellen verteilt. Mit jeder Zellteilung kommt es daher zu einer sukzessiven Halbierung der Fluoreszenz-Intensität. Durch dieses Prinzip kann das Proliferationsverhalten von Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht werden ¹⁶².

Für die CFSE-Markierung wurden Zellen in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in Serum-freiem EMEM / 1% Pen/Strep aufgenommen. Anschließend wurde das CFDA-SE (CFSE) in einer Konzentration von 0,2 bis 2 μ M hinzugegeben und es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 10 min. Anschließend wurde $\frac{1}{5}$ Volumen FCS in die Suspension gegeben und die Zellen wurden zweimal mit Waschmedium

gewaschen. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für einen intravenösen Transfer in kaltem PBS aufgenommen.

2.3.7 Syngene Kokultur mit MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen

Um die antigenspezifische stimulatorische Kapazität von APC zu analysieren, wurden syngene Kokulturen mit MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen und APC durchgeführt, die zuvor mit MOG- bzw. MOGp35-55-kodierenden Plasmiden transfiziert wurden (siehe 2.3.3) oder deren MHC-Moleküle durch externe Zugabe von MOGp35-55 beladen wurden (siehe 2.3.2.6). Die APC wurden vor der Kokultur mit 3.000 rad bestrahlt. Alle Kokultorexperimente wurden in 96-Loch-Platten in Triplikaten mit einem Gesamtvolumen von 200 µl angesetzt. Die APC wurden mit einer jeweils angegebenen Zellzahl ($1,5 \times 10^4$ oder 2×10^4) pro Loch seriell 1:2 oder 1:3 verdünnt. Anschließend wurden die 2D2 T-Zellen in einer konstanten Zellzahl (5×10^4 oder 8×10^4) zu allen Verdünnungsstufen hinzugegeben. Alle Kokulturen wurde für 96 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Zur Messung der Proliferation wurden zu den Kokulturen für die letzten 16 h 0,25 µCi / Loch ³HTdR (Tritium-markiertes Thymidin) gegeben. Als Kontrollen dienten abhängig vom jeweiligen Experiment Ansätze mit APC ohne 2D2 T-Zellen, 2D2 T-Zellen ohne APC, 2D2 T-Zellen mit APC, welche zuvor nicht mit MOGp35-55 beladen wurden, sowie 2D2 T-Zellen mit APC, welche mit Leervektor transfiziert wurden. Bis zur Messung der Radioaktivität wurden die Platten bei -20°C gelagert.

2.3.8 Antigen-spezifische Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen ex vivo

Mit diesem Testverfahren wurde die Restimulierbarkeit von Milz- und Lymphknotenzellen aus Versuchsmäusen nach EAE- oder CHS-Induktion durch Messung der antigenspezifischen Proliferation und Zytokinproduktion eruiert. Hierzu wurden die Milz- und Lymphknotenzellen wie in 2.3.4.1 und 2.3.4.2 beschrieben präpariert.

In EAE-Experimenten wurde zur Bestimmung der antigenspezifischen proliferativen Restimulierbarkeit Kulturmedium mit 100 µg/ml MOGp35-55 in Vertiefungen einer 96-

Loch-Platte vorgelegt und in Triplikatanisätzen 1:2 titriert. Anschließend wurden die präparierten Milzzellen aus den Versuchsmäusen in einer konstanten Zellzahl von 5×10^5 Zellen hinzugegeben (200 μ l Endvolumen). Die Kultur wurde für 96 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Zur Messung der Proliferation erfolgte die Kultivierung für die letzten 16 h in Gegenwart von 0,25 μ Ci / Loch ³HTdR. Die Kulturen wurden bis zur Messung der Radioaktivität (siehe 2.3.9) bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der antigenspezifischen Zytokinproduktion wurden 5×10^6 präparierte Milzzellen aus den Versuchsmäusen in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte gegeben und sowohl ohne als auch mit 25 μ g/ml MOGp35-55 in einem Endvolumen von 2 ml für 96 h bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA (siehe 2.3.12) bei -20°C gelagert.

In CHS-Experimenten wurden 2×10^5 Lymphknoten- bzw. Milzzellen aus den Versuchsmäusen in Triplikatanisätzen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte eingesät. Als APC wurden syngene Milzzellen von C57BL/6-Mäusen verwendet. Diese wurden mit 3.000 rad bestrahlt und anschließend mit 5 μ M DNBS für 10 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiges Hapten wurde durch dreimaliges Waschen mit 50 ml 1 x PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 8 min sedimentiert, in Kulturmedium resuspendiert und ihre Zellzahl bestimmt. Die APC wurden in einer Dichte von 2×10^5 pro Loch zu den zuvor eingesäten Lymphknoten- bzw. Milzzellen aus den Versuchsmäusen gegeben (200 μ l Endvolumen). Als Negativkontrolle dienten Ansätze der verwendeten Lymphknoten- und Milzzellen ohne APC sowie der haptenbeladene APC ohne Lymphknoten- oder Milzzellen. Die 96-Loch-Platten wurden für 96 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Zur Messung der Proliferation erfolgte die Kultivierung für die letzten 16 h in Gegenwart von 0,5 μ Ci / Loch ³HTdR. Die Kulturen wurden bis zur Messung der Radioaktivität (siehe 2.3.9) bei -20°C gelagert.

2.3.9 Radioaktivitätsmessung zur Bestimmung von Proliferation

Die Bestimmung von Proliferation erfolgte durch die Radioaktivitätsmessung von ³HTdR, welches in die genomische DNA mitotisch aktiver Zellen integriert wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellerntegerätes mit destilliertem Wasser aus der 96-Loch-Platte geerntet. Bei dieser Prozedur lysieren die Zellen. Die Flüssigkeit wird

über eine Filtermembran geleitet und die freigewordene DNA wird dabei auf der Filtermembran präzipitiert. Anschließend wurde die Filtermembran mit Hilfe einer Mikrowelle getrocknet, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gleichmäßig befeuchtet und in einer Folie eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines β -Counters und wird als cpm (*counts per minute*) angegeben.

2.3.10 Intrazelluläre Zytokinanreicherung durch PMA, Ionomycin und Brefeldin A

Für durchflusszytometrische Analysen (siehe 2.3.11) von intrazellulären Zytokinen wurden 2×10^6 Lymphknotenzellen (siehe 2.3.4.1), 2×10^6 Milzzellen (siehe 2.3.4.2) oder 40% der angereicherten Zellen aus dem ZNS (siehe 2.3.4.3) in 200 μ l Testmedium mit 100 ng/ml PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), 200 ng/ml Ionomycin und 1 μ g/ml Brefeldin A aufgenommen und in die U-förmigen Vertiefungen einer bakteriologischen 96-Loch-Platte überführt. Zur Synthese und Anreicherung intrazellulärer Zytokine wurden die Proben für 4 h im Brutschrank inkubiert. PMA und Ionomycin dienen hierbei der antigenunspezifischen Aktivierung von Lymphozyten. Brefeldin A ist für die Anreicherung intrazellulärer Zytokine notwendig, da es den Golgi-Apparat inhibiert und eine Akkumulation sekretorischer Proteine in dem endoplasmatischen Retikulum induziert¹⁶³.

Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 450 x g für 6 min sedimentiert und mit PBS / 2% FCS einmal gewaschen. Anschließend folgten die Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen (siehe 2.3.11.1) und von intrazellulären Zytokinen (siehe 2.3.11.2).

2.3.11 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zum semiquantitativen Nachweis von zelloberflächengebundenen oder intrazellulären Proteinen und erlaubt eine vielseitige antikörperspezifische Analyse von Zellen in einer Suspension. Bei dieser Methode werden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Primärantikörpern gefärbt, die gegen das Molekül von Interesse gerichtet sind. Alternativ können auch unmarkierte oder biotinylierte Primärantikörper zum Einsatz kommen; die Fluoreszenz-Markierung

erfolgt dann durch einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist, oder durch ein Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat, welches an Biotin bindet. Um eine eventuelle unspezifische Bindung des Antikörpers auf Grund des Isotyps zu erfassen, wird in der Regel eine Färbung mit der entsprechenden Antikörper-Isotypkontrolle mitgeführt.

Die Messung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgt mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Die Zellen werden von dem Gerät über eine Kanüle eingesogen und durch eine hauchdünne Flüssigkeitskapillare geleitet. Die Zellen passieren hier auf Einzelzellniveau einen Laserstrahl, das Licht wird dabei gestreut und Lichtdetektoren können diverse Parameter messen. Ein Detektor in nahezu direkter Verlängerung des Laserstrahls ermittelt das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC), welches mit der Größe der Zelle korreliert. Ein weiterer Detektor im 90°-Winkel erfasst das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC), welches vor allem durch die Granularität der Zelle moduliert wird.

Neben den beiden allgemeinen Parametern Zellgröße und -granularität können außerdem mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper die Expressionsstärke der entsprechenden Antigene in der Zellsuspension dokumentiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laserstrahl mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bzw. eines bestimmten Energieniveaus angeregt und emittiert dabei ein Fluoreszenzspektrum mit einem Emissionsmaximum, welches durch einen Lichtdetektor in dem dafür vorgesehenen Kanal erfasst wird. Mit Hilfe von Lichtfiltersystemen in dem Durchflusszytometer kann auf diese Weise eine einzelne Probe mit mehreren Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die eine unterschiedliche Fluoreszenzemission aufweisen, analysiert werden. Je nach Komplexität des Durchflusszytometers können verschiedene Laser in Kombination mit entsprechenden Lichtfiltersystemen zum Einsatz kommen, wodurch die mögliche Anzahl nutzbarer Fluorochrome bzw. Kanäle erweitert werden kann. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie mit den Geräten FACScan (3 Kanäle) und FACSCanto II (8 Kanäle) der Firma BD durchgeführt. Das FACScan arbeitet mit einem Argon-Laser (488 nm) und ermöglicht die Dokumentation von bis zu 3 Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb einer Probe. Das FACSCanto II besitzt neben dem 488-nm-Laser zwei weitere Laser mit 405 nm und 633 nm Lichtemission, sodass bei diesem Gerät die Benutzungsmöglichkeit von bis zu 8 Fluoreszenzfarbstoffen in einer Probe gegeben ist.

Bei durchflusszytometrischen Analysen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muss unter Umständen eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden. Dies beruht darauf, dass angeregte Fluorochrome nicht die Fluoreszenz einer genau definierten Wellenlänge emittieren, sondern ein Emissionsspektrum aufweisen. Bei mehreren Fluoreszenzfarbstoffen kann es zu Überlappungen der Emissionsspektren kommen. Dies führt dazu, dass ein Fluorochrom eventuell nicht nur ein Signal in dem dafür vorgesehenen Kanal, sondern „fälschlicherweise“ auch in den Kanälen anderer Fluorochrome auslöst. Wie stark ein Fluorochrom in einen anderen Kanal streut, kann empirisch ermittelt werden. Durch entsprechende Kompensationseinstellungen an dem Durchflusszytometer kann dieser Fehler rechnerisch korrigiert werden.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit Hilfe der Software *BD CellQuest™* oder *BD FACSDiva™*. Nachfolgende Analysen wurden mit der Software *FlowJo* (Version 8.8.6 für Macintosh) durchgeführt. Die Darstellung der erhobenen Daten erfolgte in Histogrammen oder Dotplot-Diagrammen. Mit Hilfe von sogenannten *Gates* können Teilmengen der aufgenommenen Zellen für nachfolgende Analysen ausgewählt werden. Eine entsprechende Gating-Strategie mit sequentiellen Gates ermöglichte auf diese Weise eine detaillierte Analyse von Zellpopulationen innerhalb der untersuchten Zellsuspension. Um eine quantitative Aussage über die Expressionsstärke eines untersuchten Antigens in einer Zellpopulation machen zu können, wurde in einigen Fällen der arithmetische Durchschnitt der Fluoreszenz (MFI, mean fluorescence intensity) mit Hilfe der Software ermittelt.

2.3.11.1 Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen

Die Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen auf BM-DC erfolgte in allen Fällen in BD Falcon™-Röhrchen (BD Biosciences) mit einer Zellzahl von 2×10^5 bis 10^6 Zellen. Die Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten wurde mit einer Zellzahl von 2×10^6 Lymphknotenzellen (siehe 2.3.4.1), 2×10^6 Milzzellen (siehe 2.3.4.2) oder 40% der angereicherten Zellen aus dem ZNS (siehe 2.3.4.3) in 96-Loch-Platten durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 1.200 upm für 10 min sedimentiert, in PBS / 2% FCS aufgenommen und einmal mit PBS / 2% FCS gewaschen. Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren FcγRII/III wurden die Zellen mit 25 µl 2.4G2 Antikörper (1:5 verdünnt in

PBS / 2% FCS) für 20 min bei 4°C inkubiert. Zur Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen wurde anschließend der gewünschte Antikörper (verdünnt in PBS / 2% FCS) in einem Gesamtvolumen von 25 µl hinzugegeben und resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für weitere 20 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS / 2% FCS gewaschen. Wenn intrazelluläre Zytokine bzw. der Transkriptionsfaktor Foxp3 angefärbt werden sollten, wurde wie unter 2.3.11.2 bzw. 2.3.11.3 beschrieben verfahren. Ansonsten wurden die Zellen zuletzt zur Fixierung in 200 µl bis 500 µl PBS / 0,7% PFA aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. In dieser Arbeit erfolgte die durchflusszytometrische Analyse maximal 24 h später.

2.3.11.2 Fluoreszenz-Markierung von intrazellulären Zytokinen

Vor der Fluoreszenz-Markierung von intrazellulären Zytokinen wurde in allen Fällen eine intrazelluläre Zytokinanreicherung durch PMA, Ionomycin und Brefeldin A (siehe 2.3.10) und die Anfärbung von Oberflächenmolekülen (siehe 2.3.11.1) in 96-Loch-Platten durchgeführt. Für die Anfärbung intrazellulärer Zytokine wurden Komponenten aus dem Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit der Firma BD Biosciences verwendet.

Die Zellen wurden mit 1600 upm für 5 min bei 4°C sedimentiert und anschließend in 100 µl Fixation/Permeabilization-Lösung (BD Biosciences) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 20 min bei 4°C wurden die Zellen sedimentiert und zwei Mal mit BD Perm/Wash™ Puffer (BD Perm/Wash™ Buffer (10X) 1:10 verdünnt in doppelt deionisiertem H₂O; BD Biosciences) gewaschen. Zur Anfärbung der intrazellulären Zytokine wurden die permeabilisierten Zellen mit 30 µl des entsprechenden Antikörpers (verdünnt in BD Perm/Wash™ Puffer) für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 150 µl BD Perm/Wash™ Puffer hinzugegeben und die Zellen mit 1600 upm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 200 µl BD Perm/Wash™ Puffer. Zuletzt wurden die Zellen zur Fixierung in 200 µl PBS / 0,7 % PFA aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte spätestens nach 24 h.

2.3.11.3 Fluoreszenz-Markierung von Foxp3

Um Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie als regulatorische T-Zellen zu identifizieren, wurde zunächst eine Oberflächenfärbung (siehe 2.3.11.1) gegen CD4 und CD25 in 96-Loch-Platten durchgeführt. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Antikörpermarkierung des Transkriptionsfaktors Foxp3 mit Hilfe des Mouse Regulatory T Cell Staining Kits der Firma eBioscience®.

Die Zellen wurden bei 1.600 upm für 5 min bei 4°C sedimentiert und anschließend in 200 µl Fixation/Permeabilization-Puffer (Fixation/Permeabilization Concentrate (4x) 1:3 verdünnt in Fixation/Permeabilization Diluent; eBioscience®) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 2 h bei 4°C wurden die Zellen zwei Mal mit 200 µl Permeabilization-Puffer (Permeabilization Buffer (10x) 1:10 verdünnt in doppelt deionisiertem H₂O; eBioscience®) gewaschen. Die permeabilisierten Zellen wurden dann mit 30 µl Foxp3-PE (1:200 verdünnt in 1 x Permeabilization-Puffer) für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 150 µl Permeabilization-Puffer hinzugegeben und die Zellen bei 1.600 upm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 200 µl Permeabilization-Puffer und zuletzt wurden die Zellen in 200 µl PBS / 0,7% PFA aufgenommen. Die Messung mit Hilfe eines Durchflusszytometers erfolgte maximal 24 h später. Die Proben wurden für diesen Zeitraum bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.3.12 Quantitative Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) ist ein immunologisches Testverfahren, basierend auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktion und ermöglicht die quantitative Konzentrationsbestimmung von Proteinen, wie z.B. Zytokinen und Immunglobulinen.

In dieser Arbeit wurde die Sandwich-ELISA-Methode zur quantitativen Bestimmung des Zytokingehalts in Überständen von Milzzellkulturen angewendet. Bei dieser Methode wird ein *Capture*-Antikörper, der eine Epitopspezifität für das nachzuweisende Protein aufweist, an die Polymerschicht von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nachdem Zellkulturüberstände in einer Verdünnungsreihe in die

Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben werden, kommt es zur spezifischen Bindung des nachzuweisenden Proteins. Die gebundenen Proteine werden in einem weiteren Schritt durch einen zweiten epitopspezifischen, biotinylierten Detektionsantikörper markiert. Nach Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase wird das farblose Substrat OPD (Orthonitrophenoldiamin) in ein photometrisch messbares Produkt umgesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Ermittlung der Extinktionen für die einzelnen Proben der Verdünnungsreihe bei 490 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers. Zur Berechnung der Proteinkonzentration werden adäquate Standardlösungen als Referenz mitgeführt.

Der in 1x PBS oder 0,1 M NaHCO₃ verdünnte *Capture*-Antikörper (siehe 2.1.10.3; Tab. 10) wurde in einem Volumen von 50 µl in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben. Nach einer Inkubation bei 4° C über Nacht wurde anschließend ungebundener Antikörper ausgewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 150 µl Blockierungslösung pro Vertiefung und Inkubation für eine Stunde bei RT abgesättigt. Nach dem Ausschlagen der Blockierungslösung erfolgte das Auftragen der Kulturüberstände in einer Verdünnungsreihe. Hierfür wurden die Kulturüberstände und der entsprechende Zytokinstandard seriell 1 : 2 in 1 x PBS / 1% BSA (w/v) verdünnt und in einem Volumen von 50 µl in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben. In weiteren Vertiefungen wurden 50 µl 1x PBS / 1% BSA (w/v) als Leerwert mitgeführt. Wenn von einer Probe die Konzentration an TGF-β bestimmt werden sollte, musste die Probe zunächst auf einen pH-Wert von 3 angesäuert werden. Hierfür wurden zu 120 µl der jeweiligen Probe ca. 2 - 3 µl 1 N HCl hinzugegeben. Nach Kontrolle des pH-Werts folgte eine Inkubation bei 37 ° C für 30 min. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von ca. 3 - 5 µl NaOH bis zu einem pH-Wert von 7 bis 8 neutralisiert und in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben.

Die Bindung des nachzuweisenden Zytokins an den *Capture*-Antikörper erfolgte durch Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach zwei Waschschritten wurde der entsprechende biotinylierte Detektionsantikörper in einem Volumen von 50 µl in die Vertiefungen gegeben und für 1 h bei 37 ° C oder für 2 h bei RT (siehe 2.1.10.3; Tab. 11) inkubiert. Danach wurde ungebundener Detektionsantikörper in zwei Waschschritten entfernt und 50 µl einer 1:2.000 verdünnten ExtraVidin-Lösung (Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase) in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben. Die Bindung des Enzyms an den Detektionsantikörper erfolgte

während einer Inkubation für 45 min bei RT, überschüssiges Enzym wurde anschließend durch vier Waschschriffe entfernt. Zuletzt wurden 50 µl OPD (1 mg / ml in Substratpuffer, versetzt mit 1 µl / ml H₂O₂) in die Vertiefungen gegeben. Eine chemische Umsetzung des farblosen Substrats OPD durch das Enzym konnte anhand eines Farbumschlags nach Gelb beobachtet werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ je Vertiefung gestoppt.

Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 490 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers. Von den Messwerten der Proben wurden die Messwerte des Leerwerts subtrahiert. Anhand der Extinktionswerte der Verdünnungsreihe der Probe und des entsprechenden Standards wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Für die Berechnung der Zytokinkonzentration einer Probe wurden die Konzentration des Standards und die Verdünnung der Probe bei einer optischen Dichte von 0,2 in Bezug gesetzt.

2.4 Histologische Untersuchungen

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Marco Prinz (Neuropathologie, Neurozentrum, Universitätsklinikum Freiburg) wurden Rückenmarksschnitte hinsichtlich Zellinfiltration und Grad der axonalen Demyelinisierung analysiert. Die histologischen Untersuchungen erfolgten wie durch Prinz et al.¹⁶⁴ beschrieben.

Das ZNS von Mäusen wurde wie in 2.3.4.3 beschrieben asserviert und ein kraniales Stück Rückenmark in PBS / 4% PFA konserviert. Die weitere Bearbeitung wurde durch Dr. Thomas Blank aus der AG Prinz durchgeführt. Das Rückenmark wurde in Paraffin eingebettet und nachfolgend in feine Schnitte zerlegt. Nach Entparaffinierung erfolgten die Färbungen der Rückenmarksschnitte mit LFB (*luxol fast blue*)-Puffer zur Identifizierung des Grades axonaler Demyelinisierung, mit *macrophage-3 antigen* (BD Pharmingen) zum Nachweis von Makrophagen und Mikroglia sowie mit anti-CD3 und anti-B220 (jeweils Serotec) zum Nachweis von T- bzw. B-Zellen. Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte verblindet durch Dr. Thomas Blank.

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle experimentellen in vivo Arbeiten an Versuchstieren wurden an einer Werkbank in einem Raum der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter pathogenfreien Bedingungen durchgeführt. Wenn für ein Versuchsvorhaben Materialien in die Räume der ZVTE mitgebracht werden mussten, so wurden diese mit einem Desinfektionsmittel gründlich gereinigt, um das Risiko einer Infektion zu minimieren.

2.5.1 Biolistische DNA-Immunisierung mit dem Helios Gene Gun System

Die biolistische DNA-Immunisierung wurde mit dem Helios Gene Gun System der Firma Bio-Rad durchgeführt. Bei dieser epi- / intra-dermalen Applikationsmethode wird DNA zunächst an Goldpartikel gebunden, und diese dann mit Hilfe einer Genpistole und Heliumdruck auf die rasierte Bauchhaut von Versuchsmäusen geschossen. Die Goldpartikel penetrieren die Haut. Auf diese Weise gelangt die DNA, die an die Goldpartikel gekoppelte wurde, direkt in die Zellen der Epidermis und Dermis und kann transient von diesen Zellen exprimiert werden. In allen Fällen wurde für die biolistische DNA-Immunisierung Endotoxin-freie Plasmid-DNA verwendet, die mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von QIAGEN aufgereinigt wurde (siehe 2.2.4.4) . Im Rahmen von in vivo Experimenten, bei denen unterschiedliche DNA-Plasmide zum Einsatz kamen, wurden in allen Fällen äquimolare DNA-Mengen verwendet.

2.5.1.1 DNA-Gold-Patronenherstellung

Zunächst wurden die Patronen nach den Angaben des Herstellers, wenn nicht anders angedeutet, angefertigt. Pro Patrone wurden 1 mg Goldpartikel in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen. Anschließend wurde 100 µl Spermidin-Lösung (7,26 mg/ml; gelöst in Endotoxin-freiem Aqua bidest.) hinzugegeben. Das Spermidin soll eine bessere Haftung der DNA an die Goldpartikel bewirken. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 10 bis 20 s in einem Ultraschall-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die DNA in äquimolaren Mengen zu dem Ansatz gegeben. Für

die Präzipitation der DNA an die Goldpartikel wurde 100 µl 1 M CaCl₂-Lösung hinzugegeben, gründlich gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die DNA-Gold-Präzipitate wurden daraufhin mit 10.000 upm sedimentiert und 3 Mal mit 1 ml EtOH abs. gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig entfernt und die DNA-Gold-Präzipitate in einer frisch angesetzten PVP (Polyvinylpyrrolidon) -Lösung (0,075 mg/ml; gelöst in EtOH abs.) aufgenommen. Das PVP soll in diesem Zusammenhang wie ein „Klebstoff“ wirken, damit die DNA-Goldpartikel bei der Patronen-Herstellung am Schlauch haften bleiben. Das Volumen der PVP-Lösung richtet sich nach der vorgesehenen Patronen-Anzahl (3,5 ml PVP-Lösung pro 60 Patronen).

Die Anfertigung der Patronen erfolgte mit einem Tefzel[®]-Schlauch und der *Tubing Prep Station* von Bio-Rad. Zunächst wurde der Schlauch auf die passende Größe zugeschnitten und in die Schiene der *Tubing Prep Station* eingeführt. Anschließend wurde Stickstoff mit einem Druck von 5 psi für 3 min durch den Schlauch geblasen, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Danach wurde die DNA-Gold-Suspension mit Hilfe einer 10 ml Spritze in den Schlauch aufgezogen und wieder zurück in die horizontale Schiene der *Tubing Prep Station* platziert. Es folgte eine Inkubation für 3 min, damit sich die DNA-Goldpartikel absetzen konnten. Danach wurde der Überstand mit einer 10 ml Spritze vorsichtig abgezogen; das Gold blieb dabei gleichmäßig verteilt an dem Schlauch haften. Anschließend wurde erneut Stickstoff mit einem Druck von 5 psi für 3 min durch den Schlauch geblasen um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Zuletzt wurde der Schlauch mit einem speziellen *Tubing Cutter* (Bio-Rad) auf Patronengröße zugeschnitten und in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. In dieser Arbeit erfolgte in allen Fällen die DNA-Immunisierung spätestens 24 h nach der DNA-Gold-Patronenherstellung.

2.5.1.2 DNA-Immunisierung mit der Genpistole

Zunächst wurden die Haare der Bauchhaut von Versuchsmäusen mit einem Elektrorasierer großflächig entfernt. Die Genpistole wurde an eine Heliumflasche angeschlossen und mit einem Druckminderungsventil ein Druck von 400 psi eingestellt. Nachdem die Genpistole mit den DNA-Gold-Patronen beladen worden

war, wurde eine jeweils beschriebene Anzahl an Schüssen auf unterschiedliche Stellen der Bauchhaut abgegeben.

2.5.2 Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE wurde durch Immunisierung mit MOGp35-55 (Aminosäuresequenz: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) in 6 – 10 Wochen alten C57BL/6-Mäusen induziert. Hierfür wurde eine Emulsion bestehend aus einem Teil MOGp35-55 (5 mg/ml; Research Genetics, Huntsville, Alabama, USA), 5 Teilen CFA (Komplettes Freund's Adjuvans; Difco Laboratories), versetzt mit 1% (v/w) Mycobacterium tuberculosis (Difco Laboratories) und 4 Teilen 1 x PBS mit Hilfe eines Ultra-Turrax®-Dispergiergerät angesetzt. Zur EAE-Induktion wurden 100 µl dieser MOGp35-55/CFA-Emulsion in den Schwanzansatz der Mäuse subkutan injiziert. Des Weiteren erhielten die Mäuse am gleichen Tag sowie 48 h später eine intraperitoneale Injektion von jeweils 200 ng Pertussis-Toxin (1 µg/ml gelöst in 1 x PBS; Sigma-Aldrich). Der klinische Verlauf der EAE wurde für die nächsten 24 Tage verfolgt und der Schweregrad der EAE anhand folgender Symptome mit einem sogenannten *EAE Score* bewertet.

Tab. 27: Bewertung der EAE-Symptome (EAE Score)

| EAE Score | Symptome |
|-----------|--|
| 0 | Keine Symptome |
| 1 | Verlust des Schwanztonus |
| 2 | Eingeschränkter Gleichgewichtsreflex, Ataxie |
| 3 | Halbseitige oder komplette Paralyse der Hintergliedmaßen |
| 4 | Tetraplegie |
| 5 | Tot |

2.5.3 Murines Krankheitsmodell der haptенvermittelten Kontaktallergie (contact hypersensitivity, CHS)

Die CHS ist eine als Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) charakterisierte Immunreaktion und wurde erstmals von Bennacerraf and Gell beschrieben^{165,166}. Durch Auftragen eines Kontaktallergens (Hapten) auf die Haut kann die CHS experimentell induziert werden. Bei dieser als Sensibilisierung bezeichneten initialen Phase reagiert das Hapten mit körpereigenen Proteinen und bildet Protein-Hapten-Komplexe. Diese werden durch Langerhans-Zellen zu Peptid-Hapten-Komplexen prozessiert und über MHC-Molekülen T-Zellen präsentiert. Bei dieser Immunreaktion entstehen unter Anderem haptenspezifische T-Gedächtniszellen. Ein zweiter Kontakt mit dem gleichen Hapten (Provokationsphase) induziert eine T-Zellvermittelte Immunantwort. Dies führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion unter Bildung eines Hautausschlags mit maximaler Ausprägung ca. 48 h nach zweiter Haptenapplikation.

In dieser Arbeit wurde das murine Krankheitsmodell der haptенvermittelten Kontaktallergie verwendet, um das therapeutische Potential von DEX-APC zu untersuchen. Zur Induktion einer CHS wurde das als Kontaktallergen wirkende Hapten DNFB (1-Fluor-2,4-dinitrobenzol) verwendet. Hierzu wurde eine 0,4% (v/v) DNFB-Lösung in Aceton / Olivenöl (4:1) angesetzt. Zur Sensibilisierung wurde die DNFB-Lösung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) in einem Volumen von 17 µl auf das rasierte Abdomen von weiblichen C57BL/6 Mäusen epikutan appliziert. 4 Tage später erfolgte die subkutane Injektion von BM-DC oder DEX-APC. Hierzu wurden die BM-DC bzw. DEX-APC geerntet (siehe 2.3.2.5) und mit 3.000 rad bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml mit 5 µM DNBS (2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure) behandelt. Überschüssiges Hapten wurde in drei Waschschritten mit 1 x PBS entfernt. Die Zellen wurden sedimentiert und in einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml in 1 x PBS aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension (5×10^5 Zellen/Tier) wurden subkutan in den Nacken der Versuchmäuse injiziert. Eine Woche später (Tag 12) erfolgte die Provokation. Hierfür wurden 8,5 µl einer 0,2% (v/v) DNFB-Lösung in Aceton / Olivenöl (4:1) auf die Vorder- und Rückseite beider Ohren epikutan aufgetragen. Innerhalb der nächsten 96 h wurde die Ohrdicke der Versuchstiere mit Hilfe eines Mikrometers in Zeitintervallen von 24 h ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit

gemessen. Die Berechnung der tatsächlichen Ohrschwellung erfolgte durch Subtraktion der Ohrdicke vor der Provokation von den Messwerten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Provokation.

Um die Nachhaltigkeit der therapeutischen Behandlung mit den unterschiedlich konditionierten BM-DC in diesem Allergiemodell zu untersuchen, wurden die Versuchstiere nach einem Monat erneut durch epikutane Applikation einer 0,2% (v/v) DNFB-Lösung auf die Ohren provoziert. Die Ohrdicke wurde wie zuvor beschrieben gemessen und die Ohrschwellung auf gleiche Weise durch Subtraktion der Messwerte vor der zweiten Provokation von den Messwerten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der zweiten Provokation ermittelt.

Alternativ wurden die Versuchstiere für weitere in vitro Experimente 7 Tage nach der ersten Provokation geopfert und Milz- bzw. Lymphknotenzellen präpariert.

2.6 Züchtung und Haltung der Versuchstiere

2.6.1 Züchtung

Bei allen für diese Arbeit verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Inzuchtmäuse. Alle Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter pathogenfreien Bedingungen mit einer standardisierten Diät gehalten. Die Züchtung des Mausstamms C57BL/6 (Genotyp H-2^b) wurde von der ZVTE durchgeführt. Der transgene Mausstamm 2D2/Thy1.1 (Genotyp H-2^b) wurde freundlicherweise von Dr. V. Kuchroo (Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt und in den Räumen der ZVTE in Eigenregie gezüchtet. Dieser transgene Mausstamm weist den genetischen C57BL/6-Hintergrund auf und enthält zwei Transgene. Durch das 2D2-Transgen exprimieren die T-Zellen einen spezifischen T-Zellrezeptor, der MOGp35-55 erkennt. Des Weiteren trägt der Stamm homozygot den Lymphozytenmarker Thy1.1 (CD90.1), der von allen T-Zellen exprimiert wird und sich von dem Allel Thy1.2 (CD90.2) aus C57BL/6 in der Aminosäure Arginin (anstatt Glutamin) an Sequenzposition 108 unterscheidet. Für die Züchtung wurden 2D2/Thy1.1-Mäuse mit Thy1.1-Mäusen verpaart. Nachkommen wurden im Alter von 4 Wochen abgesetzt und mittels Durchflusszytometrie typisiert (siehe 2.6.2).

2.6.2 Typisierung von 2D2/Thy1.1-Mäusen

Die Typisierung von Mäusen des Inzuchtstamms 2D2/Thy1.1 erfolgte durch durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus peripherem Blut. Hierfür wurde ein Tropfen Blut aus einer Schwanzvene der Maus entnommen und mit 300 µl PBS / 30mM EDTA / 0,01mM NaN₃ in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die Zellen wurden mit 1.600 upm für 5 min sedimentiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 100 µl hypotonischem Gey's Lyse-Puffer. Die Lyse wurde durch Zugabe von 2 ml kaltem PBS / 2% FCS nach ein bis zwei Minuten gestoppt. Nachdem die Zellen einmal mit kaltem PBS / 2% FCS gewaschen wurden, erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden Oberflächenmoleküle (siehe 2.3.11.1). Zur eindeutigen Identifikation von 2D2/Thy1.1-Mäusen wurde eine Antikörperfärbung für CD4 und/oder CD90.1 (Thy1.1) und Vβ11 (2D2 spezifisches Vβ-Rearrangement des TCR) durchgeführt. Bei 2D2-Mäusen lag der Anteil der Vβ11+ Zellen bei ca. 95% von allen CD4+ Zellen, bei 2D2-negativen Mäusen hingegen lag dieser Prozentsatz bei ca. 5% (siehe Anhang Abbildung 32).

2.7 Grafik und Statistik

Die grafische und statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte über computergestützte Methoden mit der Software *Microsoft® Excel® 2008 für Mac*. Die mit dem studentischen t-Test ermittelten signifikanten Unterschiede wurden durch entsprechende Symbole gekennzeichnet (*,+,#,♦ p < 0,05; **,++,###,◆◆ p < 0,01; ***,+++,####,◆◆◆ p < 0,001).

3. Ergebnisse

3.1 Protektive DNA-Vakzinierung mit MOG-kodierenden Plasmiden zur Intervention einer MOGp35-55-induzierten EAE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Potenzial einer antigenspezifischen DNA-Vakzinierung in vivo zur Inhibierung einer MOGp35-55-induzierten EAE im C57BL/6-Mausmodell untersucht werden. Durch *Gene Gun*-vermittelte biolistische Kotransfektion mit einem antigenkodierendem Expressionsplasmid und einem Plasmid, das für ein immunregulatorisches Zytokin (TGF β oder IL-10) kodiert, sollten dermale DC in einen protolerogenen Zustand versetzt werden, um eine antigenspezifische, regulatorische Immunantwort einzuleiten und einen inhibierenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EAE auszuüben.

3.1.1 Klonierungsstrategie zur Generierung MOG- und MOGp35-55-kodierender Expressionsplasmide

Zunächst waren Expressionsplasmide zu generieren, die eine Transgenexpression des Antigens in transfizierten Zielzellen ermöglichen. Als Ausgangskonstrukt zur Herstellung dieser Expressionsplasmide diente der kommerziell erhältliche lentivirale Expressionsvektor pCDH1-MCS1 (Abbildung 3; SBI, Mountain View, CA). Bei diesem Vektor erfolgt die Expression des Transgens unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors. Eine besondere Eigenschaft dieses Vektors ist, dass er auch für eine retrovirale Transduktion zur stabilen Expression des Transgens in Zielzellen benutzt werden kann.

Da das relevante Antigen über MHC-Moleküle von DC der Haut präsentiert werden soll, war in diesem Zusammenhang die Wirkung einer DC-fokussierten Transgenexpression zu untersuchen. Hierfür wurde als weiteres Ausgangskonstrukt der Vektor pCDH1-Fscn verwendet. Dieser Vektor, bei dem der ubiquitär aktive CMV-Promotor durch den DC-fokussierten Fascin-Promotor ersetzt wurde, ist von Dr. Besche aus der AG Reske-Kunz generiert und beschrieben worden und wurde

freundlicherweise von ihr bereitgestellt. In die MCS (multiple cloning site) dieser beiden Vektoren sollte der ORF (open reading frame) von MOG kloniert werden.

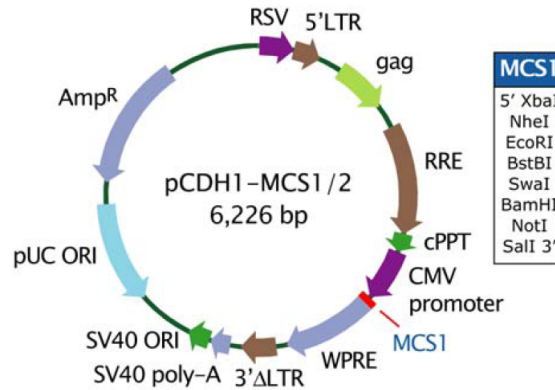


Abbildung 3: pCDH1-MCS1

Der pCDH1-MCS1 wurde als Ausgangskonstrukt zur Generierung der MOG- und MOGp³⁵⁻⁵⁵-kodierenden Plasmide verwendet. Die verfügbaren Restriktionsschnittstellen der MCS sind angegeben. Abkürzungen: RSV/5'LTR - chimärer RSV Promotor/U5 *long terminal repeat* von HIV-1; gag - Verpackungssignal; RRE - *rev response element*; cPPT - zentraler Polypurin-Trakt; CMV - *human immediate early cytomegalovirus*-Promotor; MCS - *multiple cloning site*; WPRE - *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; 3'ΔLTR - selbst-inaktivierende 3'LTR mit einer Deletion in der U3 Region; SV40 poly-A - Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal; SV 40 ORI - Replikationsursprung in eukaryotischen Zellen; pUC ORI - Replikationsursprung in *E. coli*; AmpR - Ampicillinresistenz.

In der EAE von Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund nimmt ein bestimmter Bereich der vollständigen MOG-Polypeptidkette, das MOGp³⁵⁻⁵⁵, als Epitop eine immunodominante Rolle ein. Deswegen sollten weitere Expressionskonstrukte generiert werden, die eine spezifische Transgenexpression von MOGp³⁵⁻⁵⁵ ermöglichen. Diebold et al.¹¹⁴ konnten durch Transfektionsexperimente mit APC zeigen, dass die Fusion eines Transgens mit der Invarianten Kette (Ii) zu einer effektiven Präsentation des transgenen Peptids über MHC-II-Moleküle führt. Um eine Präsentation des transgenen MOGp³⁵⁻⁵⁵ über MHC-II-Moleküle von transfizierten DC zu forcieren, sollten aus diesem Grund entsprechende Expressionskonstrukte generiert werden, bei denen das MOGp³⁵⁻⁵⁵ mit vorgeschalteter Ii fusioniert exprimiert wird. In Abbildung 4 ist eine schematische Übersicht aller generierten MOG- und MOGp³⁵⁻⁵⁵-Expressionkonstrukte zu sehen.

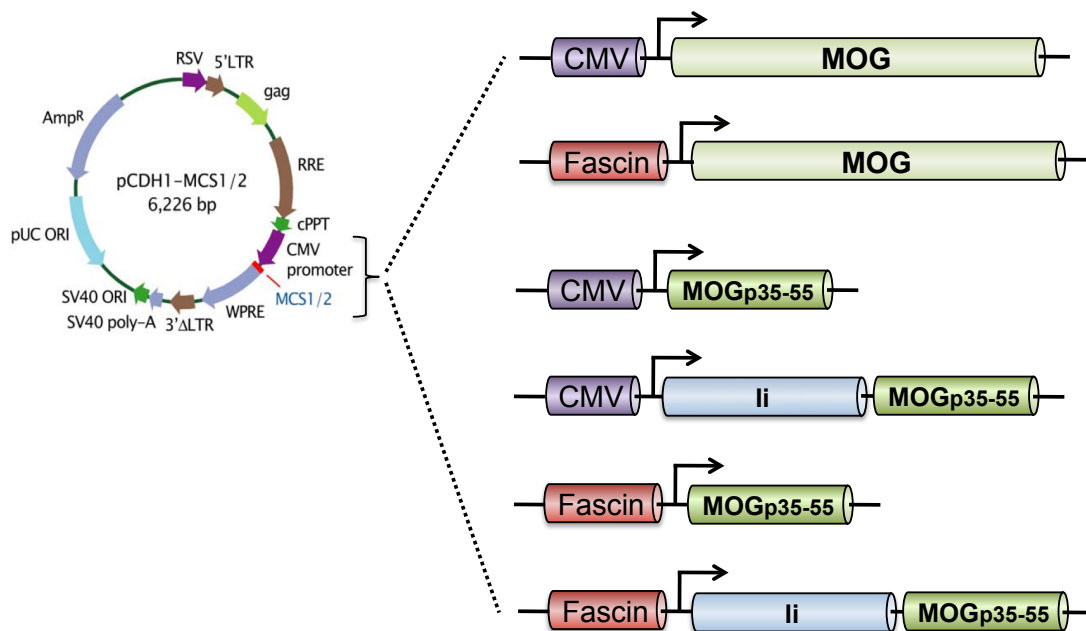


Abbildung 4: Schematische Darstellung der generierten MOG- und MOGp35-55-Expressionskonstrukte

Für eine angestrebte DNA-Vakzinierung in dem murinen Krankheitsmodell der MOGp35-55 induzierten EAE wurden die dargestellten MOG- und MOGp³⁵⁻⁵⁵ kodierenden Expressionskonstrukte generiert. Abkürzungen: CMV - Cytomegalie Virus Promotor; EAE – Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis; Fascin – Fascin Promotor; li – Invariante Kette; MOG – Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein; MOGp35-55 – Peptid 35-55 von MOG

Für die Herstellung der in Abbildung 4 dargestellten Expressionskonstrukte wurde pCDH1-MCS1 mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Sa*II und pCDH1-Fscn mit den Endonukleasen *Eco*RI und *Sa*II restringiert. Die linearisierten Plasmide wurden durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1% TAE-Agarose-Gel und nachfolgender Elution aufgereinigt. Die 5'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Endsequenzen wurden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit Nukleotiden aufgefüllt, um sogenannte 5'- und 3'-*blunt ends* zu erzeugen. Nachfolgend wurde das 5'-Ende mit *Sa*II restringiert, um Plasmide mit einem *Sa*II-restringierten 5'-*sticky end* und einem 3'-*blunt end* zu erhalten. Die beiden linearisierten Plasmide wurden aufgereinigt und für Ligationen mit den zu inserierenden DNA-Fragmenten eingesetzt.

3.1.1.1 Klonierung der MOG-kodierenden Expressionsplasmide

Um die Herstellung von MOG-kodierenden Expressionsplasmiden zu ermöglichen, musste zunächst eine geeignete DNA-Matrize mit dem ORF des MOG generiert werden. Hierzu wurde das Gehirn einer C57BL/6-Maus präpariert und das Gewebe lysiert und homogenisiert. Die in dem Lysat enthaltene Gesamt-RNA wurde isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dieser Gehirn-cDNA-Pool diente als Matrize zur Amplifikation des MOG-ORF unter Verwendung der Primer mMOG-ORF*Xho*-s und mMOG-ORF*Sal*-as. Durch elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes in einem 1% TAE-Agarose-Gel konnte eine spezifische DNA-Bande entsprechend der Größe des MOG-ORF (762 Basenpaare (Bp)) nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 5**).

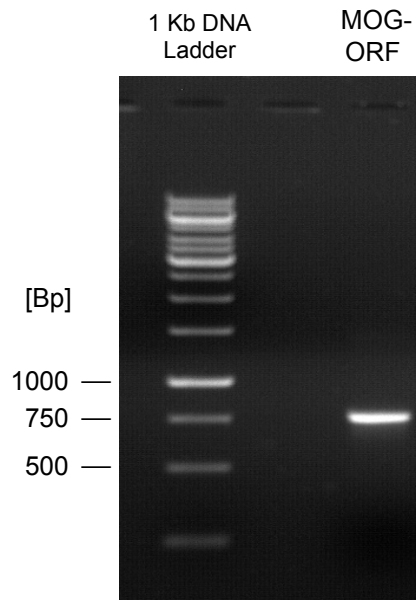


Abbildung 5: PCR-Amplifikation von MOG

Zur Generierung des MOG-ORF-Amplifikats mittels PCR diente ein cDNA-Pool aus Gehirnzellen einer C57BL/6 Maus. Der PCR-Ansatz wurde auf einem 1% TAE-Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und die Bestimmung der DNA-Fragmentgröße erfolgte mit dem angegebenen Größenstandard.

Das MOG-ORF-Amplifikat wurde mit dem Klenow-Fragment und dNTPs behandelt, um die freien DNA-Enden aufzufüllen. Anschließend wurde das Fragment mit der Endonuklease *SalI* hydrolysiert. Somit besaß das MOG-ORF mit einem 3'-*blunt end* und einem *SalI*-restringierten 5'-*sticky end* kompatible DNA-Enden zu den linearisierten Vektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-Fscn und wurde in einer Ligationsreaktion mit diesen in einem molaren Verhältnis von 3:1 und 10:1

eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden für eine Transformation in elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Die Selektion der Transformanten erfolgte anhand des plasmidkodierten Ampicillin-Resistenzgens durch Kultivierung auf LB/Amp-Platten. Einzelkolonien wurden mittels Koloniefilterhybridisierung auf das Vorhandensein der MOG-ORF-Sequenz untersucht.

Die Plasmid-DNA von solchen Einzelkolonien, bei denen die MOG-ORF-Sequenz nachgewiesen werden konnte, wurde daraufhin mittels Isopropanol-Minipräparation isoliert und mittels Endonukleaseverdau untersucht (siehe Abbildung 6).

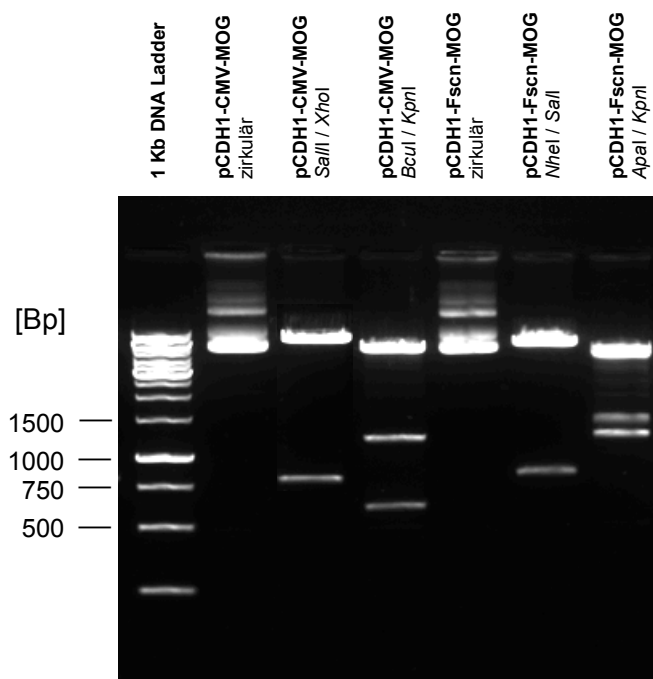


Abbildung 6: Restriktionsanalysen von pCDH1-CMV-MOG und pCDH1-Fscn-MOG

Zur Identifizierung der generierten DNA-Konstrukte wurden pCDH1-CMV-MOG und pCDH1-Fscn-MOG mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem 0,9% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines Molekulargewichtstandards.

Der Vektor pCDH1-CMV-MOG wurde mit *Sall* und *XhoI* hydrolysiert. Durch Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde das zu erwartende Restriktionsmuster mit einer DNA-Bande entsprechend einer Länge von 762 Bp erzielt. In einem weiteren Restriktionsansatz wurde pCDH1-CMV-MOG mit den Enzymen *KpnI* und *BclI* hydrolysiert, wodurch sich ein entsprechendes Restriktionsmuster mit drei DNA-Banden entsprechend einer Länge von 5232, 1150 und 605 Bp zeigte. Der Vektor pCDH1-Fscn-MOG wurde mit *NheI* und *Sall*

restringiert, wodurch ein DNA-Fragment mit einer Länge von 797 Bp entstanden ist. Nach Restriktion mit den Endonukleasen *ApaI* und *KpnI* konnte des Weiteren ein zu erwartendes Restriktionsmuster mit drei DNA-Banden entsprechend einer Länge von 6656, 1409 und 1173 Bp mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden.

Die im Rahmen der Restriktionsanalyse als positiv detektierten Vektoren wurden anschließend zur eindeutigen Identifizierung im Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz sequenziert.

3.1.1.2 Klonierung der MOGp35-55- und li-MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide

Da es sich bei dem MOGp35-55 um ein relativ kleines DNA-Fragment mit einer Länge von 63 Bp handelt, wurde für die Generierung der MOGp35-55- und li-MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide zunächst das Fusionsprodukt li-MOGp35-55 hergestellt. Dieses wurde in die Ausgangskonstrukte pCDH1-MCS1 und pCDH1-Fscn kloniert, um die beiden Expressionsplasmide pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 zu erhalten. Die li wurde daraufhin aus beiden Expressionskonstrukten exzisiert, die linearen Plasmide religiert und somit pCDH1-CMV-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-MOGp35-55 generiert.

Zur Amplifikation der li wurde die Gesamt-RNA aus lysierten Zellen einer BM-DC-Kultur mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN) isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dieser cDNA-Pool diente als Matrize zur Amplifikation der li unter Verwendung der Primer *mli-ORFBam-s* und *mli-214Xho-as*. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1% TAE-Agarose-Gel konnte eine spezifische DNA-Bande mit einer Größe von 642 Bp entsprechend der li-Sequenz gezeigt werden (siehe Abbildung 7).

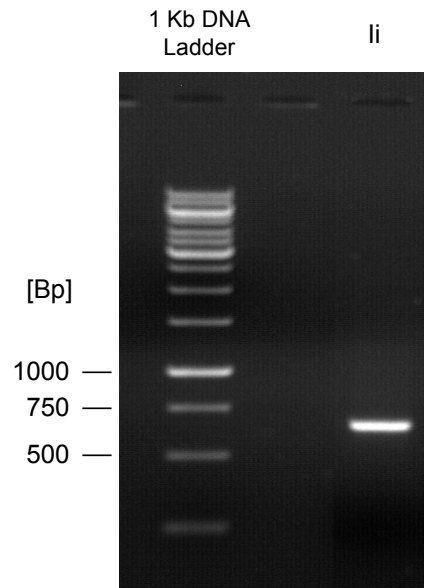


Abbildung 7: PCR-Amplifikation der invarianten Kette (li)

Zur Generierung des li-Amplifikats mittels PCR diente der cDNA-Pool aus einer BM-DC-Kultur. Der PCR-Ansatz wurde in einem 1% TAE-Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und die Bestimmung der DNA-Fragmentgröße erfolgte mit dem angegebenen Größenstandard.

Für die Generierung der 63 Bp langen MOGp35-55-Fragmente wurden die beiden Oligonukleotide mMOG35-55-s und mMOG35-55-as entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon kommerziell synthetisiert. Wie in Abbildung 8 dargestellt, enthält das Oligonukleotid mMOG35-55-s am 5'-Ende eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und den ersten 49 Nukleotiden entsprechend des *sense*-DNA-Strangs von MOGp35-55. Das Oligonukleotid mMOG35-55-as überspannt den kodierenden Bereich der letzten 39 Nukleotide als *antisense*-DNA-Strang und enthält am 5'-Ende eine *Sal*I-Restriktionsschnittstelle. Somit besitzen die beiden Oligonukleotide einen komplementären Bereich von 25 Nukleotiden. Dies ermöglichte eine Hybridisierungsreaktion zwischen den beiden einzelsträngigen Oligonukleotiden. Anschließend wurden die DNA-Einzelstränge durch das Klenow-Fragment mit dNTPs aufgefüllt. Somit wurde ein DNA-Doppelstrang, bestehend aus der *Xho*I-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende, dem ATG-Startcodon, der kompletten Nukleotidsequenz für MOGp35-55 und der *Sal*I-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, generiert (siehe Abbildung 8).

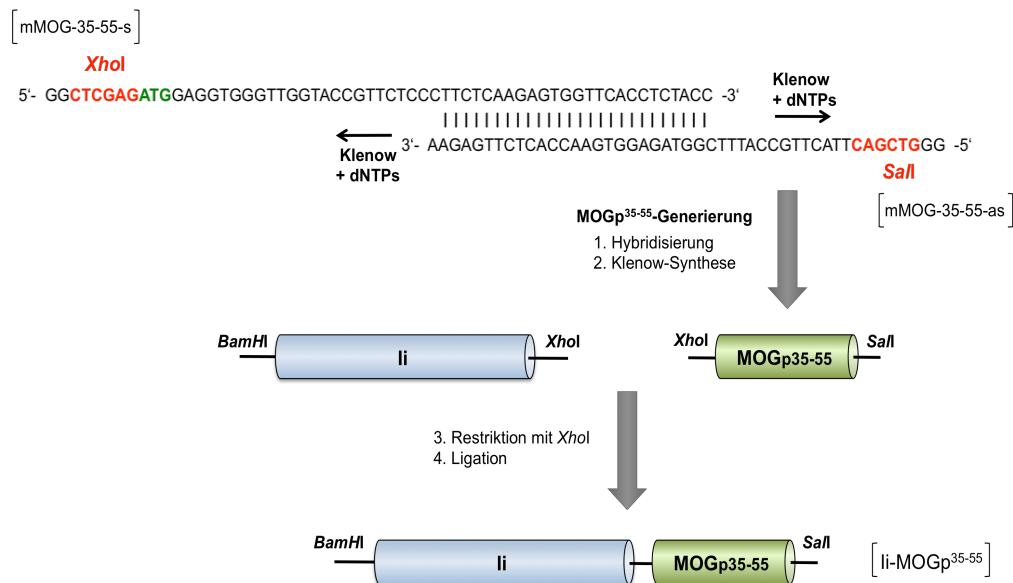


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Generation von MOGp³⁵⁻⁵⁵ und li-MOGp³⁵⁻⁵⁵

Die Nukleotidsequenz von mMOG35-55-s mit *XhoI*-Restriktionsschnittstelle (rot) und mit Startcodon ATG (grün) von 5'- in 3'-Richtung und die Nukleotidsequenz von mMOG35-55-as mit Restriktionsschnittstelle *SalI* (rot) in 3'- 5'-Richtung ist dargestellt. Durch den 25 Nukleotide langen komplementären Bereich konnten die beiden Oligonukleotide miteinander hybridisieren und durch Klenow-Behandlung wurde so MOGp³⁵⁻⁵⁵ generiert. Anschließend wurden li und MOGp³⁵⁻⁵⁵ mit *XhoI* restringiert und nachfolgend ligiert. Das resultierende Produkt li-MOGp³⁵⁻⁵⁵ wurde für die Generierung aller MOGp³⁵⁻⁵⁵-kodierenden Expressionskonstrukte verwendet.

Sowohl die li als auch MOGp35-55 wurden mit der Endonuklease *XhoI* hydrolysiert, um kompatible DNA-Enden zu generieren. Die beiden Fragmente wurden mit dem Enzym T4 DNA-Ligase ligiert. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Primern mli-ORFBam-s und mMOG35-55-as. Das Amplifikat li-MOGp35-55 wurde mit der gleichen Strategie wie das MOG in die beiden Ausgangskonstrukte pCDH1-MCS1 und pCDH1-Fscn kloniert. Hierfür wurde li-MOGp35-55 mit dem Klenow-Fragment und dNTPs behandelt, um die freien DNA-Enden aufzufüllen. Anschließend wurde das Fragment mit der Endonuklease *SalI* hydrolysiert. Das entstandene Produkt, das li-MOGp35-55 mit 5'-blunt end und *SalI*-restringiertem 3'-sticky end wurde für eine Ligation mit den linearisierten Vektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-Fscn (siehe 3.1.1.1) verwendet. Die Ligationsansätze wurden für eine Transformation in elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Hilfe des plasmidkodierten Ampicillin-Resistenzgens durch Kultivierung auf LB/Amp-Platten. Einzelkolonien wurden entnommen und ihre Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein der li-MOGp35-55-Sequenz untersucht (siehe Abbildung 9). Hierfür wurde pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und

pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 mit den Endonukleasen *NheI* und *SalI*, deren Erkennungssequenzen im 5'- bzw. 3'-flankierenden Bereich des Inserts liegen, hydrolysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 0,9% Agarosegel zeigte sich für beide Vektoren eine DNA-Bande entsprechend der Größe des Inserts li-MOGp35-55 (750 Bp). In einer weiteren Restriktionskontrolle wurde durch Hydrolyse von pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 mit *KpnI* und *BclI* das zu erwartende Restriktionsmuster mit drei DNA-Banden entsprechend einer Länge von 5232, 1062 und 650 Bp nach elektrophoretischer Auftrennung erzielt. Der Vektor pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 wurde in einem zweiten Restriktionsansatz mit *ApaI* und *KpnI* hydrolysiert. Durch diesen Ansatz wurden durch Gelelektrophorese drei DNA-Banden entsprechend einer Länge von 6721, 1896 und 650 Bp aufgetrennt.

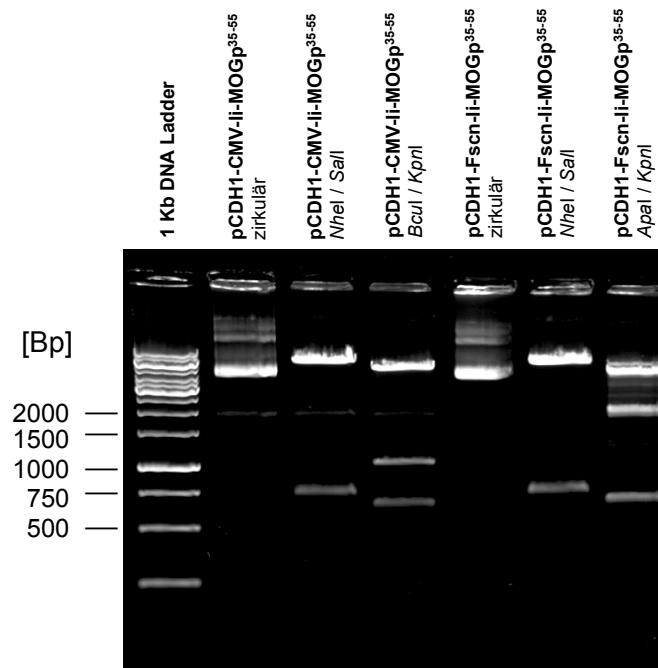


Abbildung 9: Restriktionsanalyse von pCDH1-CMV-li-MOGp³⁵⁻⁵⁵ und pCDH1-Fscn-li-MOGp³⁵⁻⁵⁵

Zur Identifizierung der generierten DNA-Konstrukte wurden pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem 0,9% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines Molekulargewichtstandards.

Die im Rahmen der Restriktionsanalyse als positiv detektierten Vektoren wurden anschließend zur eindeutigen Identifizierung im Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz sequenziert.

Die Vektoren pCDH1-CMV-MOGp35-55 und pCDH1-FscnMOGp35-55 wurden durch Exzision der li-kodierenden Sequenz aus pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 bzw. pCDH1-

Fscn-li-MOGp35-55 und nachfolgender Religation der Plasmide generiert. Hierzu wurden beide Vektoren mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I hydrolysiert. Durch Agarose-Gelelektrophorese der Restriktionsansätze konnten für beide Ansätze eine DNA-Bande mit einer Größe von 642 Bp entsprechend der li-Sequenz dargestellt werden. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde durch Gel-Elution aus dem Agarose-Gel gewonnen. Um DNA-*blunt ends* zu generieren, wurden die beiden linearisierten Plasmide mit Klenow-Fragment und dNTPs behandelt. Die beiden Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese und Gel-Elution aufgereinigt und anschließend durch Inkubation mit der T4 DNA-Ligase religiert. Die Ligationsansätze wurden für eine Transformation in elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Hilfe des plasmidkodierten Ampicillin-Resistenzgens durch Kultivierung auf LB/Amp-Platten. Einzelkolonien wurden entnommen und ihre Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse überprüft. Der Vektor pCDH1-CMV-MOGp35-55 wurde mit den Endonukleasen *Bcu*I und *Kpn*I restringiert.

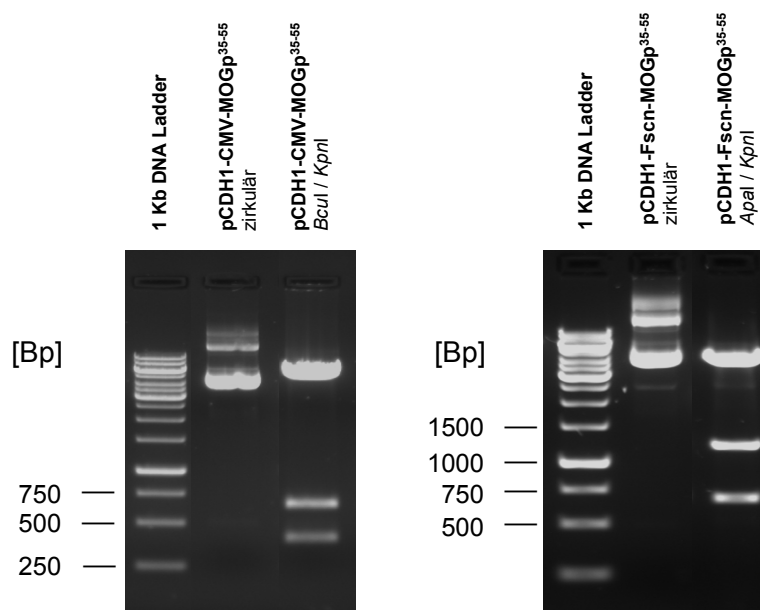


Abbildung 10: Restriktionsanalyse von pCDH1-CMV-MOGp³⁵⁻⁵⁵ und pCDH1-Fscn-MOGp³⁵⁻⁵⁵

Zur Identifizierung der generierten DNA-Konstrukte wurden pCDH1-CMV-MOGp³⁵⁻⁵⁵ und pCDH1-Fscn-MOGp³⁵⁻⁵⁵ mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem 0,9% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines Molekulargewichtstandards.

Durch Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese konnte das zu erwartende Restriktionsmuster mit drei DNA-Banden entsprechend einer Länge von 5232, 650 und 406 Bp gezeigt werden (siehe Abbildung 10 links). Der Vektor pCDH1-Fscn-

MOGp35-55 wurde mit *Apal* und *KpnI* hydrolysiert. Ein entsprechendes Restriktionsmuster mit drei DNA-Banden einer Größe von 6730, 1240 und 650 Bp konnte durch elektrophoretische Auftrennung dargestellt werden (siehe Abbildung 10 rechts).

3.1.2 Funktionalität der generierten MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide

3.1.2.1 Die Elektroporation mit dem MicroPorator MP-100 eignet sich zur Transfektion von BM-DC in vitro

Für die angestrebte DNA-Vakzinierung in vivo ist es eine Grundvoraussetzung, dass das relevante Antigen in transfizierten Zielzellen exprimiert wird und über MHC-Moleküle präsentiert wird. Aus diesem Grund sollte in einem in vitro Experimentalansatz eruiert werden, ob durch transiente Transfektion von BM-DC mit den generierten MOG- und MOGp35-55-kodierenden Plasmidvektoren eine Transgenexpression und -präsentation über MHC-Moleküle erzielt werden kann. Die Transfektion der BM-DC wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (MicroPorator MP-100) durchgeführt.

Um eine optimierte Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden BM-DC in einem Vorexperiment mit titrierten Plasmid-DNA-Mengen an pCDH1-copGFP transfiziert und anschließend der prozentuale Anteil copGFP+ Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Hierfür wurden Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mit GM-CSF zu BM-DC differenziert. An Tag 8 der Kultur erfolgte die transiente Transfektion der BM-DC unter optimierten Bedingungen nach Bros et al.¹⁵⁸. 24 Stunden später wurden die BM-DC mittels Durchflusszytometrie auf die transgene Expression des Reporters copGFP untersucht (siehe Abbildung 11). In diesem Vorexperiment zeigte sich, dass bei einer DNA-Menge von 60 µg pCDH1-copGFP pro 10⁶ BM-DC mit 15,6 % copGFP exprimierender Zellen die höchste Transfektionseffizienz erzielt werden konnte. Einen vergleichbaren, wenn auch geringfügig geringeren prozentualen Anteil copGFP positiver Zellen konnte bei einer Transfektion mit 40 µg (14,4 %) oder 80 µg (14,7 %) pCDH1-copGFP ausgemacht werden. Bei einer geringeren Plasmid-DNA-

Menge von 20 µg konnte lediglich eine Transfektionsrate von 6,69 % copGFP positiver Zellen erreicht werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde bei allen weiteren Transfektionsexperimenten mit dem MicroPorator-System eine Plasmid-DNA-Menge von 60 µg pro 10^6 BM-DC verwendet. In Experimenten, bei denen verschiedene Expressionskonstrukte zum Einsatz kamen, wurden stets äquimolare DNA-Mengen eingesetzt.

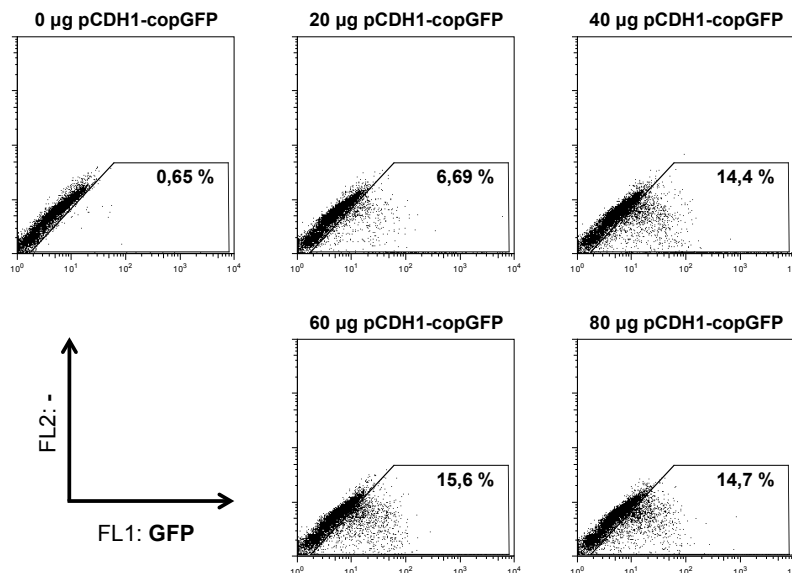


Abbildung 11: Titration der Plasmid-DNA-Menge zur Optimierung der Transfektionseffizienz von BM-DC mittels Elektroporation

Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und durch Kultivierung mit GM-CSF zu BM-DC differenziert. An Tag 8 der Kultur wurden 1×10^6 BM-DC mit titrierten DNA-Mengen an pCDH1-copGFP durch Elektroporation mit dem MicroPorator MP-100 (Parameter: Spannung 1450 V, Impulsdauer 30 ms, 1 Impuls) transfiziert. 24 Stunden später wurde die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.2.2 In vitro Transfektion von BM-DC mit MOG- und MOGp35-55-kodierenden Plasmiden führt zur Präsentation von MOGp35-55 über MHC-II.

Da gezeigt werden konnte, dass die Elektroporation mit dem MicroPorator MP-100 unter optimierten Bedingungen eine transiente Transfektion von BM-DC mit einer vergleichsweise guten Transfektionseffizienz von bis zu 15,6 % (siehe Abbildung 11) ermöglicht, wurde mit dieser Methode die Funktionalität aller MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide in vitro eruiert. Ziel dieser Untersuchung war es, BM-DC von C57BL/6 Mäusen mit den Expressionskonstrukten zu transfizieren,

sodass diese das MOG bzw. MOGp35-55 exprimieren und über MHC-II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentieren. Der Nachweis sollte durch Bestimmung der antigenspezifischen Proliferation von MOGp35-55-reaktiven T-Zellen aus 2D2 Mäusen¹⁴⁷ in einer nachfolgenden syngenen Kokultur erfolgen.

In einem Kontrollansatz wurde eine vergleichende Analyse zwischen unbehandelten und pCDH1-copGFP transfizierten BM-DC durchgeführt. Durch Messung der antigenabhängigen Proliferation von 2D2 T-Zellen zeigte sich dabei, dass unbehandelte und pCDH1-copGFP transfizierte BM-DC, die jeweils mit MOGp35-55 gepulst worden sind, ein vergleichbar starkes T-Zellstimulierungspotenzial besitzen (siehe Abbildung 12). Dagegen konnte bei den entsprechenden ungepulsten Aliquoten keine 2D2 T-Zellproliferation detektiert werden.

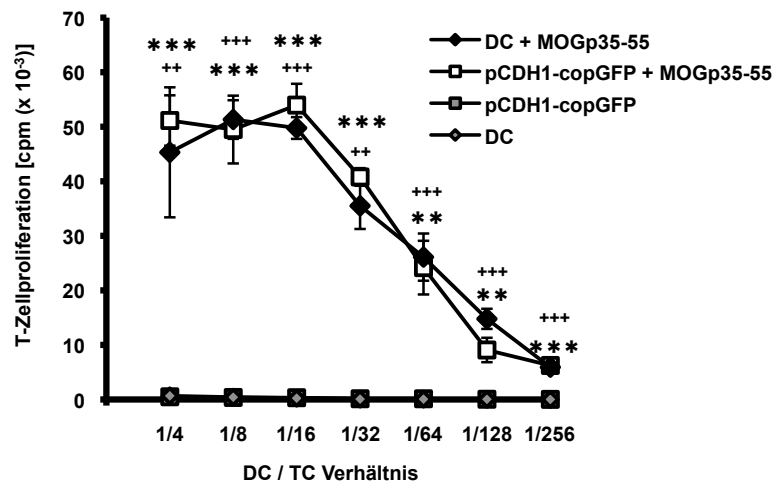


Abbildung 12: Eine Transfektion von BM-DC mit dem *MicroPorator* hat keinen Einfluss auf deren T-Zellstimulierungspotenzial

Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit GM-CSF zu BM-DC differenziert. Aliquote der Kultur wurden an Tag 8 mit pCDH1 (Leervektor) transfiziert oder unbehandelt belassen. Einen Tag später wurden die DC mit 1 µg/ml LPS für 24 h zur Ausreifung gebracht. Die Zellen wurden mit 3.000 rad bestrahlt und Aliquote der unbehandelten und transfizierten DC mit 10 µg/ml MOGp³⁵⁻⁵⁵ für 4 h gepulst oder ungepulst belassen. Die vier verschiedenen DC-Populationen wurden in Triplikaten, beginnend mit 2×10^4 Zellen, seriell verdünnt und durchgehend mit 8×10^4 T-Zellen aus 2D2 Mäusen für 96 h kokultiviert. Die T-Zellproliferation wurde anhand der Inkorporation von ³H-Thymidin während der letzten 16 h der Kokultur gemessen. Die Daten zeigen die absolute T-Zellproliferation \pm Standardfehler und sind repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede der unbehandelten, MOGp³⁵⁻⁵⁵ gepulsten DC (+) und der pCDH1 transfizierten, MOGp³⁵⁻⁵⁵ gepulsten DC (*) zu der unbehandelten und ungepulsten DC Kontrollgruppe sind angegeben (+,* p<0,05; **, ** p<0,01; +++, *** p<0,001).

In diesem Experimentalansatz konnte somit gezeigt werden, dass 2D2 T-Zellen nur in antigenspezifischem Kontext zur Proliferation gebracht werden, und dass das antigenspezifische T-Zellstimulierungspotenzial der BM-DC durch die Transfektionsmethode per se nicht beeinflusst wird.

In parallelen Ansätzen wurden BM-DC mit allen generierten MOG- und MOGp35-55 kodierenden Plasmiden auf gleiche Weise transfiziert und in die Kokultur mit 2D2 T-Zellen eingesetzt.

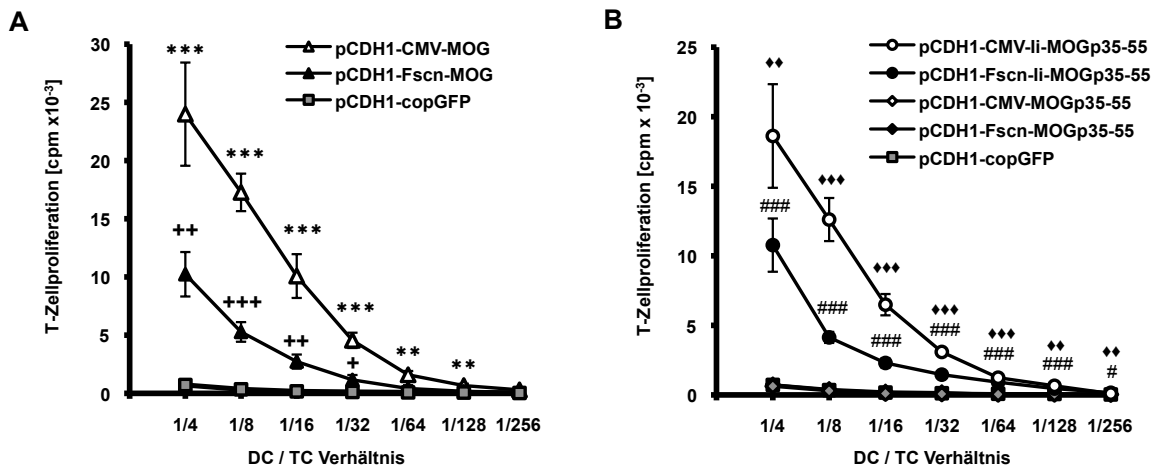


Abbildung 13: In vitro-Transfektion von BM-DC mit MOG und MOGp³⁵⁻⁵⁵ kodierenden Plasmiden

Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit GM-CSF zu BM-DC differenziert. Aliquote der Kultur wurden an Tag 8 mit dem MicroPorator MP-100 (Parameter: Spannung 1450 V, Impulsdauer 30 ms, 1 Impuls) mit pCDH1-copGFP und den generierten **[A]** MOG- und **[B]** MOGp³⁵⁻⁵⁵-kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert. Einen Tag später wurden die DC mit 1 µg/ml LPS für 24 h zur Ausreifung gebracht. Die unterschiedlich transfizierten DC wurden mit 3.000 rad bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 8×10^4 T-Zellen aus 2D2 Mäusen für 96 h kokultiviert. Die T-Zellproliferation wurde Anhand der Inkorporation von ³H-Thymidin während der letzten 16 h der Kokultur gemessen. Die Daten geben die absolute T-Zellproliferation \pm Standardfehler in [cpm ($\times 10^{-3}$)] an und sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängig durchgeführte Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede von DC, die mit pCDH1-CMV-MOG (*), pCDH1-Fscn-MOG (+), pCDH1-CMV-li-MOGp³⁵⁻⁵⁵ (♦) oder pCDH1-Fscn-li-MOGp³⁵⁻⁵⁵ (#) transfiziert wurden, im Vergleich zu pCDH1-copGFP transfizierten DC sind angegeben (*,+,♦,# p<0,05; **,++,♦♦,### p<0,01; ***,+++,♦♦♦,#### p<0,001).

Hierbei zeigte sich, dass BM-DC, die mit dem pCDH1-CMV-MOG oder dem pCDH1-Fscn-MOG transfiziert wurden, 2D2 T-Zellen zur Zellproliferation anregen (siehe Abbildung 13 A). Ein vergleichbares Resultat konnte durch Transfektion mit den Expressionsplasmiden pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 erzielt werden (siehe Abbildung 13 B). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass BM-DC, die mit diesen Plasmiden transfiziert werden, das MOG transgen exprimieren und dabei MOGp35-55 über MHC-II präsentieren. Interessanterweise konnte bei den Transfektionsansätzen mit den äquivalenten MOGp35-55-kodierenden Plasmiden ohne Invariante Kette (Ii) keine bzw. eine sehr geringe Proliferation detektiert werden. Somit ist evident, dass die Invariante Kette in diesem Kontext essentiell ist, um das

transgenexprimierte MOGp35-55 effizient in das MHC-II-Kompartiment der Zelle einzuschleusen, eine Präsentation über MHC-II zu ermöglichen und eine signifikante Proliferation von 2D2 T-Zellen zu induzieren. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse eine moderate antigenspezifische Proliferation durch Transfektion mit pCDH1-Fscn-MOG und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 im Vergleich zu den jeweils korrespondierenden Plasmiden mit CMV-Promotor. Dies verdeutlicht, dass die Transgenexpression von MOG bzw. MOGp35-55 durch den Fascin-Promotor im Vergleich zu dem CMV-Promotor schwächer ist. Erwartungsgemäß fällt die Proliferation der 2D2 T-Zellen in Gegenwart von DC, die mit den MOG- und li-MOGp35-55-kodierenden Plasmiden transfiziert wurden, geringer aus als bei den MOGp35-55 gepulsten DC (Vergleich Abbildung 12 und Abbildung 13). Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch eine zu erwartende Transfektionseffizienz von ungefähr 15 % (siehe Abbildung 11) kein vergleichbarer Sättigungsgrad MOGp35-55-besetzter MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von DC erzielt werden kann wie durch exogene Zugabe von MOGp35-55.

Zusammenfassend belegen die *in vitro* Transfektionsexperimente, dass die generierten Expressionsplasmide pCDH1-CMV-MOG, pCDH1-Fscn-MOG, pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 funktional sind und eine Transgenexpression und -präsentation über MHC-II-Moleküle in APC als Zielzellen ermöglichen.

3.1.2.3 Die Gene Gun-basierte DNA-Immunisierung induziert *in vivo* MOGp35-55-präsentierende APC in den drainierenden Lymphknoten.

Nachdem die generelle Funktionalität der MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmide dargelegt wurde, musste für die angestrebte DNA-Vakzinierung des Weiteren eruiert werden, ob eine biolistische Gene Gun-Immunisierung zu der Induktion von MOGp35-55-präsentierenden APC *in vivo* in den Lymphknoten der transfizierten Mäuse führt.

Um dies nachzuweisen, wurde ein adoptiver Transfer von CFSE-markierten naiven CD90.1⁺CD4⁺CD25⁻β11⁺ T-Zellen aus 2D2/Thy1.1-Mäusen in syngene C57BL/6 Rezipienten-Mäuse (CD90.2⁺) durchgeführt. Die Rezipienten-Mäuse wurden einen Tag später mittels Gene Gun mit den Expressionsplasmiden pCDH1-CMV-MOG, pCDH1-Fscn-MOG, pCDH1-CMV-li-MOGp35-55, pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55 oder

Leervektor pCDH1-MCS1 biolistisch transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurden die inguinalen Lymphknotenzellen der Rezipienten-Mäuse präpariert und die *in vivo* Proliferation der transferierten CFSE-markierten 2D2 T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

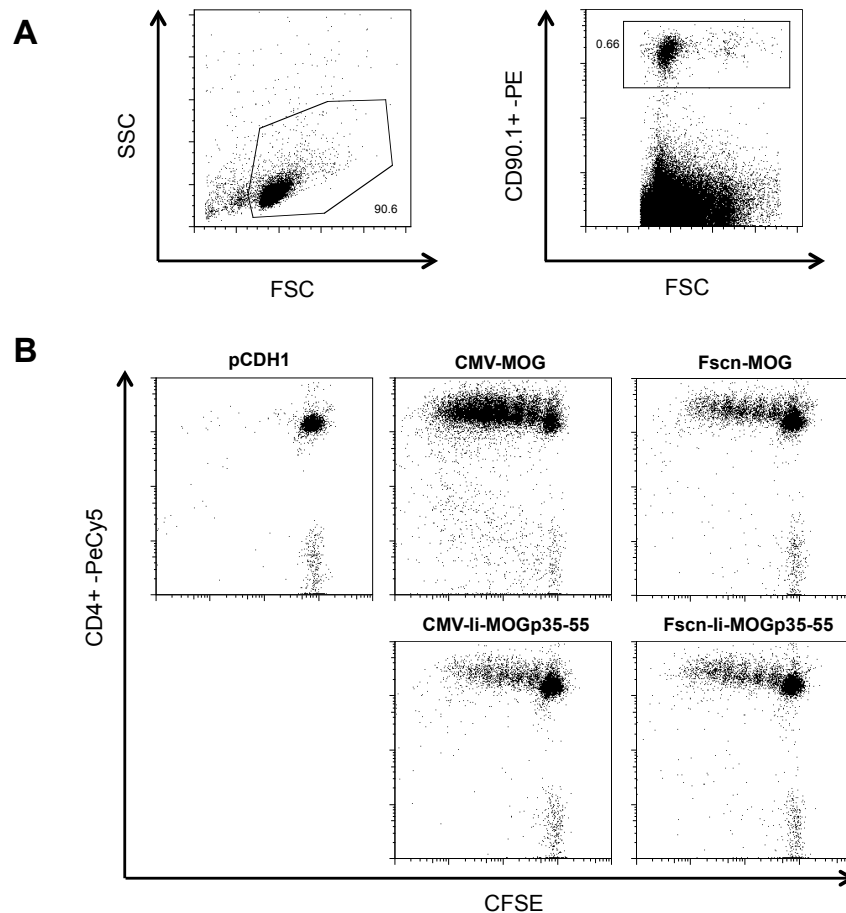


Abbildung 14: Die biolistische DNA-Vakzinierung mit MOG- und MOGp³⁵⁻⁵⁵-kodierenden Plasmiden induziert *in vivo* Proliferation von 2D2 T-Zellen in drainierenden Lymphknoten.

Einen Tag vor der biolistischen DNA-Immunisierung wurden 1×10^7 MACS-aufgeklärte CD90.1⁺CD4⁺CD25⁻Vβ11⁺ T-Zellen aus 2D2/Thy1.1-Mäusen mit CFSE markiert und via intravenöser Injektion in syngene C57BL/6-Mäuse (CD90.2⁺) transferiert. Die Rezipienten-Mäuse wurden auf der rasierten Bauchoberfläche mit äquimolaren DNA-Mengen (4 Schuss á 4 µg DNA) mittels Gene Gun immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die inguinalen Lymphknotenzellen präpariert und für durchflusszytometrische Analysen die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD90.1 antikörpervermittelt angefärbt. **[A]** Die *Gating*-Strategie zur Untersuchung der transferierten CFSE-markierten CD90.1⁺CD4⁺ 2D2 T-Zellen ist dargestellt. **[B]** Die Proliferation von 2D2 T-Zellen ist anhand der seriellen Verdünnung der CFSE-Markierung verdeutlicht. Die dargestellte Abbildung ist für drei unabhängig durchgeführte Experimente repräsentativ (die MOGp35-55-kodierenden Expressionskonstrukte wurden bei einem Experiment mitgeführt).

Anhand der seriellen Verdünnung der CFSE-Markierung konnte eine Proliferation von 2D2 T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten der Mäuse, die mit den MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert wurden, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 B). Hierbei zeigte sich eine deutlich stärkere Proliferation

durch die DNA-Vakzinierung mit pCDH1-CMV-MOG im Vergleich zu den Ansätzen mit pCDH1-Fscn-MOG, pCDH1-CMV-li-MOGp35-55 und pCDH1-Fscn-li-MOGp35-55. In einer adäquaten Kontrolle mit pCDH1 (Leervektor) immunisierten Mäusen konnte hingegen keine Proliferation von 2D2 T-Zellen detektiert werden.

Dieser experimentelle Ansatz beweist, dass durch die Gene Gun-gestützte biolistische DNA-Immunsierung mit den generierten MOG- und MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmiden DC transfiziert werden, die MOGp35-55 über MHC-II in den drainierenden Lymphknoten präsentieren und die Fähigkeit besitzen, reaktive T-Zellen in einem antigenspezifischen Kontext zu aktivieren.

3.1.3 Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden wirkt inhibierend auf den Verlauf einer MOGp35-55-induzierten EAE.

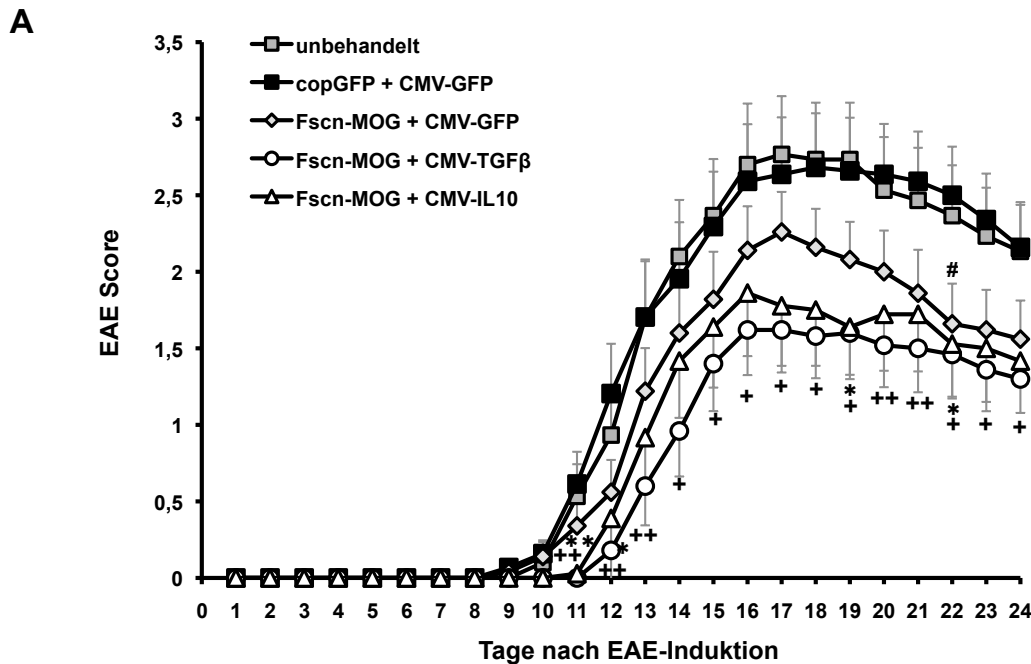
In 3.1.2 wurde die grundsätzliche Funktionalität der generierten MOG- und MOGp35-55-kodierenden Plasmide in Kombination mit einer Gene Gun-gestützten biolistischen DNA-Transfektion dargestellt. Im Folgenden sollte das Potenzial der DNA-Vakzinierung zur Inhibierung einer MOGp35-55-induzierten EAE untersucht und zugrunde liegende Mechanismen aufgedeckt werden. Da in diversen Publikationen gezeigt werden konnte, dass sich die T-Zellreaktivität im Verlauf einer EAE auf andere Epitope von Myelinproteinen ausbreitet^{167,168,169}, ein Phänomen, dass als *epitope spreading* bezeichnet wird, wurden in dieser Arbeit die antigencodierenden Plasmide pCDH1-CMV-MOG und pCDH1-Fscn-MOG bevorzugt eingesetzt, da diese die vollständige MOG-Polypeptidkette kodieren. Um eine antigenspezifische Immunantwort mit regulatorischem Charakter einzuleiten, wurden Kotransfektionen dieser MOG-kodierenden Plasmide und einem Plasmid, welches für das immunregulatorische Zytokin TGFβ oder IL-10 kodiert, durchgeführt. Hierfür wurden die Plasmide pCI-CMV-TGFβ und pCI-CMV-IL10 verwendet. In einem protektiven Ansatz der DNA-Vakzinierung wurden C57BL/6-Mäuse mit den in Abbildung 15 angegebenen Plasmidkombinationen drei Mal in einem Zeitintervall von einer Woche biolistisch transfiziert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach weiteren 7 Tagen erfolgte die EAE-Induktion und der Krankheitsverlauf wurde für die nächsten 24 Tage dokumentiert (siehe Abbildung 15).

Hierbei zeigten die beiden Kontrollgruppen mit unbehandelten Mäusen bzw. Mäusen, die mit pCDH1-copGFP + pCI-CMV-GFP (copGFP + CMV-GFP) transfiziert wurden, eine vergleichbare EAE-Pathologie. In beiden Kontrollgruppen konnten Versuchstiere mit ersten EAE-Symptomen mit einer Latenzzeit von 9 bis 10 Tagen nach EAE-Induktion ausgemacht werden. Im Durchschnitt begann die EAE bei der unbehandelten Gruppe an Tag 12,1 und bei der copGFP + CMV-GFP-Gruppe an Tag 12,3. Der Höhepunkt der EAE wurde für beide Gruppen mit einem EAE-Score von ca. 2,7 an Tag 16 bis 17 erreicht. Der maximale EAE-Score, also der Durchschnitt der höchsten EAE-Werte unabhängig vom Zeitpunkt, betrug bei der unbehandelten Gruppe 3,0 bzw. 3,07 bei den copGFP + CMV-GFP-transfizierten Mäusen. Nach einer ca. 4-tägigen Plateau-Phase folgte bei beiden Gruppen eine Remissionsphase mit Linderung der EAE-Symptome. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die biolistische DNA-Immunisierung als Methode an sich keinen generellen Einfluss auf die EAE-Symptomatik ausübt.

Im Vergleich zu diesen beiden Kontrollgruppen konnte durch die DNA-Vakzinierung mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-GFP (Fscn-MOG + CMV-GFP) eine moderate, aber über den Großteil des Beobachtungszeitraums nicht signifikante Reduktion der EAE-Symptome erzielt werden. Der Höhepunkt der EAE wurde an Tag 17 mit einem EAE-Score von ca. 2,2 dokumentiert. Der durchschnittliche maximale EAE-Score von 2,74 war im Vergleich zu den Kontrollgruppen leicht, aber nicht signifikant geringer ausgefallen.

Eine deutliche Verminderung der EAE-Symptome konnte durch die präventive DNA-Vakzinierung mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-IL10 (Fscn-MOG + CMV-IL10) erzielt werden. Erste EAE-Symptome traten erst an Tag 11 nach EAE-Induktion auf, der durchschnittliche EAE-Beginn war mit Tag 13,4 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe zeitlich signifikant verzögert. Der Höhepunkt der EAE wurde mit einem EAE-Score von ca. 1,8 an Tag 16 der EAE dokumentiert. Der maximale EAE-Score betrug im Durchschnitt 2,25.

Der stärkste Inhibitionseffekt mit einer signifikanten Reduktion der EAE-Symptome über den gesamten Krankheitsverlauf konnte bei den Mäusen erzielt werden, die mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-TGF β (Fscn-MOG + CMV-TGF β) kotransfiziert wurden (siehe Abbildung 15 A).



B

| | unbehandelte EAE | copGFP + CMV-GFP | Fscn-MOG + CMV-GFP | Fscn-MOG + CMV-TGFβ | Fscn-MOG + CMV-IL10 |
|--------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| EAE Inzidenz | 86,7 % | 81,8 % | 80 % | 61,5 % | 72,2 % |
| EAE Beginn [Tage nach EAE-Induktion] | 12,1 | 12,3 | 13,2 | 14,1 * ++ | 13,4 + |
| Maximaler EAE Score | 3,00 | 3,07 | 2,74 | 2,00 * | 2,25 |

Abbildung 15: Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden wirkt inhibierend auf den Verlauf einer MOGp³⁵⁻⁵⁵-induzierten EAE

C57BL/6 Mäuse wurden an den Tagen -21, -14 und -7 vor EAE-Induktion jeweils mit äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (4 µg pCDH1-Fscn-MOG) der angegebenen Gruppen immunisiert oder unbehandelt belassen. Die DNA-Immunsierung erfolgte durch biolistische Koapplikation mittels Gene Gun (4 Schuss pro Immunisierungstag) mit einem Druck von 400 bar auf das rasierte Abdomen der Mäuse. Zur EAE-Induktion wurden die Mäuse an Tag 0 mit einer MOGp³⁵⁻⁵⁵/CFA-Emulsion (50 µg MOGp³⁵⁻⁵⁵) subkutan am Schwanzansatz injiziert. Des Weiteren erhielten die Mäuse am gleichen Tag und 48 h später jeweils eine intraperitoneale Injektion von 200 µl Pertussis Toxin (200 ng). **[A]** Der Schweregrad des Krankheitsverlaufs wurde für die nächsten 24 Tage nach einem Punktesystem (EAE Score) ermittelt (0 = keine Symptome; 1 = Verlust des Schwanztonus; 2 = eingeschränkter Gleichgewichtsreflex, Ataxie; 3 = Paralyse der Hinterläufe; 4 = Tetraplegie; 5 = Tod). Die Daten geben den durchschnittlichen EAE Score ± SEM von 15 bis 25 Mäusen aus 3 bis 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Fscn-MOG + CMV-GFP (#), Fscn-MOG + CMV-IL10 (*) und Fscn-MOG + CMV-TGFβ (+) zu der Kontrollgruppe copGFP + CMV-GFP sind angegeben (*,+,# p<0,05; **,++ p<0,01). **[B]** Die Tabelle zeigt die aufgeführten Parameter als Durchschnittswerte der in [A] dargestellten EAE-Krankheitsverläufe. Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP-Gruppe (*) und zu der unbehandelten EAE-Gruppe (+) sind angegeben (*,+ p<0,05; ++ p<0,01; ***,+++ p<0,001).

In dieser Gruppe konnte die längste Latenzzeit mit ersten beobachteten EAE-Symptomen an Tag 12 ausgemacht werden, der durchschnittliche EAE-Beginn war mit Tag 14,1 im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen zeitlich signifikant um 2

Tage verzögert. Der Höhepunkt der EAE wurde mit einem EAE-Score von ca. 1,6 an Tag 16 dokumentiert und der zeitpunktunabhängige, maximale EAE-Score von durchschnittlich 2,0 war gegenüber der copGFP + CMV-GFP-Kontrollgruppe signifikant reduziert (siehe Abbildung 15 B).

Somit ist evident, dass der Krankheitsverlauf einer MOG_{p35-55}-induzierten EAE durch eine präventive biologische DNA-Vakzinierung mit einem Expressionsplasmid, bei dem MOG unter der Kontrolle des Fascin-Promotors exprimiert wird, inhibiert werden kann. Eine Kotransfektion des MOG-kodierenden Plasmids zusammen mit einem Plasmid, welches für das immunregulatorische Molekül IL-10 oder TGF β kodiert, führt bei dieser Methode zu einer signifikanten Reduktion der EAE-Pathologie, einer erniedrigten Inzidenz und einer längeren Latenzzeit bis zur Ausprägung der ersten Symptome.

3.1.4 Die präventive Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt in der EAE eine Reduktion ZNS-infiltrierender Zellen und axonaler Demyelinisierung.

Auf Grund der erzielten Inhibierung der EAE-Symptome durch die DNA-Vakzinierung war es von großem Interesse, die Wirkmechanismen dieser Behandlungsmethode und ihren Einfluss auf diverse Charakteristika der EAE, wie z.B. die Infiltration von Zellen des Immunsystems in das ZNS und die neuronale Demyelinisierung der Axone zu untersuchen. Hierfür wurden weitere präventive DNA-Vakzinierungen auf die oben beschriebene Weise durchgeführt. Als alternatives antigenkodierendes Expressionsplasmid wurde neben dem pCDH1-Fscn-MOG auch der pCDH1-CMV-MOG verwendet. In den Mäusen wurde eine EAE induziert. An Tag 16, dem phänotypischen Höhepunkt der EAE, wurden den Versuchstieren relevante Organe für ex vivo Untersuchungen entnommen. Das Rückenmark und das Gehirn wurden präpariert und die Qualität und Quantität der ZNS-infiltrierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Parallel wurden Rückenmarksschnitte konserviert und im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Marco Prinz (Neuropathologie, Neurozentrum, Universitätsklinikum Freiburg) durch Dr. Thomas Blank histologisch bezüglich Zellinfiltration und Grad der axonalen Demyelinisierung ausgewertet. Des

Weiteren wurden Milz- und Lymphknotenzellen präpariert und für nachfolgende ex vivo Experimente verwendet.

In Abbildung 16 sind die Krankheitsverläufe bis zum Tag 16 der EAE dargestellt. Die bereits oben aufgeführten Effekte der präventiven DNA-Vakzinierung mit pCDH1-Fscn-MOG auf den Krankheitsverlauf der EAE (Abbildung 15) konnten durch diese Experimente mit einer größeren Probenanzahl verifiziert werden. Die Kotransfektion mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-GFP führte zu einer moderaten Reduktion der EAE-Symptome. Eine signifikante Linderung der EAE-Pathologie über den gesamten Krankheitsverlauf konnte durch Kotransfektion mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-IL10 sowie pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-TGF β erreicht werden (Abbildung 16 A). Der durchschnittliche Beginn der EAE setzte bei diesen Ansätzen an Tag 13,7 bzw. an Tag 13,4 nach EAE-Induktion ein, die Latenzzeit war somit signifikant länger als bei der copGFP + CMV-GFP-Kontrollgruppe. Mäuse, die mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-IL10 kotransfiziert wurden, erreichten außerdem einen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduzierten maximalen EAE-Score von durchschnittlich 2,08. Durch die Kotransfektion mit pCDH1-Fscn-MOG + pCI-CMV-TGF β wurde die größte Inhibition mit einem signifikant reduzierten maximalen EAE-Score von 1,5 erreicht. Außerdem führte dieser Ansatz mit nur 57% erkrankten Versuchstieren gegenüber 85% bei der copGFP + CMV-GFP-Kontrollgruppe zu der geringsten Inzidenz aller getesteten Gruppen.

In weiteren Ansätzen wurden präventive DNA-Vakzinierungen in einer Dreifach-Kombination mit pCDH1-Fscn-MOG, pCI-CMV-IL10 + pCI-CMV-TGF β zusammen durchgeführt. Durch diese Ansätze konnte jedoch keine zusätzliche Reduktion der EAE-Symptome erzielt werden. Somit kann ein synergistischer Effekt durch die beiden regulatorischen Moleküle IL-10 und TGF β in diesem präventiven DNA-Immunisierungsmodell ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Kotransfektionen mit pCDH1-Fscn-MOG wurde bei Verwendung des Plasmids, bei dem die MOG-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, ein differenziertes Ergebnis erzielt (siehe Abbildung 16 B). Die EAE-Krankheitsverläufe von Mäusen, die mit pCDH1-CMV-MOG + pCI-CMV-GFP kotransfiziert wurden, zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe copGFP + CMV-GFP. Der maximale EAE-Score war bei diesem Ansatz mit durchschnittlich 2,38 nicht signifikant geringer. Interessanterweise konnte durch die DNA-Vakzinierung mit pCDH1-CMV-MOG +

pCI-CMV-IL10 im Gegensatz zu der Fscn-MOG + CMV-IL10-Gruppe (siehe Abbildung 16 A) keine signifikante Reduktion der EAE-Pathologie erzielt werden. Bei diesen Mäusen begann die EAE durchschnittlich 11,6 Tage nach EAE-Induktion. Der maximale EAE-Score von 3,08 befand sich auf dem Niveau der Kontrollgruppen. Allein die Kotransfektion mit pCDH1-CMV-MOG + pCI-CMV-TGF β erbrachte bei diesen Gruppen eine signifikante Minderung der EAE-Symptome über den gesamten Krankheitsverlauf bis Tag 16 nach EAE-Induktion (siehe Abbildung 16 B). Der durchschnittliche Beginn der EAE war mit 13,6 Tagen nach Induktion zeitlich signifikant verzögert. Der durchschnittlich maximal erreichte EAE Score betrug bei diesem Ansatz 1,7 und war somit im Vergleich zu der Kontrollgruppe copGFP + CMV-GFP signifikant reduziert (siehe Abbildung 16 D).

Um einen antigenunspezifischen Effekt der beiden inhibitorischen Moleküle IL-10 und TGF β zu eruieren, wurden Kotransfektionen mit dem Kontrollplasmid pCDH1-copGFP in Kombination mit pCI-CMV-TGF β bzw. pCI-CMV-IL10 durchgeführt und mit Leervektor transfizierten und unbehandelten Mäusen verglichen (siehe Abbildung 16 C). Bei diesen Ansätzen konnten keine Unterschiede zwischen den EAE-Krankheitsverläufen von Mäusen, die unbehandelt belassen oder mit den Kontrollplasmiden pCDH1-copGFP + pCI-CMV-GFP kotransfiziert wurden, ausgemacht werden. Bei beiden Kontrollgruppen wurde eine vergleichbare EAE-Inzidenz von 89 % für die unbehandelte Gruppe bzw. 85 % für die copGFP + CMV-GFP-Gruppe ermittelt. Bei beiden Gruppen traten EAE-Symptome an Tag 12 und es wurde ein durchschnittlicher maximaler EAE-Score von 3,0 erreicht (siehe Abbildung 16 D). Sowohl die Kotransfektion mit pCDH1-copGFP + pCI-CMV-TGF β als auch mit pCDH1-copGFP + pCI-CMV-IL10 ergaben einen vergleichbaren EAE-Krankheitsverlauf ohne signifikante Unterschiede zu den beiden Kontrollgruppen. Die EAE-Inzidenz lag bei der copGFP + CMV-TGF β -Gruppe bei 87 % und bei der copGFP + CMV-IL10-Gruppe bei 92 %. Im Schnitt startete die EAE 12,4 bzw. 12,5 Tage nach Induktion und es wurde ein maximaler EAE-Score von 3,5 für die copGFP + CMV-TGF β -Gruppe bzw. 3,4 für die copGFP + CMV-IL10-Gruppe ermittelt. Die alleinige Transfektion mit TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden führt also nicht zu einer Reduktion der EAE-Symptomatik. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Inhibierung der EAE-Pathologie durch die präventive biologische Kotransfektion mit MOG-kodierenden Plasmiden und Plasmiden, die für IL-10 oder TGF β kodieren

(siehe Abbildung 15 und Abbildung 16), in einem antigenspezifischen Kontext erfolgen.

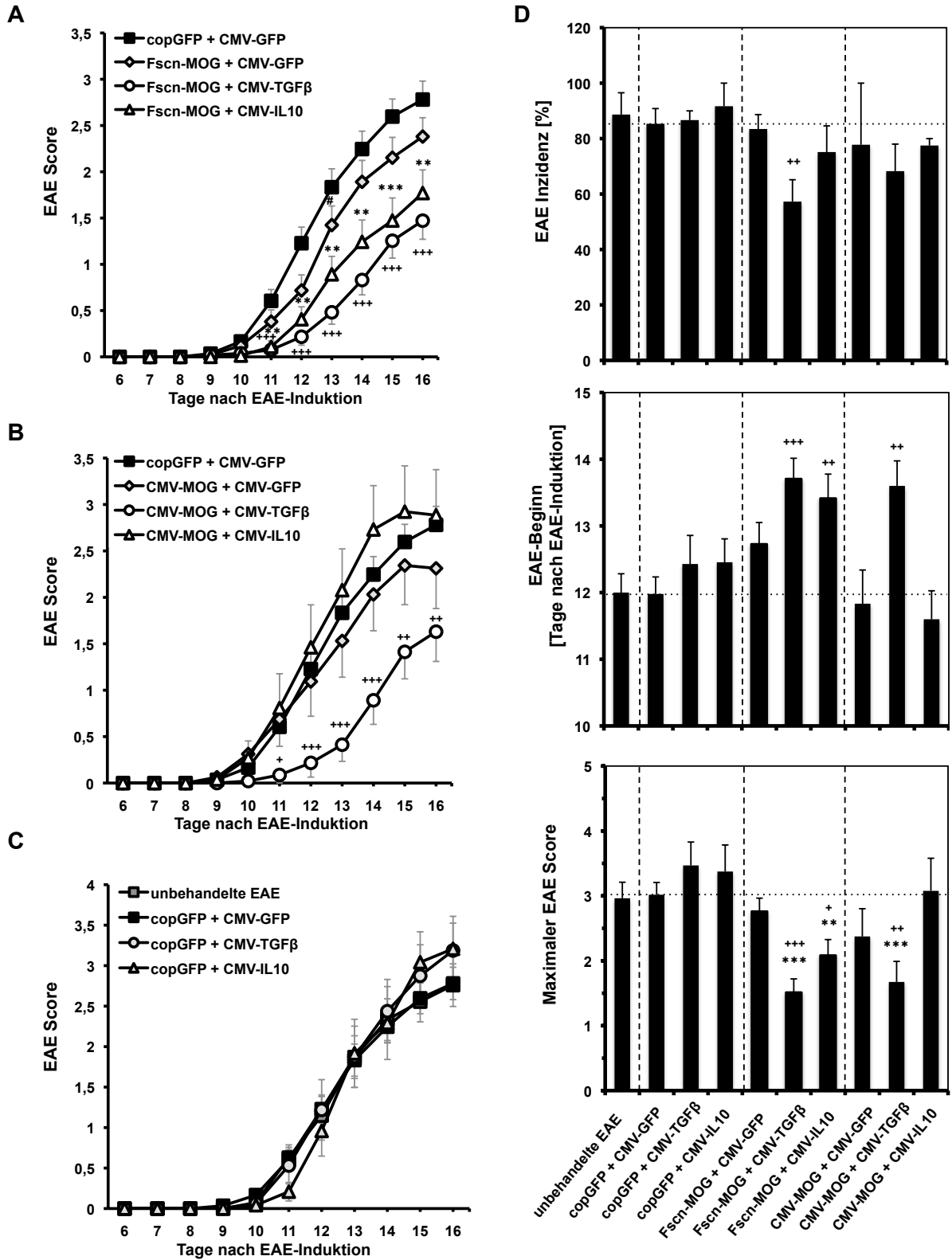


Abbildung 16: Die EAE-Inhibition mittels präventiver biolistischer DNA-Vakzinierung mit MOG- + TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden erfolgt antigenspezifisch.

C57BL/6 Mäuse wurden an den Tagen -21, -14 und -7 vor EAE-Induktion mit äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (4 μ g pCDH1-Fscn-MOG) der angegebenen Gruppen immunisiert oder unbehandelt belassen. Die DNA-Immunsierung erfolgte durch biolistische Koapplikation mittels Gene Gun (4 Schuss pro Immunisierungstag) mit einem Druck von 400 bar auf das rasierte Abdomen der Mäuse. An Tag 0 erhielten die Mäuse eine subkutane Injektion einer MOGp³⁵⁻⁵⁵/CFA-Emulsion (50 μ g MOGp³⁵⁻⁵⁵), sowie am gleichen Tag und 48 h später jeweils eine intraperitoneale Injektion von 200 μ l Pertussis Toxin (200 ng). **[A-C]** Der Schweregrad des Krankheitsverlaufs wurde für die nächsten 16 Tage nach einem Punktesystem (EAE-Score) ermittelt (0 = keine Symptome; 1 = Verlust des Schwanztonus; 2 = eingeschränkter Gleichgewichtsreflex, Ataxie; 3 = Paralyse der Hinterläufe; 4 = Tetraplegie; 5 = Tod). Die Daten geben den durchschnittlichen EAE Score \pm SEM von 12 bis 57 Mäusen aus 2 bis 9 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten an. Versuchstiere aus Abbildung 15 sind in diesen Daten inkorporiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen [A] Fscn-MOG + CMV-GFP (#), Fscn-MOG + CMV-IL10 (*) und Fscn-MOG + CMV-TGF β bzw. [B] CMV-MOG + CMV-TGF β (+) zu der Kontrollgruppe copGFP + CMV-GFP sind angegeben (+, # p<0,05; **, ++ p<0,01; ***, +++ p<0,001). **[D]** Die Grafiken zeigen die aufgeführten Parameter als Durchschnittswerte \pm SEM der in [A-C] dargestellten EAE-Krankheitsverläufe. Versuchstiere aus Abbildung 15 sind in diesen Daten inkorporiert. Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP-Gruppe (*) und zu der unbehandelten EAE-Gruppe (+) sind angegeben (+ p<0,05; **, ++ p<0,01; ***, +++ p<0,001).

Das ZNS von Mäusen, die auf die oben beschriebene Weise biolistisch transfiziert worden sind, wurde 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert und für histologische Untersuchungen asserviert. Hierzu wurde ein kraniales Stück Rückenmark isoliert und in PBS / 4% PFA konserviert. Von diesen Präparaten wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Marco Prinz (Neuropathologie, Neurozentrum, Universitätsklinikum Freiburg) Rückenmarksschnitte angefertigt und hinsichtlich Zellinfiltration und Grad der axonalen Demyelinisierung analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen und der Grad der Demyelinisierung in Mäusen, bei denen durch die präventive DNA-Immunsierung eine inhibierte EAE-Pathologie festgestellt wurde, signifikant reduziert sind. So konnte in Mäusen, die mit Fscn-MOG + CMV-GFP transfiziert wurden, im Vergleich zu der copGFP + CMV-GFP Kontrollgruppe eine um ca. 53% verringerte Anzahl infiltrierter CD3⁺ T-Zellen identifiziert werden (siehe Abbildung 17 A). Diese Inhibition der T-Zellinfiltration wurde durch die DNA-Vakzinierungen mit Fscn-MOG + CMV-TGF β , Fscn-MOG + CMV-IL10 oder CMV-MOG + CMV-TGF β auf 75% bis 84% verstärkt. Des Weiteren wurden im Vergleich zu der copGFP + CMV-GFP-Kontrollgruppe mit einer Reduktion von 56% bis 73% signifikant weniger MAC-3⁺ Zellen im Rückenmark von Mäusen dieser drei Gruppen gefunden (siehe Abbildung 17 B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass neben der T-Zellinfiltration auch die Infiltration von Makrophagen in das ZNS dieser Mäuse inhibiert ist. Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellinfiltration von B220⁺ Zellen

ausgemacht werden. Durch LFB (*luxol fast blue*)-Färbungen der Rückenmarksschnitte konnte ein reduzierter Grad an axonaler Demyelinisierung bei Mäusen, die mit Fscn-MOG + CMV-TGF β , Fscn-MOG + CMV-IL10 sowie CMV-MOG + CMV-TGF β vakziniert wurden, festgestellt werden (siehe Abbildung 17 D). Dieses Resultat steht im Einklang mit der inhibierten EAE-Pathologie und der reduzierten Infiltration von Immunzellen in das ZNS dieser Mäuse.

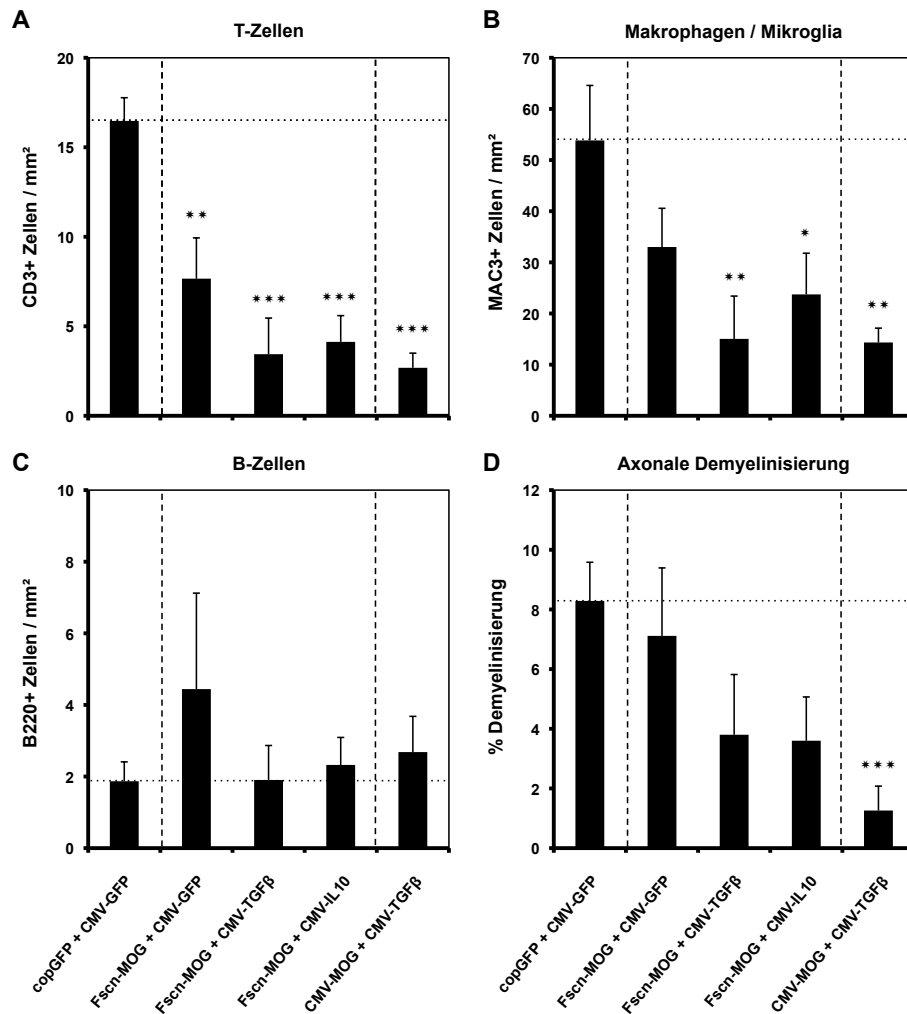


Abbildung 17: Histologische Analysen des ZNS von EAE-Mäusen zeigen reduzierte Zellinfiltration und Demyelinisierung nach Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden.

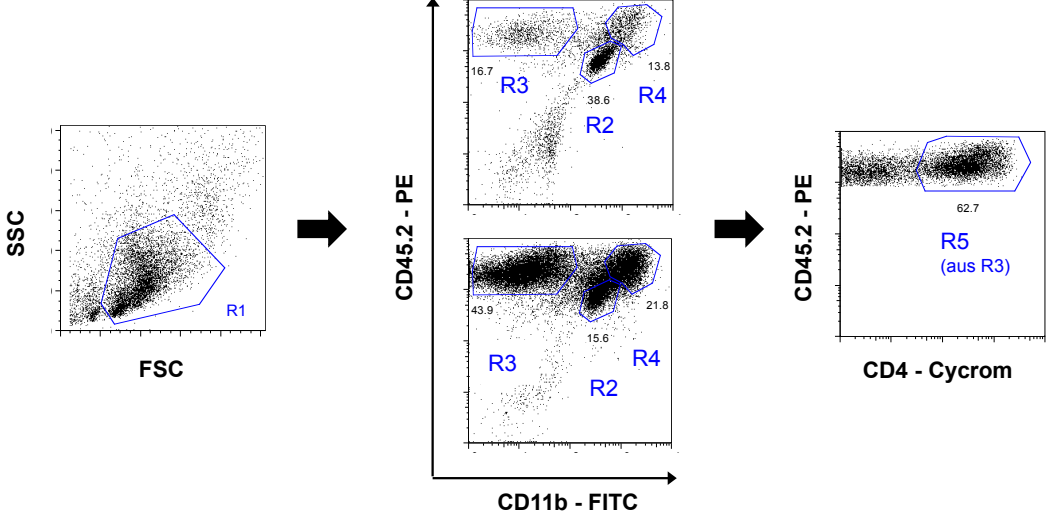
C57BL/6 Mäuse wurden an den Tagen -21, -14 und -7 vor EAE-Induktion mit äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (4 μ g pCDH1-Fscn-MOG) der angegebenen Gruppen immunisiert. Die DNA-Immunsierung erfolgte durch biolistische Koapplikation mittels Gene Gun (4 Schuss pro Immunsierungstag) mit einem Druck von 400 bar auf das rasierte Abdomen der Mäuse. An Tag 0 erhielten die Mäuse eine subkutane Injektion einer MOG³⁵⁻⁵⁵/CFA-Emulsion (50 μ g MOG³⁵⁻⁵⁵), sowie am gleichen Tag und 48 h später jeweils eine intraperitoneale Injektion von 200 μ l Pertussis Toxin (200 ng). An Tag 16 nach EAE-Induktion wurde das kraniale Ende des Rückenmarks der Mäuse präpariert und für histologische Analysen asserviert. Rückenmarksschnitte wurden [A] für T-Zellen gegen CD3, [B] für Makrophagen gegen MAC-3, [C] für B-Zellen gegen B220 und [D] zur Bestimmung des Demyelinisierungsgrades mit *luxol fast blue* (LFB) angefärbt. Die Daten geben Durchschnittswerte \pm SEM von 5 bis 7 Mäusen aus 2 Experimenten an. Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP-Gruppe (*) sind angegeben (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Neben den histologischen Untersuchungen wurden außerdem durchflusszytometrische Untersuchungen zur Quantifizierung und qualitativen Analyse der Zellinfiltrate in das ZNS der vakzinierten Mäuse an Tag 16 nach EAE-Induktion durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten nach einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Ari Waisman etablierten Protokoll¹⁷⁰. Hierfür wurden jeweils das Rückenmark und das Gehirn der Mäuse präpariert und die Mikroglia und Zellinfiltrate mittels Percoll®-Gradient-Dichtezentrifugation angereichert. 20% der erhaltenen Zellen wurden antikörpervermittelt gegen die Oberflächenmarker CD4, CD11b und CD45.2 angefärbt. Dies ermöglichte die Quantifizierung der Zellinfiltration von Makrophagen und T-Zellen in das ZNS (siehe Abbildung 18). Weitere 40% der aus dem ZNS gewonnenen Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert und mit Brefeldin A inkubiert, um die intrazellulären Zytokine IFN γ und IL-17 anzufärben (siehe Abbildung 19). Ein dritter Teil der aus dem ZNS gewonnenen Zellen (40%) wurde zum Nachweis des Transkriptionsfaktors Foxp3 verwendet. Auf diese Weise konnte eine qualitative Analyse der ZNS-infiltrierenden T-Zellen durchgeführt werden. In Abbildung 18 A ist die *Gating*-Strategie zur Quantifizierung der Zellinfiltrate beispielhaft dargestellt. Im FSC/SSC-Dotplot wurde zunächst das Gate auf die lebenden Zellen der gemischten Zellpopulationen gesetzt (Gate R1). Bei der Anfärbung mit CD11b- und CD45.2-spezifischen Antikörpern wurde daraufhin eine Zellverteilung erzielt, die eine Unterteilung von drei distinkten Zellpopulationen ermöglichte¹⁷⁰. Für diese Darstellung sind in Abbildung 18 A zwei Dotplot-Diagramme als Beispiele für eine milde EAE (mittig oben) und eine schwere EAE (mittig unten) abgebildet. Bei der CD11b^{int}CD45.2^{int} (^{int} – intermediär exprimierend) Zellpopulation handelt es sich um die ZNS-residente Mikroglia (Gate R2). Des Weiteren konnte eine Gate auf eine CD11b^{-/lo}CD45.2^{hi} (- – negativ; ^{lo} – low / schwach exprimierend; ^{hi} – high / hoch exprimierend) Zellpopulation gesetzt werden (Gate R3). Bei diesen Zellen handelt es sich um eine gemischte Zellpopulation von Immunzellen des hämatopoetischen Systems, unter anderem um T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen, die während des EAE-Krankheitsverlaufs das ZNS infiltrieren. Wie in Abbildung 18 A zu erkennen ist, nimmt diese Zellpopulation am Tag 16 einer schweren EAE im Vergleich zu einer schwachen EAE einen wesentlich größeren Anteil der Zellen ein. Diese Zellpopulation infiltriert das ZNS somit in Abhängigkeit vom Schweregrad der EAE. Als eine dritte Zellpopulation konnten in dieser Darstellung die CD11b^{hi}CD45.2^{hi} Makrophagen eingegrenzt werden (Gate R4), die

ebenfalls in Abhängigkeit von dem Schweregrad der EAE das ZNS infiltrieren. Zuletzt wurde in der *Gating*-Strategie von der gemischten CD11b^{-/lo}CD45.2^{hi} Zellpopulation ausgehend der Anteil der CD4⁺ Zellen dargestellt, um eine Quantifizierung der ZNS-infiltrierenden T-Zellen zu ermöglichen.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrisch ermittelten Gesamtzellzahlen der diversen ZNS-infiltrierenden Zellpopulationen (siehe Abbildung 18 B) konnten die Resultate der histologischen Untersuchungen bestätigen und verdeutlichen eine verminderte Infiltration von Immunzellen in das ZNS der DNA-immunisierten Mäuse mit inhibierter EAE-Pathologie. Als Negativkontrolle dienten wildtypische C57BL/6-Mäuse (WT), die weder eine präventive Gene Gun-DNA-Immunisierung noch eine EAE-Induktion erhalten haben. Als Positivkontrollen wurden Mäuse eingesetzt, bei denen keine DNA-Immunisierung (unbehandelte EAE-Gruppe) oder eine Leervektor-Transfektion (copGFP + GFP-Gruppe) mit nachfolgender EAE-Induktion durchgeführt wurden. Mittels Durchflusszytometrie konnten die ZNS-residenten CD11b^{int}CD45.2^{int} Mikrogliazellen bei allen Gruppen identifiziert werden. Ihre Quantifizierung ergab keine wesentlichen Gruppenunterschiede. Jedoch konnte im Gegensatz zu der WT-Negativkontrolle bei der unbehandelten EAE-Gruppe sowie bei der copGFP + GFP-Gruppe eine starke Infiltration von CD11b^{-/lo}CD45.2^{hi} Zellen (z.B. T-Zellen, B-Zellen und Dendritische Zellen), CD11b^{hi}CD45.2^{hi} Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen ermittelt werden. Durch die präventive DNA-Immunisierung mit Fscn-MOG + CMV-TGFβ bzw. CMV-MOG + CMV-TGFβ wurde die ZNS-Infiltration der CD11b^{-/lo}CD45.2^{hi} Zellen signifikant um ca. 50% inhibiert. Die Infiltration von CD4⁺ T-Zellen war bei diesen beiden Gruppen sogar um über 55% signifikant reduziert. Eine verminderte Infiltration von CD11b^{-/lo}CD45.2^{hi} Zellen und CD4⁺ T-Zellen wurde auch durch die präventive DNA-Immunisierung mit Fscn-MOG + CMV-IL-10 erzielt, während die Inhibition der Zellinfiltration in der Fscn-MOG + CMV-GFP-Gruppe moderat ausgefallen war. Desweiteren wurde eine reduzierte Anzahl von CD11b^{hi}CD45.2^{hi} Makrophagen im ZNS von den Mäusen festgestellt, die präventiv mit Fscn-MOG + CMV-GFP, Fscn-MOG + CMV-TGFβ, Fscn-MOG + CMV-IL-10 oder CMV-MOG + CMV-TGFβ immunisiert wurden.

A



B

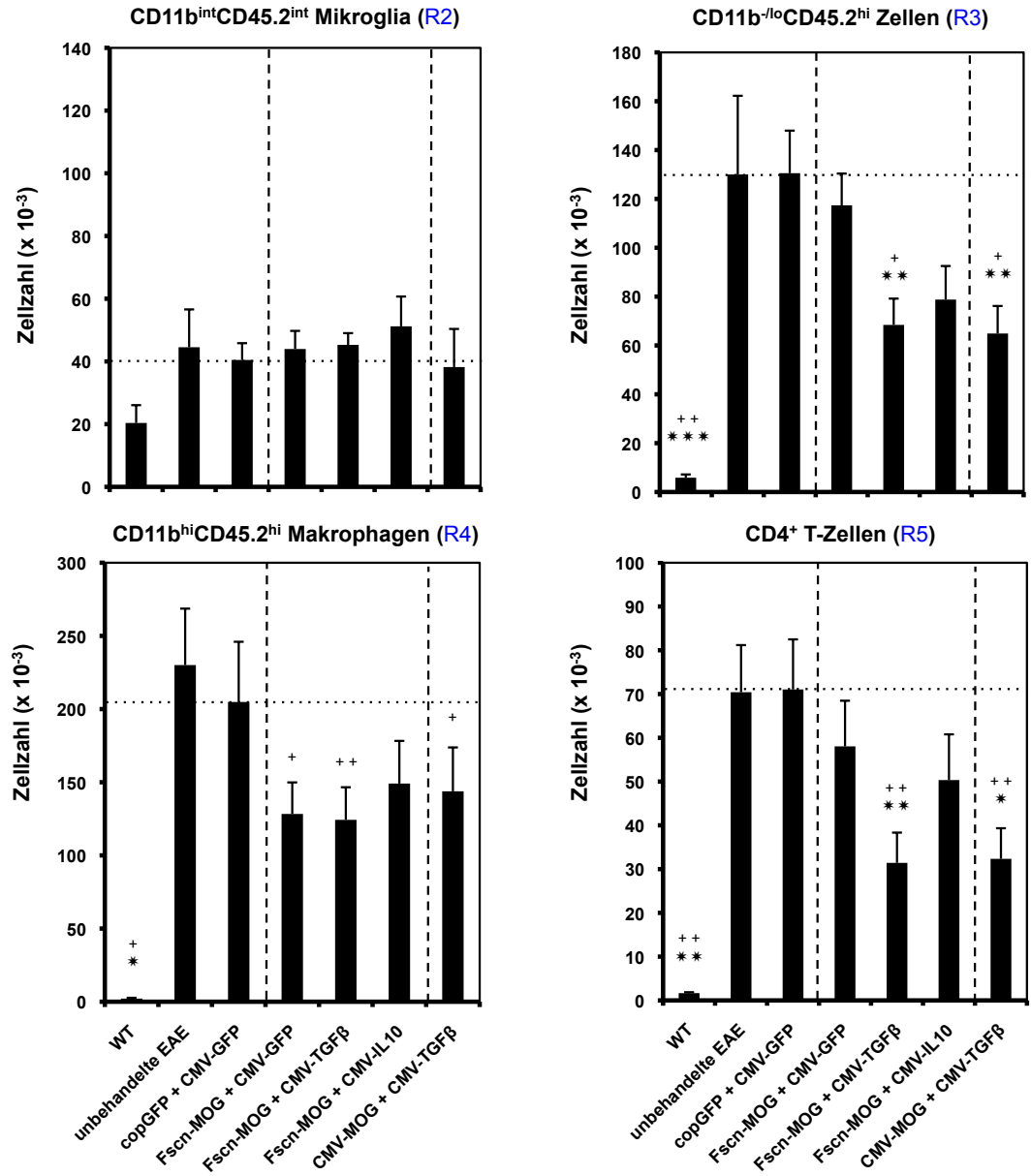


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analysen des ZNS von EAE-Mäusen zeigen eine Reduktion infiltrierender Immunzellen nach Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden.

C57BL/6 Mäuse wurden an den Tagen -21, -14 und -7 vor EAE-Induktion mit äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (4 μ g pCDH1-Fscn-MOG) der angegebenen Gruppen immunisiert oder unbehandelt belassen. Die DNA-Immunsierung erfolgte durch biolistische Koapplikation mittels Gene Gun (4 Schuss pro Immunisierungstag) mit einem Druck von 400 bar auf das rasierte Abdomen der Mäuse. An Tag 0 erhielten die Mäuse eine subkutane Injektion einer MOGp³⁵⁻⁵⁵/CFA-Emulsion (50 μ g MOGp³⁵⁻⁵⁵), sowie am gleichen Tag und 48 h später jeweils eine intraperitoneale Injektion von 200 μ l Pertussis Toxin (200 ng). Als Negativkontrolle diente eine Gruppe mit gänzlich unbehandelten Mäusen (WT; Wildtyp). Das Rückenmark und Gehirn der Mäuse wurde 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert und enthaltene Zellen mittels Percoll®-Gradient-Dichtezentrifugation angereichert. Die erhaltenen Zellen wurden für die Gesamtzellzahlbestimmung der ZNS-residenten Mikroglia sowie ZNS-infiltrierender Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11b, CD45.2 und CD4 gefärbt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. **[A]** Die *Gating*-Strategie zur Ermittlung ZNS-infiltrierender Zellen ist beispielhaft abgebildet. Zur Darstellung von CD11b gegen CD45.2 sind zwei Dotplot-Diagramme als Beispiele für einen milden EAE-Verlauf (mittig oben) und einen starken EAE-Verlauf (mittig unten) aufgeführt. **[B]** Die Daten geben die Gesamtzellzahl der ZNS-residenten CD11b^{int}CD45.2^{int} Mikroglia-Zellen sowie der ZNS-infiltrierenden CD11b^{lo}CD45.2^{hi} Zellen, CD11b^{hi}CD45.2^{hi} Makrophagen und der CD4⁺ T-Zellen als Durchschnittswerte \pm SEM von 5 bis 21 Mäusen aus 2 bis 4 unabhängig durchgeführten Experimenten an (die WT- und unbehandelte EAE-Kontrollgruppe wurden ein Mal mit 6 bzw. 5 Mäusen mitgeführt). Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP-Gruppe (*) und zu der unbehandelten EAE-Gruppe (+) sind angegeben (*, + p<0,05; **, ++ p<0,01; ***, +++ p<0,001).
Abkürzungen: ^{hi} – high (hoch); ^{int} – intermediär; ^{lo} – low (niedrig); ZNS – Zentrales Nervensystem

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass eine präventive biolistische DNA-Immunsierung mit Fscn- oder CMV-MOG in Kombination mit einem TGF β -kodierenden Plasmid in einem antigenspezifischen Kontext zu einem abgeschwächten EAE-Krankheitsverlauf *in vivo* führt und dies im Zusammenhang mit einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in das ZNS und einer reduzierten axonalen Demyelinisierung steht. Durch die DNA-Immunsierung mit Fscn-MOG + IL-10-kodierendem Plasmid konnte eine moderate Inhibition der EAE und eine nicht-signifikante Reduktion der ZNS-Zellinfiltration erzielt werden. Beachtlicherweise bewirkte die präventive biolistische DNA-Immunsierung mit CMV-MOG + IL-10-kodierendem Plasmid hingegen keine Inhibition der EAE-Symptomatik.

3.1.5 Die biolistische DNA-Kovakzinierung mit MOG- plus TGF β - oder IL10-kodierenden Plasmiden führt zu einer Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort.

Die EAE wurde zunächst als eine IL-12-abhängige Th1-Immunreaktion beschrieben^{70,171,172}. Doch spätere Publikationen von Daniel J. Cua und anderen Wissenschaftlern konnten belegen, dass nicht IL-12, sondern IL-23 und Th17 maßgeblich an der EAE-Pathologie beteiligt sind^{92,93}. Obwohl die jeweilige Bedeutung von Th1 und Th17 in der EAE-Entwicklung noch immer kontrovers diskutiert wird, besitzen beide Effektorzelltypen das Potenzial, Inflammation und Demyelinisierung im ZNS zu induzieren¹⁷³. In den ZNS-Infiltraten von Mäusen mit EAE konnten neben Th1 und Th17 außerdem IFN γ /IL17 doppelpositive Th-Zellen identifiziert werden¹⁷⁴. Es war somit von großem Interesse, im Kontext des in dieser Arbeit angewandten präventiven biolistischen DNA-Immunisierungsmodells die Beteiligung von IL-17 produzierenden Th17, IFN γ produzierenden Th1 und IFN γ /IL17 doppelpositiven Th am EAE-Krankheitsverlauf zu untersuchen. Um eine intrazelluläre Zytokinanreicherung zu ermöglichen, wurden die aufbereiteten ZNS-Zellinfiltrate aus Versuchstieren mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und die intrazellulären Zytokine IL-17 und IFN γ gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei konnte in der copGFP + GFP-Kontrollgruppe ein prozentualer Anteil von 14,5% IL-17 produzierender Zellen an den ZNS-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden. Dieser prozentuale Anteil wurde durch die präventive DNA-Immunisierung mit Fscn-MOG + TGF β auf 9%, mit Fscn-MOG + IL-10 auf 8,3% sowie mit CMV-MOG + TGF β auf 7,8% signifikant um mehr als ein Drittel im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 19 B links). Des Weiteren war der prozentuale Anteil der IFN γ produzierenden Th1 an CD4⁺ T-Zellen im ZNS der Mäuse, die mit MOG-kodierendem Plasmid kotransfiziert wurden, reduziert. Während bei der copGFP + GFP-Kontrollgruppe 15,8% und bei der unbehandelten Kontrollgruppe 17,4% Th1 identifiziert wurden, war dieser prozentuale Anteil bei Fscn-MOG + GFP mit 12,6%, bei Fscn-MOG + TGF β mit 13,1% und bei CMV-MOG + TGF β mit 11,6% geringfügig, aber nicht signifikant vermindert. Bei der Fscn-MOG + IL10-Gruppe wurde mit 8,9% Th1 eine signifikante Reduktion um 43% gegenüber der copGFP + CMV-Kontrollgruppe bzw. 49% gegenüber der unbehandelten

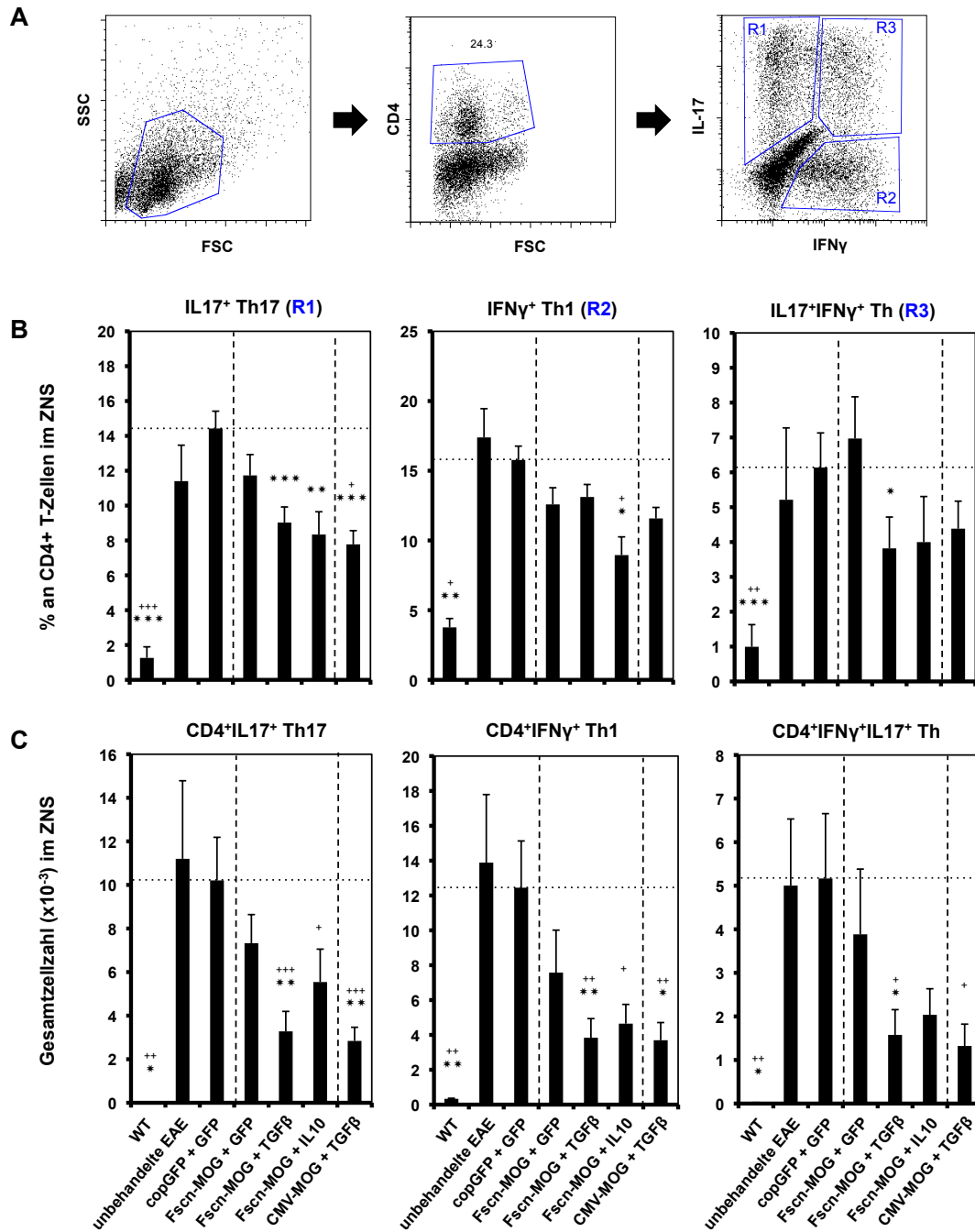


Abbildung 19: Die präventive Koapplikation von MOG- und TGFβ- oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt eine Reduktion ZNS-infiltrierender Th1 und Th17 nach EAE-Induktion.

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOG³⁵⁻⁵⁵/CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Das Rückenmark und Gehirn der Mäuse wurde 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert und enthaltene Zellen mittels Percoll[®]-Gradient-Dichtezentrifugation angereichert. Die isolierten Zellen wurden in Gegenwart von PMA (100 ng/ml), Ionomycin (200 ng/ml) und Brefeldin A (1 µg/ml) für 4 h bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert und für durchflusszytometrische Analysen mit Antikörpern gegen CD4, IL-17 und IFNγ gefärbt. **[A]** Die *Gating*-Strategie zur Quantifizierung der ZNS-infiltrierenden CD4⁺IL17⁺ (R1), CD4⁺IFNγ⁺ (R2) und CD4⁺IL17⁺IFNγ⁺ (R3) T-Zellen ist beispielhaft dargestellt. **[B]** Die Daten geben den prozentualen Anteil der Zellpopulationen an den ZNS-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen bzw. **[C]** ihre ermittelte Gesamtzellzahl im ZNS als Durchschnittswerte ± SEM von 5 bis 16 Mäusen aus 2 bis 4 unabhängig durchgeführten Experimenten an (die WT- und unbehandelte EAE-Kontrollgruppe wurde ein Mal mit 6 bzw. 5 Mäusen mitgeführt). Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP- (*) und der unbehandelten EAE-Kontrollgruppe (+) sind angegeben (*, + p<0,05; **, ++ p<0,01; ***, +++ p<0,001).

EAE-Kontrollgruppe ausgemacht (siehe Abbildung 19 Mitte). Der Anteil IFN γ /IL17 doppelpositiver Th-Zellen an infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen war im ZNS der Mäuse reduziert, die mit MOG-kodierendem Plasmid in Kombination mit TGF β - oder IL-10-kodierendem Plasmid transfiziert wurden. Der größte Effekt mit einer signifikanten Reduktion dieser T-Effektorzellen konnte in der Fscn-MOG + TGF β -Gruppe mit 3,8% im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe mit 6,1% ermittelt werden (siehe Abbildung 19 rechts).

Die Quantifizierung der Gesamtzahlen ergab eine beträchtliche Reduktion der in das ZNS infiltrierenden Th1- und Th17-Effektorzellen durch die präventive biologische DNA-Immunisierung mit MOG-kodierendem Plasmid in Kombination mit den zytokinkodierenden Plasmiden (Abbildung 19 C). Der stärkste Effekt konnte bei den Mäusen ausgemacht werden, die mit Fscn-MOG + TGF β oder CMV-MOG + TGF β immunisiert worden waren. Im ZNS von Mäusen dieser beiden Gruppen konnten im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe 70% weniger IFN γ ⁺ Th1, 68% bzw. 72% weniger IL17⁺ Th17 und 69% bzw. 74% weniger IFN γ ⁺IL17⁺ Th-Zellen ermittelt werden. Mäuse, die präventiv mit Fscn-MOG + IL-10 kotransfiziert worden waren, zeigten ebenfalls eine signifikante, wenn auch etwas schwächere Reduktion ZNS-infiltrierender Effektorzellen. In dem ZNS dieser Mäuse konnte an Tag 16 post EAE-Induktion ca. 45% weniger IFN γ ⁺ Th1 und ca. 60% weniger IL17⁺ Th17 identifiziert werden als bei Mäusen, die mit Leervektor vorbehandelt wurden. Nach präventiver DNA-Immunisierung mit Fscn-MOG + GFP wurde dagegen eine moderate Reduktion der ZNS-Zellinfiltration mit ca. 30% weniger Th17, 40% weniger Th1 und 25% weniger IFN γ ⁺IL17⁺ Th im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe festgestellt.

Die EAE wurde ursprünglich als eine fast exklusiv CD4⁺ T-Effektorzell-bedingte Immunreaktion angesehen. Doch zahlreiche Publikationen konnten sowohl eine pathogene^{55,175,53}, als auch eine regulatorische^{176,47,48} Bedeutung von CD8⁺ T-Zellen in der EAE aufzeigen. So konnten York et al. in ihren Arbeiten für CD8⁺IFN γ ⁺ T-Zellen einen zytotoxischen Supressormechanismus aufzeigen, da diese Zellen in der Lage waren, MOG-beladene CD4⁺ T-Zellen antigenspezifisch in den lymphoiden Organen abzutöten⁵⁶. Deswegen wurden in weiteren Untersuchungen die Anteile der oben aufgeführten CD4⁺ T-Effektorzelltypen und der CD8⁺IFN γ ⁺ T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen analysiert. Hierzu wurden die Milzen und inguinalen Lymphknoten von Versuchstieren am Höhepunkt des EAE-Krankheitsverlaufs (16

Tage post EAE-Induktion) präpariert. Die isolierten Lymphknotenzellen wurde nach Behandlung mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A durch Antikörperfärbung gegen CD4, CD8, IL17 und IFN γ mittels Durchflusszytometrie analysiert.

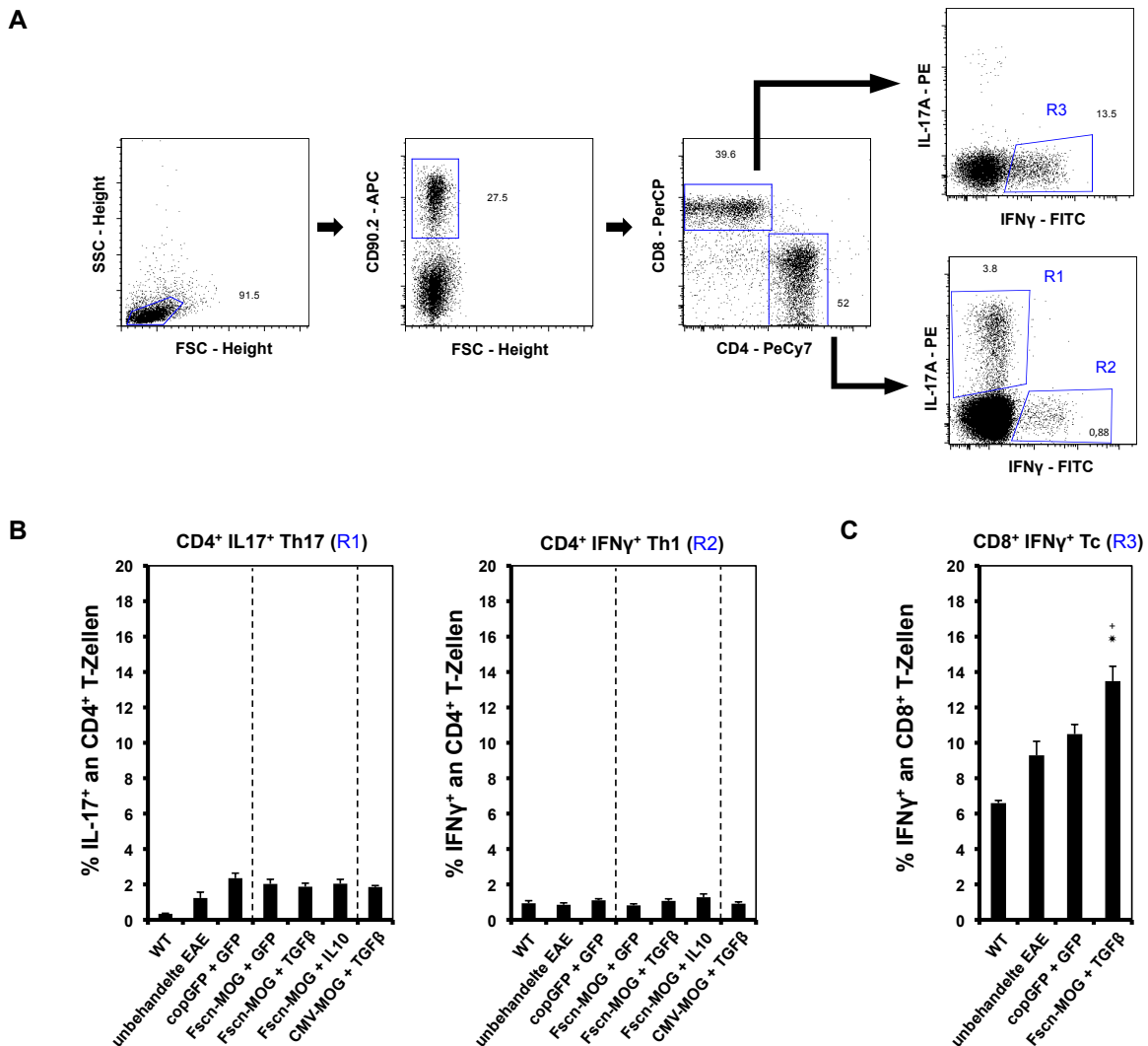


Abbildung 20: MOG- und TGF β -Plasmid-DNA-immunisierte Mäuse besitzen höhere Anteile CD8⁺IFN γ ⁺ T-Zellen nach EAE-Induktion

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOG³⁵⁻⁵⁵/CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Die inguinalen Lymphknoten der Mäuse wurden 16 Tage nach EAE-Induktion wie bereits beschrieben präpariert. Die gewonnenen Zellen wurden in Gegenwart von PMA (100 ng/ml), Ionomycin (200 ng/ml) und Brefeldin A (1 μ g/ml) für 4 h bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert und für durchflusszytometrische Analysen mit Antikörpern gegen CD4, CD8, IFN γ und IL-17 gefärbt. **[A]** Die *Gating*-Strategie zur Ermittlung der unterschiedlichen T-Effektorzelltypen ist beispielhaft dargestellt. **[B]** Die Daten zeigen den prozentualen Anteil der IL17⁺ Th17 (R1) und der IFN γ ⁺ Th1 (R2) an CD4⁺ T-Zellen und **[C]** der IFN γ ⁺ Tc1 (R3) an CD8⁺ T-Zellen als Durchschnittswerte \pm SEM von 5 bis 10 Mäusen aus 2 unabhängig durchgeführten Experimenten (die WT- und unbehandelte EAE-Kontrollgruppe wurde ein Mal mit 6 bzw. 5 Mäusen mitgeführt). Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP- (*) und der unbehandelten EAE-Kontrollgruppe (+) sind angegeben (*, + p<0,05).

Hierbei konnten im Gegensatz zu der Situation im ZNS keine signifikanten prozentualen Unterschiede an $CD4^+IFN\gamma^+$ Th1 und $CD4^+IL17^+$ Th17 zwischen den beiden Kontrollgruppen mit Mäusen, die unbehandelt oder mit copGFP + GFP transfiziert worden waren und allen anderen Gruppen mit Mäusen, die mit MOG-kodierendem Plasmid plus zytokinkodierendem Plasmid immunisiert worden waren, festgestellt werden (siehe Abbildung 20 B). Der prozentuale Anteil dieser beiden T-Effektorzelltypen an $CD4^+$ T-Zellen war im Lymphknoten mit durchschnittlich 2% $IL17^+$ Th17 und 1% $IFN\gamma^+$ Th1 im Vergleich zum Anteil am Inflammationsort, dem ZNS, mit bis zu 15% bei der Leervektor-Kontrollgruppe (Vgl. siehe Abbildung 19) deutlich geringer ausgefallen. Des Weiteren konnten in diesen lymphoiden Organen keine $IFN\gamma/IL-17$ doppelpositiven Th-Effektorzellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils $IFN\gamma$ -produzierender Zellen an $CD8^+$ T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten von Versuchstieren der unbehandelten EAE- bzw. der copGFP + GFP-Kontrollgruppe und der Fscn-MOG + $TGF\beta$ -Gruppe. In der unbehandelten EAE- und copGFP + GFP-Kontrollgruppe konnte ein Anteil von 9,3% bzw. 10,4% $CD8^+IFN\gamma^+$ Tc1 identifiziert werden. Dieser Anteil war 16 Tage post EAE-Induktion in den inguinalen Lymphknoten von Versuchstieren, die präventiv mit Fscn-MOG + $TGF\beta$ transfiziert worden waren, um ca. ein Drittel auf 13,5% signifikant erhöht (siehe Abbildung 20 C). Dem entsprechend konnte auch in der Milz von Fscn-MOG + $TGF\beta$ -transfizierten Mäusen ein erhöhter Anteil $CD8^+IFN\gamma^+$ Tc1 im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Teil der aus den Versuchsmäusen ex vivo präparierten Milzzellen wurde für weitere Experimente entweder ohne oder in Gegenwart von 25 $\mu\text{g/ml}$ für 96h kultiviert. Der Überstand der Kulturen wurde abgenommen und die Zytokinkonzentrationen von $IFN\gamma$ und IL-17 mittels ELISA analysiert (siehe Abbildung 21). Milzzellen, die aus gänzlich unbehandelten Mäusen (WT-Kontrolle) präpariert worden waren, zeigten durch die Kultivierung in Gegenwart von MOGp35-55 keine gesteigerte Zytokinproduktion im Vergleich zu dem Kulturansatz ohne Peptid. Im Gegensatz dazu zeigten Milzzellen aus EAE-Mäusen, die nicht transfiziert oder mit Leervektor (copGFP + GFP) transfiziert worden waren, eine deutliche antigenspezifisch induzierte $IFN\gamma$ - und IL-17-Zytokinproduktion nach MOGp35-55-Restimulation. Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen war die antigenspezifisch induzierte Zytokinproduktion bei allen Mäusen, die vor der EAE-Induktion präventiv

mit MOG-kodierenden Plasmiden transfiziert worden waren, beträchtlich geringer. Besonders die MOG_{p35-55}-spezifische IFN γ -Produktion war bei diesen Gruppen mit Konzentrationen von 6 bis 7 ng/ml im Vergleich zu 20,5 ng/ml der copGFP + GFP-Kontrollgruppe um ca. 68% reduziert (siehe Abbildung 21 links). Die MOG_{p35-55}-spezifische IL-17-Produktion war besonders in der Fscn-MOG + TGF β und der CMV-MOG + TGF β -Gruppe signifikant geringer ausgefallen. Hier konnte mit einer IL-17-Konzentration von 1 ng/ml für Fscn-MOG + TGF β und 0,79 ng/ml für CMV-MOG + TGF β eine um 52% bzw. 62% verminderte antigenspezifische Zytokinproduktion im Vergleich zu der copGFP + GFP-Kontrollgruppe (2,1 ng/ml) ermittelt werden (siehe Abbildung 21 rechts).

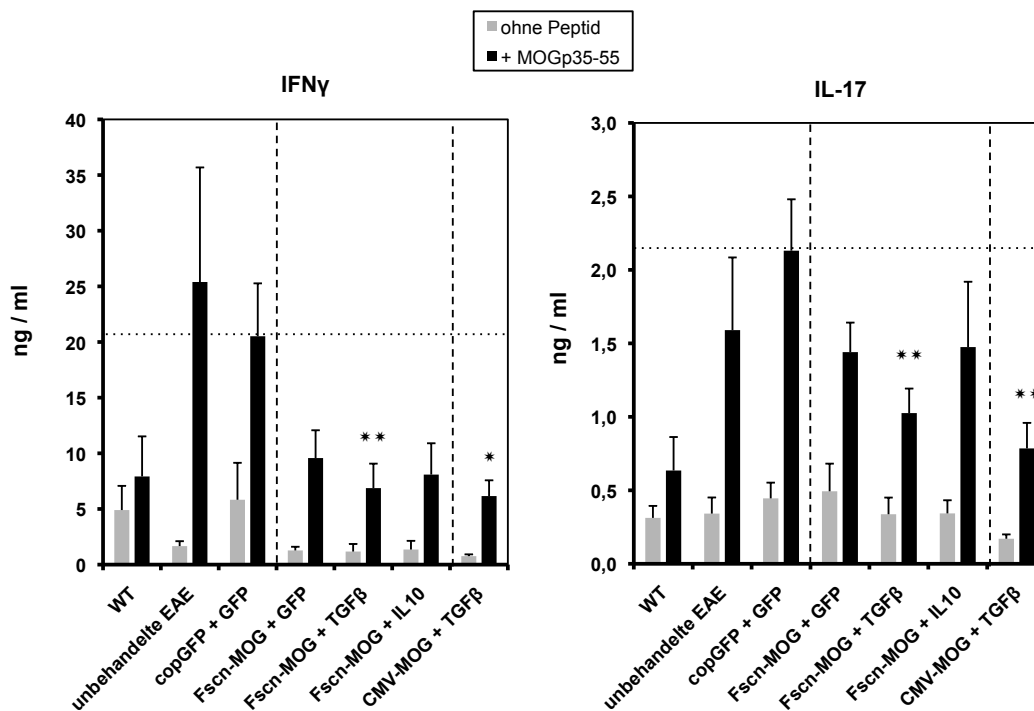


Abbildung 21: Milzzellen aus MOG- und TGF β - oder IL-10-DNA-immunisierten Mäusen weisen eine inhibierte antigenspezifische IFN γ und IL-17-Produktion nach MOG_{p35-55}-Restimulation auf.

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOG_{p35-55}/CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Die Milzen der Mäuse wurden 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert. Die isolierten Milzzellen wurden für 96 h in Kulturmedium sowohl ohne (graue Balken) als auch mit 25 μ g/ml MOG_{p35-55} (schwarze Balken) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Der Kulturüberstand wurde entnommen und die Zytokinkonzentrationen von IFN γ und IL-17 mittels ELISA ermittelt. Die Daten geben die Zytokinkonzentrationen in ng/ml als Durchschnittswerte \pm SEM von jeweils 6 bis 15 Mäusen pro Gruppe aus 2 bis 5 unabhängig durchgeführten Experimenten an. Statistisch signifikante Unterschiede zu der copGFP + GFP-Gruppe (*) sind angegeben (* p<0,05; ** p<0,01).

Die ELISA-Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen und zeigen, dass durch die präventive biolistische DNA-Kovakzinierung mit MOG-kodierendem Plasmid plus TGF β - oder IL-10-kodierendem Plasmid die Generation einer Th1- und Th17-Immunantwort nach antigenspezifischer Restimulation inhibiert wird.

Ein weiterer Teil der an Tag 16 post EAE-Induktion isolierten Milzzellen wurde zur Bestimmung der antigenspezifischen Zellproliferation nach MOGp35-55-Restimulation verwendet. Eine verminderte Zellproliferation könnte in diesem Kontext auf die Aktivität von regulatorischen T-Zellen bzw. eine Anergisierung von T-Effektorzellen hinweisen. Hierzu wurden die Milzzellen für 96 h in Gegenwart von titrierten Mengen MOGp35-55 kultiviert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe von Peptid. Die letzten 16 h der Kultur erfolgten in Gegenwart von ^3H -Thymidin und durch anschließende Messung der Radioaktivität wurde die Zellproliferation ermittelt (siehe Abbildung 22).

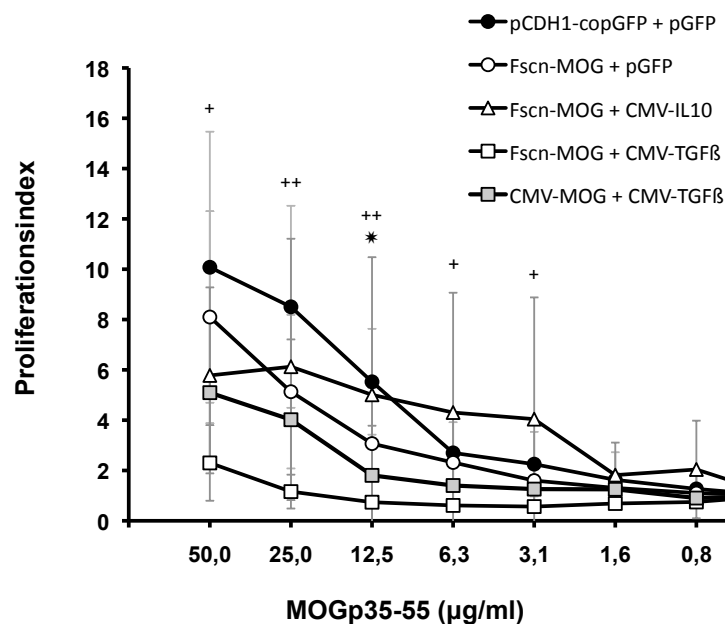


Abbildung 22: Milzzellen aus MOG- und TGF β -DNA-immunisierten Mäusen weisen eine inhibierte antigenspezifische Proliferation nach MOGp $^{35-55}$ -Restimulation auf.

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOGp $^{35-55}$ /CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Die Milzen der Mäuse wurden 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert. In einer 96-Loch-Platte wurden 5×10^5 Milzzellen für 96 h mit titrierten Konzentrationen von MOGp $^{35-55}$ oder ohne Peptid bei 37°C und 10% CO $_2$ kultiviert. Die T-Zellproliferation wurde anhand der Inkorporation von ^3H -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die T-Zellproliferation als Proliferationsindex \pm SEM an (n = 4 bis 5 Mäuse). Statistisch signifikante Unterschiede von Fscn-MOG + TGF β (+) und CMV-MOG + TGF β (*) zu der copGFP + GFP-Gruppe sind angegeben (+, * p<0,05; ++ p<0,01).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Milzzellen an Tag 16 post EAE-Induktion zur antigenspezifischen Proliferation durch MOGp35-55-Restimulation gebracht werden konnten. Dabei zeigten Milzzellen aus Mäusen, die präventiv mit Fscn-MOG oder CMV-MOG in Kombination mit TGF β kovakziniert wurden, ein signifikant geringeres Restimulierungspotenzial als Milzzellen aus der copGFP-Kontrollgruppe. Diese Resultate können auf eine T-Zellanergisierung oder die Beteiligung regulatorischer T-Zellen an dem inhibierten EAE-Krankheitsverlauf durch die präventive biolistische DNA-Vakzinierung hindeuten.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass durch die präventive biolistische DNA-Koapplikation von MOG-kodierender Plasmid-DNA und Plasmid-DNA, die für die immunregulatorischen Zytokine TGF β oder IL-10 kodiert, die Th1- und Th17-Immunantwort im Kontext der EAE inhibiert und die Infiltration aktivierter Th1, Th17 sowie IFN γ /IL-17 doppelpositiver Th in das ZNS reduziert wird und dies mit einem verminderten EAE-Krankheitsverlauf korreliert. Des Weiteren konnte ein prozentual höherer Anteil CD8⁺IFN γ ⁺ T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen von den Mäusen identifiziert werden, die mit MOG- und TGF β -kodierenden Plasmiden kotransfiziert worden waren.

3.1.6 Die Th1/Th17-Inhibition kann nicht auf die Aktivität regulatorischer CD4⁺ T-Zellen oder auf eine Th2-Polarisierung zurückgeführt werden.

In zahlreichen Publikationen konnten neben CD8⁺ T-Zellen unterschiedliche regulatorische T-Helferzellpopulationen wie zum Beispiel TGF β -produzierende Th3^{40,41}, IL-10-produzierende Tr1^{34,105} und die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ nTreg^{177,178} als Zellen mit immunsuppressiver Kapazität in Autoimmunitätsmodellen wie der EAE identifiziert werden. Die Beteiligung dieser regulatorischen T-Zellpopulationen könnte eine mögliche Ursache für die inhibierte Th1 und Th17 EAE-Immunantwort in dem hier angewandten präventiven biolistischen DNA-Vakzinierungsmodell darstellen. Ein weiterer potentieller Mechanismus könnte die Verschiebung der Th1/Th17-Immunantwort in Richtung Th2 sein. Lawrence Steinman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die DNA-Koapplikation von Antigen-

und IL-4-kodierendem Plasmid zu einer Th2-Polarisierung und zu einer Verminderung des EAE-Krankheitsverlaufs führte¹⁰⁴.

Um eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen an der inhibierten Th1 und Th17 EAE-Immunantwort oder eine Polarisierung zu einer Th2-Immunantwort zu untersuchen, wurde die MOGp35-55-induzierte Zytokinproduktion von TGF β , IL-10 und IL-5 auf die oben beschriebene Weise mittels ELISA analysiert (siehe Abbildung 23). Es zeigte sich, dass die MOGp35-55-Restimulation nur zu einer geringen antigenspezifischen TGF β -Zytokinproduktion (siehe Abbildung 21) führt. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der TGF β -Konzentration zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen ausgemacht werden. Die Zytokin-konzentrationen von IL-10 und IL-5 waren mit 0,1 bis 0,2 ng / ml für IL-10 und maximal 0,02 ng / ml für IL-5 gering ausgefallen. Außerdem konnte keine antigenspezifische Zytokinproduktion und keine beträchtlichen Konzentrationsunterschiede für diese beiden Zytokine ermittelt werden.

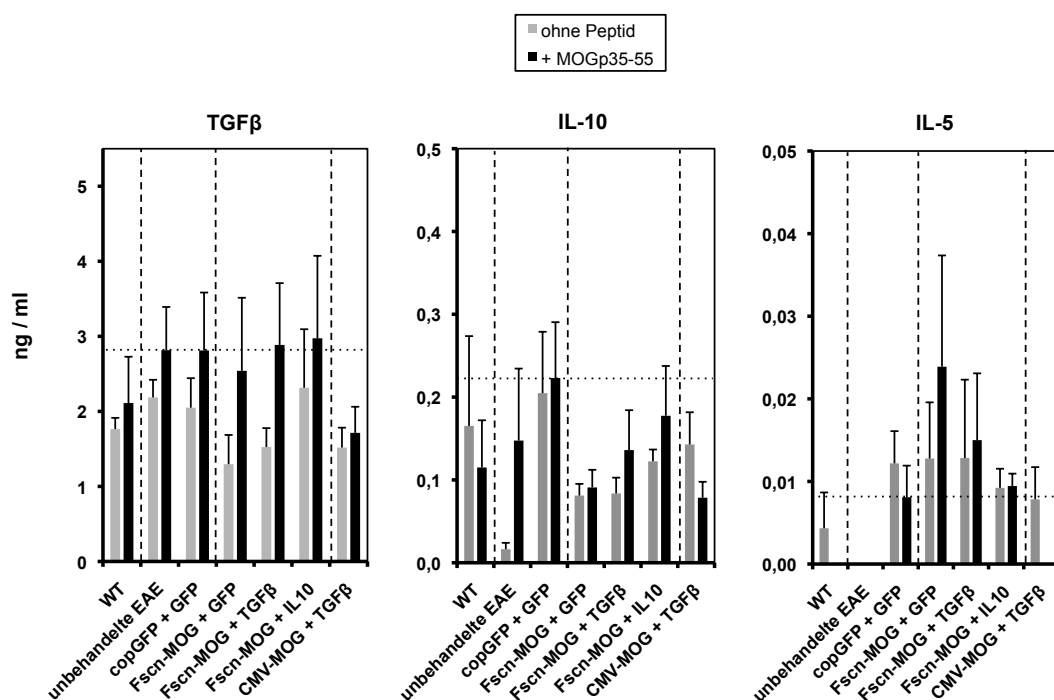


Abbildung 23: Milzzellen aus MOG- und TGF β - oder IL-10-DNA-immunisierten Mäusen weisen keine erhöhte antigenspezifische TGF β , IL-10 und IL-5-Produktion nach MOGp³⁵⁻⁵⁵-Restimulation auf.

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOGp³⁵⁻⁵⁵/CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Die Milzen der Mäuse wurden 16 Tage nach EAE-Induktion präpariert. Die isolierten Milzzellen wurden für 96 h in Kulturmedium sowohl ohne (graue Balken) als auch mit 25 μ g/ml MOGp³⁵⁻⁵⁵ (schwarze Balken) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Der Kulturüberstand wurde entnommen und die Zytokinkonzentrationen von TGF β , IL-10 und IL-5 mittels ELISA ermittelt. Die Daten geben die Zytokinkonzentrationen in ng/ml als Durchschnittswerte \pm SEM von 6 bis 15 Mäusen aus 2 bis 5 unabhängig durchgeführten Experimenten an.

Diese Ergebnisse können somit weder eine Beteiligung von TGF β -produzierenden Th3 und IL-10-produzierenden Tr1 noch eine Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th2 bestätigen.

Um die Beteiligung von Treg weiter zu eruieren, wurde der Anteil Foxp3⁺ Treg im ZNS, den Lymphknoten und der Milz von EAE-Versuchsmäusen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abbildung 24).

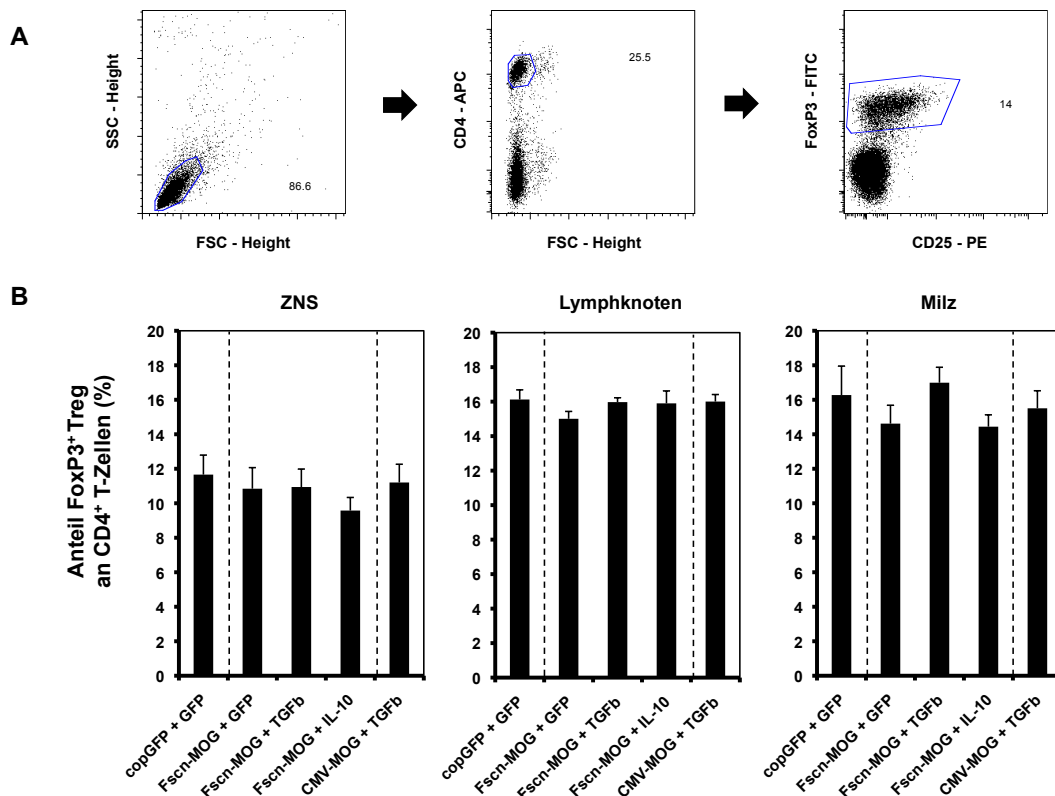


Abbildung 24: Die präventive biolistische Koapplikation von MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierenden Plasmiden bewirkt keine Induktion Foxp3⁺ Treg nach EAE-Induktion.

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 18 beschrieben, mittels präventiver biolistischer DNA-Applikation transfiziert und zur EAE-Induktion mit MOG³⁵⁻⁵⁵/CFA und Pertussis Toxin immunisiert. Das Rückenmark und Gehirn (ZNS) sowie die inguinalen Lymphknoten und Milzen der Mäuse wurde 16 Tage nach EAE-Induktion wie bereits beschrieben präpariert. Die gewonnenen Zellen wurden für durchflusszytometrische Analysen mit Antikörpern gegen CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt. **[A]** Die Gating-Strategie zur Ermittlung der Foxp3⁺ Treg ist beispielhaft dargestellt. **[B]** Die Daten geben den prozentualen Anteil der Foxp3⁺ Treg an den CD4⁺ T-Zellen in dem jeweiligen Organ als Durchschnittswerte \pm SEM von 10 bis 21 Mäusen aus 2 bis 4 unabhängig durchgeführten Experimenten an.

Hierzu wurden die mittels Percoll-Gleichgewichtsdichtezentrifugation angereicherten ZNS-Zellinfiltrate sowie präparierte Milz- und Lymphknoten zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 gefärbt. Zum Höhepunkt der EAE-Symptomatik konnte weder am Inflammationsort, dem ZNS, noch in den

lymphoiden Organen wie Milz und Lymphknoten bemerkenswerte Unterschiede im prozentualen Anteil Foxp3⁺ Treg an CD4⁺ T-Zellen zwischen den unterschiedlich DNA-vakzinierten Mäusen ermittelt werden (siehe Abbildung 24 B).

Zusammenfassend konnte mit den oben aufgeführten Ergebnissen gezeigt werden, dass der inhibierte EAE-Krankheitsverlauf und die reduzierte Th1/Th17-Immunantwort weder auf die Beteiligung von regulatorischen T-Zellen wie Th3, Tr1 und nTreg noch auf eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 begründet ist.

3.2 Dexamethason (DEX)-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige APC (DEX-APC) mit therapeutischem Potenzial in einem murinen Kontaktallergie-Modell.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den tolerogenisierenden Einfluss des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason (DEX) auf antigenpräsentierende Zellen (APC) zu untersuchen. Hierzu wurden Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Gegenwart von DEX kultiviert und phänotypisch und funktionell in vitro charakterisiert. Das Potenzial dieser DEX-APC zur Inhibierung einer Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion (CHS) wurde in einem antigenspezifischen Kontext durch therapeutischen Zelltransfer in vivo untersucht.

3.2.1 DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige APC (DEX-APC) mit protolerogenen Charakteristika.

3.2.1.1 DEX-APC besitzen ein vermindertes syngenes T-Zell-Stimulierungspotential

Zur funktionellen Charakterisierung DEX-konditionierter APC wurden Knochenmarkszellen in Gegenwart von GM-CSF zu unstimulierten BM-DC (DC) kultiviert. Ab Tag 3 der Kultur wurde bei einem Aliquot der Zellkultur DEX hinzugegeben, um konditionierte DEX-APC zu erhalten. Durch Zugabe von LPS zu Aliquoten dieser beiden Zellkulturen wurden außerdem stimulierte LPS DC und LPS DEX-APC generiert. Das Potential der unterschiedlich konditionierten APC zur Proliferationsstimulierung naiver T-Zellen wurde in einer syngenen Kokultur eruiert. Hierfür wurden die differentiell konditionierten APC durch exogene Zugabe von MOG_{p35-55} gepulst und mit MOG-reaktiven T-Zellen aus transgenen 2D2 Mäusen kokultiviert. Die Proliferation der naiven 2D2 T-Zellen wurde durch Einbau von radioaktiv-markiertem ³H-Thymidin ermittelt. Als Negativkontrolle dienten ungepulste APC.

Wie bereits durch diverse Publikationen gezeigt und in Abbildung 25 zu erkennen ist, besitzen LPS stimulierte mature BM-DC im Vergleich zu unreifen BM-DC ein signifikant erhöhtes Potential, naive syngene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dagegen zeigen LPS stimulierte DEX-APC eine signifikant verminderte T-Zellstimulierungsfähigkeit, welche noch unterhalb der von unstimulierten BM-DC liegt. Unstimulierte DEX-APC wiesen nur eine sehr geringe T-Zellproliferation auf. Derartig konditionierte APC besitzen also das geringste Potenzial, naive syngene T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

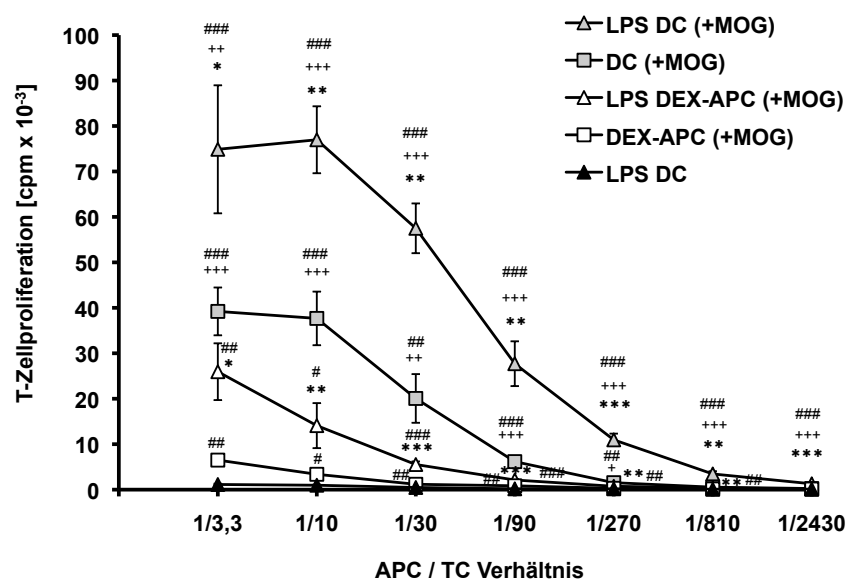


Abbildung 25: DEX-APC besitzen ein vermindertes T-Zellstimulierungspotential

Knochenmarkszellen aus weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels GM-CSF zu DC oder alternativ durch Addition von DEX (10^{-6} M) ab Tag 3 zu DEX-APC kultiviert. An Tag 8 wurden Aliquote dieser Kulturen mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h inkubiert. Die differentiell konditionierten APC wurden geerntet, mit 3.000 rad bestrahlt und mit $25 \mu\text{g/ml}$ MOGp³⁵⁻⁵⁵ gepulst oder als Kontrolle ungepulst belassen. Die verschiedenen APC-Populationen wurden in Triplikatsätzen beginnend mit $1,5 \times 10^4$ Zellen seriell verdünnt und mit jeweils 5×10^4 MOGp³⁵⁻⁵⁵-reaktiven T-Zellen aus 2D2-Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zellproliferation wurde durch Aufnahme von [³H]-Thymidin für die letzten 16 h der syngenen Kokultur ermittelt. Die Daten zeigen die antigenspezifische T-Zellproliferation als Mittelwert \pm SD von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten DC bzw. DC + LPS vs. behandelten DEX-APC bzw. DEX-APC + LPS ([†]) sowie zwischen unstimulierten DC bzw. DEX-APC vs. stimulierten DC + LPS bzw. DEX-APC + LPS (^{*}) und allen MOGp³⁵⁻⁵⁵-gepulsten APC-Populationen vs. ungepulste DC + LPS ([#]) sind angegeben (+,*,# p<0,05; ++,**,## p<0,01; ; +++,***,### p<0,001).

3.2.1.2 DEX-APC zeigen eine verminderte Expression von MHC-II, kostimulatorischen Molekülen und Maturierungsmarkern.

Aufgrund der Resultate der syngen Kokultur (siehe Abbildung 25) scheint es offensichtlich, dass die Differenzierung von BM-DC aus Knochenmarkszellen durch die Anwesenheit des synthetischen Glucocorticoids DEX beeinflusst wird. Da DEX-konditionierte APC ein signifikant reduziertes syngenes T-Zellstimulierungspotential besitzen, wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren MHC-II, CD80 und CD86 sowie die Expression der DC-Reifungsmarker CD40, CD83 und Fascin mittels Antikörpermarkierung untersucht.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 26) zeigen, dass immature BM-DC eine intermediäre Expression von MHC-II, CD40, CD80 und CD86 aufweisen. Die Expressionsverteilung der DC-Reifungsmarker CD83 und Fascin sind innerhalb der Zellpopulation differenziert zu betrachten. Während ein Großteil der unstimulierten BM-DC CD83 und Fascin nur auf einem sehr geringen Level exprimieren, werden diese beiden Moleküle von einem kleinen Anteil der Zellen hoch exprimiert, was durch eine spontane Ausreifung dieser Zellen *in vitro* erklärt werden kann (siehe Abbildung 26 A). Eine Stimulierung von BM-DC mit LPS führt zu einer deutlichen Aufregulation und signifikant höheren Expression von MHC-II und den costimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 sowie den DC-Reifungsmarkern CD40, CD83 und Fascin im Vergleich zu unstimulierten BM-DC (siehe Abbildung 26 B).

DEX-konditionierte APC zeigen im Vergleich zu BM-DC ein differenziertes Expressionsmuster. Unstimulierte DEX-APC exprimieren im Vergleich zu unstimulierten BM-DC signifikant reduzierte Level an MHC-II, CD80, CD83, CD86 und Fascin, die Expression von CD40 befindet sich auf vergleichbarem Niveau. Die LPS-induzierte Aufregulation, wie sie für diese Moleküle bei LPS DC zu beobachten ist, findet bei LPS DEX-APC nicht in dem Ausmaß statt. LPS DEX-APC haben im Vergleich zu den unstimulierten DEX-APC eine signifikant erhöhte Expression von CD80, die jedoch verglichen mit unstimulierten BM-DC niedriger ausfällt. Die Expression von MHC-II, CD83, CD86 und Fascin ist geringfügig und nicht signifikant höher als bei unstimulierten DEX-APC, aber signifikant niedriger als bei unstimulierten DC und LPS DC. Für CD40 konnte bei den LPS DEX-APC eine

Expression vergleichbar mit der von unstimulierten DC und DEX-APC ermittelt werden.

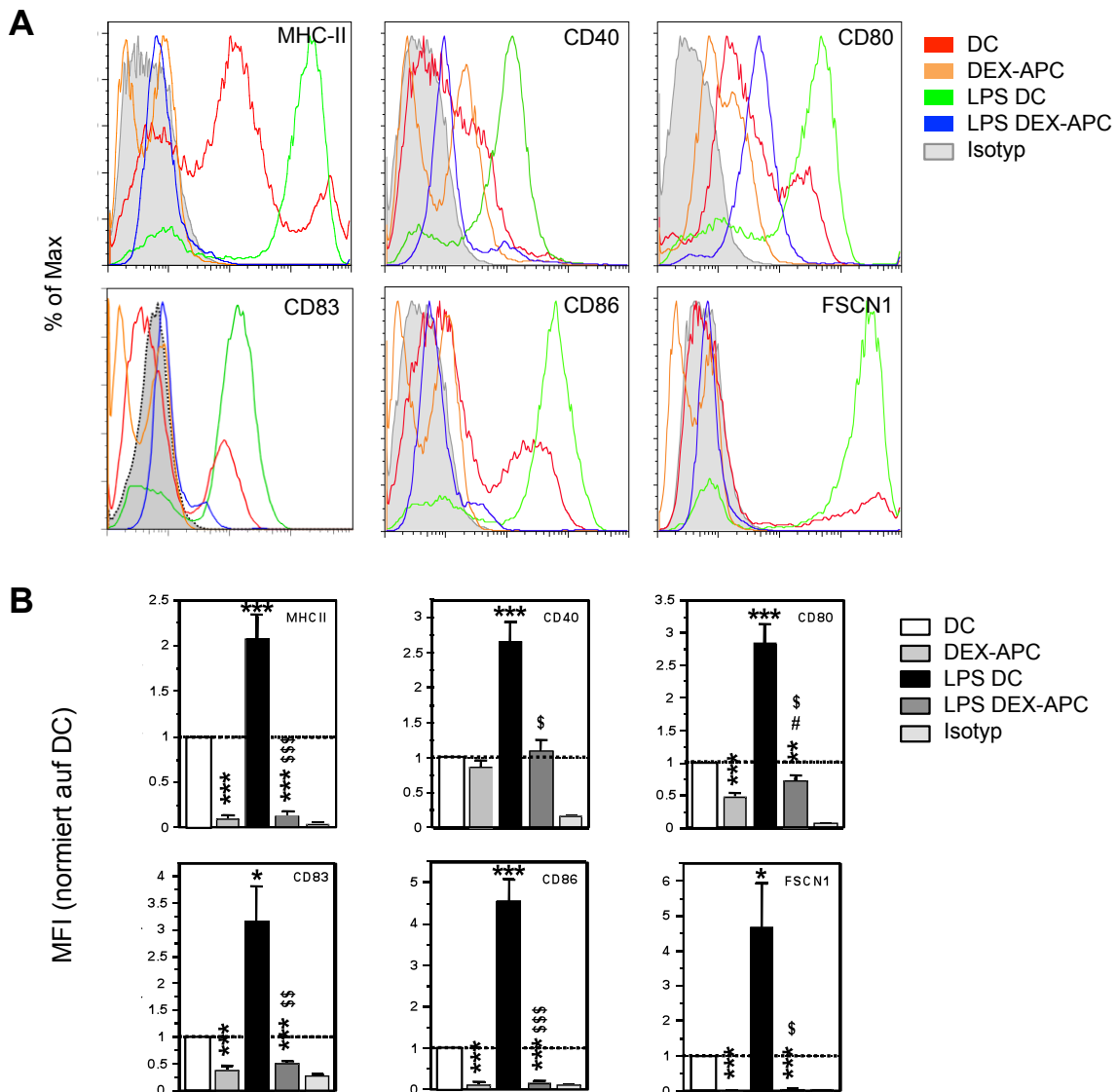


Abbildung 26: DEX-APC zeigen eine verminderte Expression von MHC-II, costimulatorischen Molekülen und DC-Reifungsmarkern.

Knochenmarkszellen aus weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels GM-CSF zu DC oder alternativ durch Addition von DEX (10^{-6} M) ab Tag 3 zu DEX-APC kultiviert. An Tag 8 wurden Aliquote dieser Kulturen mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h inkubiert. Die differentiell konditionierten APC wurden geerntet und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. **[A]** Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen sind dargestellt. **[B]** Die MFI (mean fluorescence intensity) sind als Mittelwerte + SEM von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt und sind auf den MFI der immaturren BM-DC-Gruppe (DC) normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben: * vs. DC, # LPS DEX-APC vs. DEX-APC und \$ LPS DEX-APC vs. LPS DC (*, #, \$ $p < 0,05$; **, \$\$ $p < 0,01$; ***, \$\$\$ $p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigen die durchflusszytometrischen Analysen, dass DEX-konditionierte APC ein reduziertes Expressionsprofil von Molekülen haben, die für die

Aktivierung von T-Zellen notwendig sind. Desweiteren lassen sich DEX-APC durch LPS nicht zu einer vergleichbaren Maturierung bringen, wie sie bei unbehandelten BM-DC stattfindet. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der syngenen Kokultur und verdeutlichen das verminderte Potential von DEX-konditionierten APC, T-Zellen zu stimulieren. Somit ist offensichtlich, dass die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu BM-DC durch die Anwesenheit von DEX beeinflusst wird und sich hierbei APC mit differenziertem Phänotyp und Funktionalität sowie mit Charakteristika von tolerogenen DC entwickeln.

3.2.1.3 DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen resultiert in MDSC-artige CD11b+F4/80+GR-1+ APC.

Zur genaueren phänotypischen Charakterisierung wurden die unterschiedlich konditionierten APC gegen CD11c, einen gut etablierten Marker für konventionelle DC, gefärbt. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass unstimulierte BM-DC CD11c auf einem hohen Level exprimieren und nach LPS-Stimulierung signifikant herunter regulieren. DEX-APC hingegen zeigen eine reduzierte Expression von CD11c signifikant unter dem Niveau von unstimulierten BM-DC, welche bei LPS-Stimulierung nicht herunter reguliert wird.

F4/80, ein Marker für Zellen monozytärer Abstammung, wird von unstimulierten BM-DC und LPS DC auf einem vergleichbaren moderaten Niveau exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression dieses Oberflächenmoleküls bei unstimulierten DEX-APC signifikant höher und wird durch LPS-Stimulierung weiter aufreguliert. Der monozytäre Marker CD11b wird von BM-DC und DEX-APC auf einem vergleichbaren Level exprimiert. Nach Stimulation kann eine signifikante Aufregulation von CD11b bei den LPS DEX-APC, jedoch nicht bei den LPS DC, beobachtet werden.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, wird der myeloide Differenzierungsmarker GR-1 von BM-DC unabhängig von dem Stimulierungsstatus auf einem geringen Level exprimiert. Im Gegensatz dazu weisen unstimulierte DEX-APC eine signifikant erhöhte GR-1 Expression auf und nach LPS-Stimulierung wird die Expression weiter aufreguliert.

Zur weiteren phänotypischen Unterscheidung wurden die unterschiedlich konditionierten APC gegen die Oberflächenmoleküle B220, CD14 und den Thymocytenmarker CD90 gefärbt. B220, welches von B-Zellen, plasmacytoiden DC

und NK-Zellen, aber auch von Subpopulationen konventioneller DC¹⁷⁹ exprimiert wird, wird von BM-DC und DEX-APC unabhängig vom Stimulierungsstatus nicht bzw. nur auf einem sehr geringen Niveau exprimiert. Für CD90, welches vor allem von T-Zellen aber auch von folliculären DC¹⁸⁰ exprimiert wird, und für den Monozyten- und Makrophagen-Marker CD14, konnten keine Expression identifiziert werden (siehe Abbildung 27 A, untere Reihe).

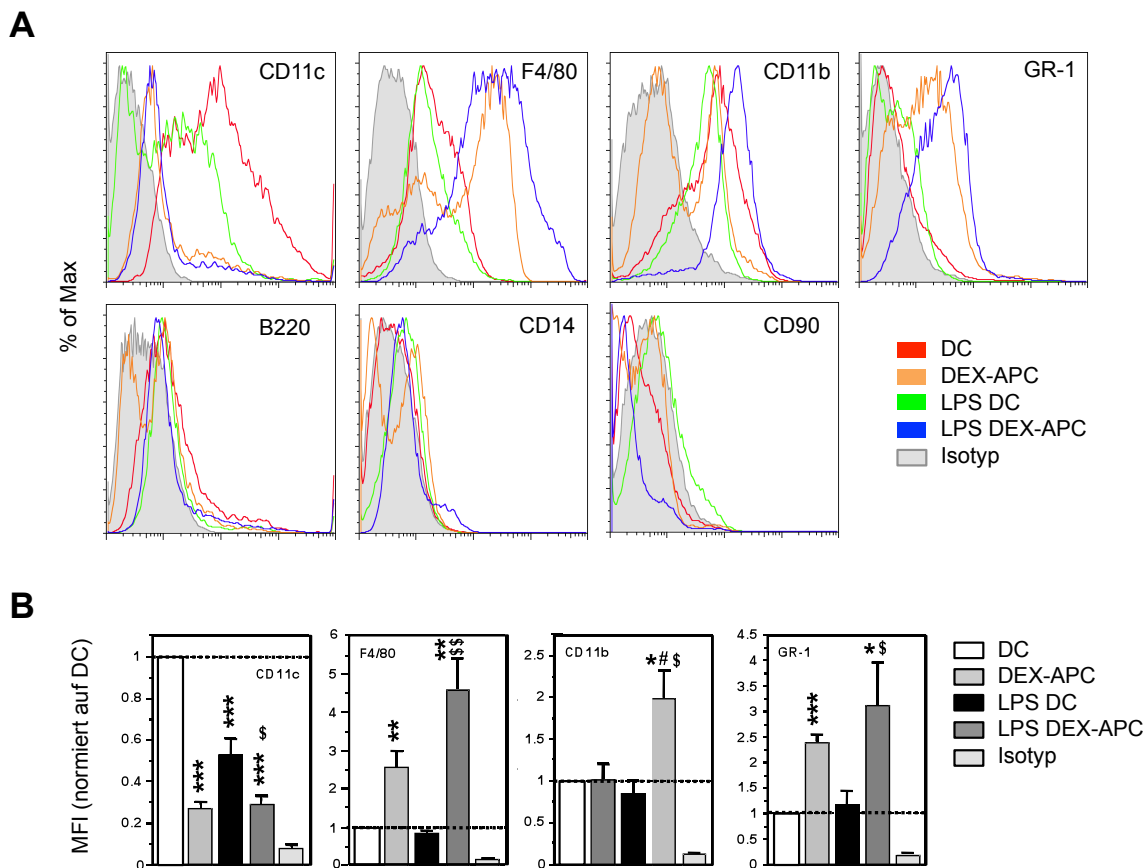


Abbildung 27: DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläuferzellen führt zu MDSC-artigen CD11b⁺F4/80⁺GR-1⁺ APC.

Knochenmarkszellen aus weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels GM-CSF zu DC oder alternativ durch Addition von DEX (10^{-6} M) ab Tag 3 zu DEX-APC kultiviert. An Tag 8 wurden Aliquote dieser Kulturen mit 1 μ g/ml LPS für 24 h inkubiert. Die differenziell konditionierten APC wurden geerntet und mit den angegebenen Antikörpern markiert. **[A]** Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen sind dargestellt. **[B]** Die MFI (mean fluorescence intensity) sind als Mittelwerte + SEM von 2 oder mehr unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt und sind auf den MFI der immaturren BM-DC-Gruppe (DC) normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben: * vs. DC, # LPS DEX-APC vs. DEX-APC und \$ LPS DEX-APC vs. LPS DC (*, #, \$ $p < 0,05$; **, \$\$ $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigen die durchflusszytometrischen Analysen der unterschiedlich konditionierten APC, dass bei der Entwicklung von BM-DC-Vorläuferzellen unter DC-differenzierenden Bedingungen und DEX-Anwesenheit eine

alternative Zellpopulation von APC entsteht. DEX-APC sind $CD11c^{low}CD40^{int}CD80^{low}CD86^{low}MHC-II^{low}$ und besitzen somit phänotypische Eigenschaften von tolerogenen DC. Desweiteren sind DEX-APC $CD11b^{+}F4/80^{+}GR-1^{+}$ und zeigen somit Charakteristika des Expressionsprofils von myeloiden Suppressorzellen (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) ^{181,182}.

3.2.2 DEX-APC eignen sich zur nachhaltigen Toleranzinduktion in einem therapeutischen Ansatz der CHS.

Die oben aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass durch Anwesenheit des synthetischen Glucocorticoids DEX bei der BM-DC-Differenzierung APC mit geringer T-zellstimulatorischer Kapazität und einem MDSC-artigen Expressionsprofil entstehen. Im Folgenden wurde untersucht, ob diese DEX-APC die Fähigkeit besitzen, eine CHS in einem therapeutischen Ansatz zu inhibieren. Hierfür wurden C57BL/6 Mäusen 5 Tage, nachdem sie mit dem Hapten DNFB auf der rasierten Bauchoberfläche sensibilisiert wurden, die unterschiedlich konditionierten und DNBS-gepulsten APC subkutan injiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, bei denen anstelle von Hapten-gepulsten APC PBS injiziert wurde. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Ohrflächen der Mäuse mit DNFB provoziert und der Verlauf der CHS durch Messung der Ohrschwellung ermittelt (siehe Abbildung 28).

Bei Mäusen der PBS-Kontrollgruppe konnte nach 24 Stunden eine Ohrschwellung von durchschnittlich 80 μm ermittelt werden. Nach 48 Stunden wurde der Höhepunkt der CHS mit einer Ohrschwellung von ca. 90 μm identifiziert, danach nahm die Ohrschwellung wieder ab auf einen Wert von durchschnittlich ca. 70 μm 96 Stunden nach Provokation.

Die therapeutische Injektion von haptengepulsten stimulierten LPS DC erhöhte im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe die Ohrschwellungswerte signifikant über den gesamten Beobachtungszeitraum, während die Injektion von haptengepulsten unstimulierten DC keinen Effekt ausübten. Die maximale Ohrschwellung konnte in der LPS DC-Gruppe 48 Stunden nach Provokation mit einem durchschnittlichen Wert von ca. 120 μm ermittelt werden.

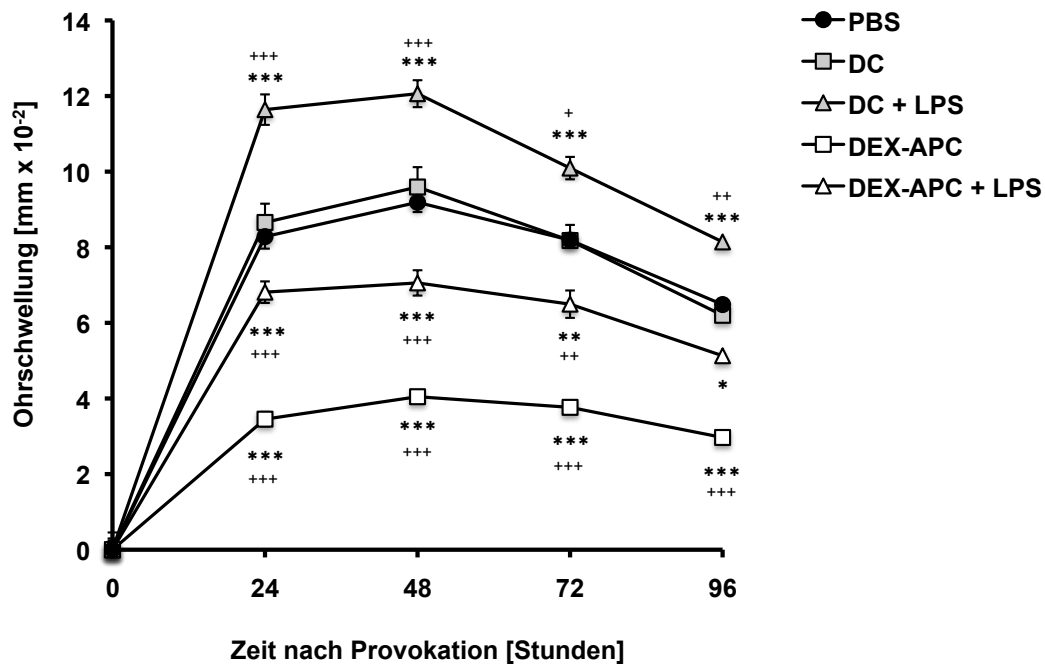


Abbildung 28: DEX-APC supprimieren eine CHS in einem therapeutische Ansatz.

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch epikutane Applikation von 17 μ l einer 0,4 % DNFB-Lösung auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen aus weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels GM-CSF zu DC oder alternativ durch Addition von DEX (10^{-6} M) ab Tag 3 zu DEX-APC kultiviert. An Tag 8 wurden Aliquote dieser Kulturen mit 1 μ g/ml LPS für 24 h inkubiert. Die differentiell konditionierten APC wurden geerntet, bestrahlt und mit 5 μ M DNBS gepulst. Die gepulsten APC (5×10^5 /Tier) oder PBS wurden an Tag 5 nach Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage später wurden die Mäuse durch Auftragen von 8,5 μ l einer 0,2 % DNFB-Lösung auf die Vorder- und Rückseite beider Ohrmuscheln provoziert. Die Messung der Ohrschwellung erfolgte über einen Zeitraum von 96 h. Die Daten zeigen den durchschnittlichen Messwert \pm SEM (n = 16) der Ohrschwellung aus 4 unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der PBS-Gruppe (*) sowie gegenüber der DC-Gruppe (†) sind angegeben (*,† p<0,05; **,†† p<0,01; ***,††† p<0,001).

Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die therapeutisch DEX-APC verabreicht bekommen hatten, eine signifikant reduzierte Ohrschwellungsreaktion über den kompletten Beobachtungszeitraum. In der LPS DEX-APC-Gruppe offenbarte sich eine moderate aber signifikante Reduktion der Ohrschwellung mit einem maximalen Wert von durchschnittlich ca. 70 μ m. Die therapeutische Injektion von unstimulierten DEX-APC führte zu einer beträchtlichen Verminderung der Ohrschwellungsreaktion mit einem maximalen Wert von ca. 40 μ m 48 Stunden nach Provokation.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete inhibierende Effekt nachhaltig in den Mäusen induziert wurde, wurden die Mäuse einen Monat nach dem letzten Messwert erneut mit dem Hapten DNFB auf den Ohrläppchen provoziert und die

Ohrschwellungsreaktion für die nachfolgenden 96 Stunden dokumentiert (siehe Abbildung 29).

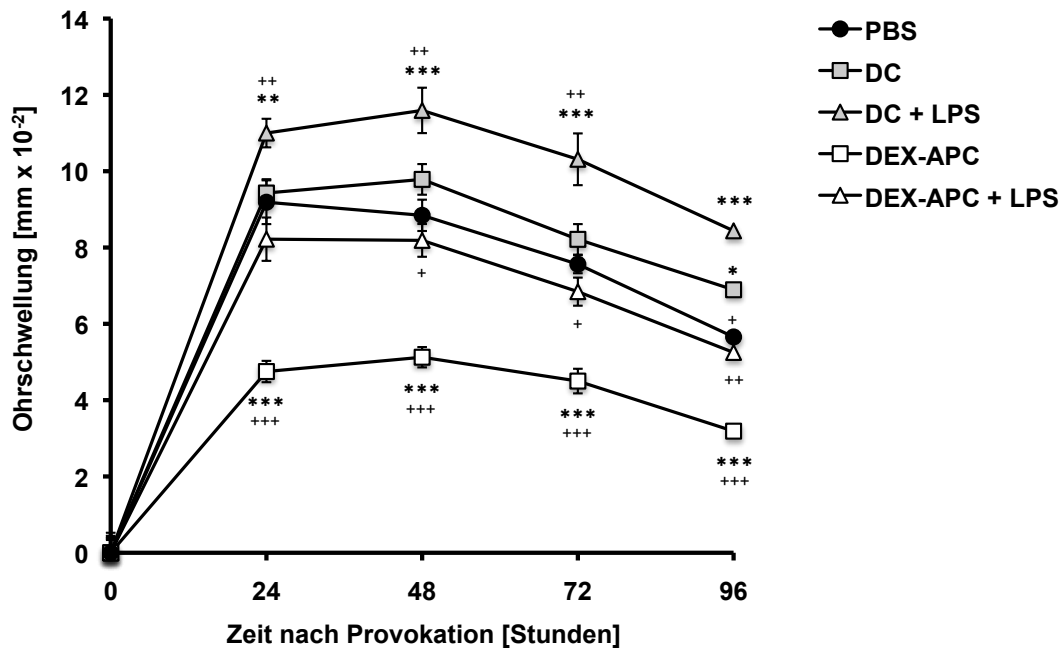


Abbildung 29: DEX-APC reduzieren CHS-Symptomatik mit Nachhaltigkeit.

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch epikutane Applikation von 17 μ l einer 0,4 % DNFB-Lösung auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen aus weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels GM-CSF zu DC oder alternativ durch Addition von DEX (10^{-6} M) ab Tag 3 zu DEX-APC kultiviert. An Tag 8 wurden Aliquote dieser Kulturen mit 1 μ g/ml LPS für 24 h inkubiert. Die differentiell konditionierten APC wurden geerntet, bestrahlt und mit 5 μ M DNBS gepulst. Die gepulsten APC (5×10^5 /Tier) oder PBS wurden an Tag 5 nach Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage später wurden die Mäuse durch Auftragen von 8,5 μ l einer 0,2 % DNFB-Lösung auf die Vorder- und Rückseite beider Ohrmuscheln provoziert. Einen Monat später wurden die Mäuse erneut auf beschriebene Weise provoziert. Die Messung der Ohrschwellung erfolgte über einen Zeitraum von 96 h. Die Daten zeigen den durchschnittlichen Messwert \pm SEM (n = 8) der Ohrschwellung aus 2 unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der PBS-Gruppe (*) sowie gegenüber der DC-Gruppe (†) sind angegeben (*, * p<0,05; **, ** p<0,01; ***, *** p<0,001).

Nach dieser zweiten Provokation konnte bei den Mäusen, die vor der ersten Provokation LPS DC verabreicht bekommen hatten, erneut eine signifikant erhöhte Ohrschwellungsreaktion im Vergleich zu den PBS-Kontrollmäusen ausgemacht werden. Die therapeutische Injektion von unstimulierten DEX-APC vor der ersten Provokation führte auch nach der zweiten Provokation einen Monat später zu einer inhibierten und über alle Beobachtungszeitpunkte signifikant reduzierten Ohrschwellung. Bei Mäusen, die unstimulierte DC bzw. LPS-stimulierte DEX-APC

verabreicht bekommen hatten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Ohrschwellungsreaktion im Vergleich zu den PBS-Kontrollmäusen.

Zusammenfassend zeigen die oben aufgeführten Ergebnisse, dass DEX-APC nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* ein tolerogenes Potential besitzen und therapeutisch appliziert die Inflamationsreaktion während einer CHS inhibierend beeinflussen können.

4. Diskussion

DC nehmen als professionelle antigenpräsentierende Zellen nicht nur eine Schlüsselfunktion in der immunologischen Abwehr und Einleitung adaptiver Immunreaktionen gegen pathogene Erreger ein, sondern sind auch an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt. Unter homöostatischen Bedingungen kommen sie als residente Wächterzellen in der Haut sowie der Schleimhaut vor. Im peripheren Gewebe reifen einige immature DC spontan zu semi-maturen DC (smDC) aus ²⁸, wandern zum lokalen Lymphknoten und präsentieren naiven T-Zellen körpereigene Peptide gebunden an MHC-Moleküle. Auf Grund fehlender Stimulation sind smDC nur zu einer moderaten MHC-Peptid-Präsentation fähig, zeigen eine geringe Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 und produzieren keine proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF α oder IL-12 ²⁸. DC mit diesen Eigenschaften sind nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren. Stattdessen fungieren sie als tolerogene DC und lösen in einem antigenspezifischen Kontext Apoptose, T-Zellanergie oder die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen aus ¹⁸³. Somit können tolerogene DC unter physiologischen Bedingungen die Aktivierung potenziell autoreaktiver T-Effektorzellen und die Induktion autoaggressiver Immunantworten gegen das körpereigene Gewebe verhindern.

4.1 EAE-Inhibition mittels biolistischer DNA-Vakzinierung

Die Multiple Sklerose ist eine autoimmune Erkrankung des ZNS mit unbekannter Ätiologie. Klinische Befunde und Ergebnisse aus Forschungsarbeiten mit der EAE, einem intensiv erforschten Krankheitsmodell der MS, deuten auf eine unkontrollierte autoaggressive Immunreaktion gegen Zielstrukturen im ZNS hin. Hierbei infiltrieren Myelin-reaktive T-Zellen das ZNS und führen zu Organinflammation und Demyelinisierung ¹⁸⁴. Antigenpräsentierende Zellen sind für die EAE-Induktion von essentieller Bedeutung ¹⁸⁵. Nach heutigem Wissensstand erfolgt das initiale Priming enzephalitogener T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen ¹⁸⁶. Begegnen DC Myelin-Antigen oder Mimetika unter proinflammatorischen Bedingungen in der Peripherie, reifen Sie aus, wandern zum lokalen Lymphknoten und präsentieren das

Antigen naiven T-Zellen. Die T-Zellaktivierung benötigt in der Regel drei Signale ²⁴: erstens die Bindung des spezifischen T-Zellrezeptors an den Antigenpeptid-MHC-Komplex und zweitens die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen wie zum Beispiel CD80 und CD86 auf DC mit CD28 auf T-Zellen. Das dritte Signal wird vom vorherrschenden Zytokinmilieu bestimmt und ist an der Differenzierung aktivierter CD4+ T-Zellen zu T-Zellsubpopulationen wie zum Beispiel Th1, Th2, Th17 oder Treg beteiligt. Obwohl die Mechanismen noch kontrovers diskutiert werden, scheinen CD4+ Th1 und Th17 nach aktueller Datenlage die entscheidenden Immunzellen für die Initiierung und Progression der EAE-Pathologie zu sein. Nach Aktivierung und Differenzierung im Lymphknoten migrieren Th1 und Th17 über den Blutkreislauf zur Bluthirnschranke. Hier werden die T-Effektorzellen durch ZNS-assoziierte APC antigenspezifisch reaktiviert ¹⁸⁷, was zur Einleitung von Inflammation und folglich zur Progression der EAE-Pathologie führt. Derzeit existieren keine kausalen Therapieansätze für MS, sondern Behandlungen zielen in der Regel auf eine unspezifische Inhibierung des Immunsystems ab. MS-Behandlungsstrategien sollten dazu führen, die immunologische Selbst-Toleranz gegen das Autoantigen wiederherzustellen ohne das gesamte Immunsystem zu beeinträchtigen ¹⁰⁹. Tolerogene DC besitzen das Potenzial, Inflammation auf antigenspezifische Weise zu supprimieren. Sowohl die DNA-Vakzinierung als auch die in vitro Generierung von BM-DC unter immunsupprimierenden Bedingungen haben sich als geeignete Methoden zur Induktion tolerogener DC bewährt. Die DNA-Vakzinierung wurde erfolgreich zur Induktion antigenspezifischer regulativer Immunantworten in diversen experimentellen Krankheitsmodellen wie der rheumatoiden Arthritis ¹⁸⁸, Diabetes mellitus ¹⁸⁹ oder MS ¹⁰⁹ eingesetzt. In einem MBP₆₈₋₈₆-induzierten EAE-Modell in Lewis-Ratten konnten Schiff-Zuck und Kollegen eine Verminderung der EAE-Symptome durch i.m. Koadministration von MBP₆₈₋₈₆- und IL-10-kodierender Plasmid-DNA erzielen ¹⁰⁵. Die Autoren führen die Suppression auf die erhöhte Aktivität antigenspezifischer IL-10-produzierender Tr1-Zellen zurück. Der suppressive Effekt konnte nur durch die Koadministration mit Plasmid-DNA erzielt werden, die für das MBP₆₈₋₈₆ oder das gesamte MBP-Protein kodiert, nicht jedoch mit Plasmid-DNA, die für das sekundäre Epitop MBP₈₇₋₉₉ kodiert. Die Autoren schlussfolgern, dass für eine effektive Toleranzinduktion eine regulative Immunantwort gegen das für die Inflammation verantwortliche Epitop generiert werden muss.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial einer DC-fokussierten biologischen DNA-Vakzinierung in der MOGp35-55-induzierten EAE in C57BL/6-Mäusen untersucht. Hierzu wurden Expressionsplasmide generiert, die für das gesamte MOG-Protein oder das Peptid MOGp35-55 kodieren. Die funktionale Überprüfung der generierten Expressionsplasmide, eine transgene Proteinexpression und Präsentation des relevanten Autoantigens MOGp35-55 über MHC zu ermöglichen, war für die angestrebten *in vivo* DNA-Vakzinierungsexperimente zwingend erforderlich. Der Nachweis erfolgte durch *in vitro* Transfektion von BM-DC mittels Elektroporation¹⁵⁸. BM-DC wurden mit den Expressionsplasmiden transfiziert und anschließend mit MOGp35-55-reaktiven CD4⁺ T-Zellen aus 2D2 Mäusen kokultiviert. Hierbei wurde mit Expressionsplasmiden, die für das gesamte MOG-Protein kodieren, eine signifikante antigenspezifische 2D2 T-Zellproliferation beobachtet. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Transfektion in BM-DC zur transgenen Proteinexpression sowie Proteinprozessierung von MOG und nachfolgend zur Präsentation von MOGp35-55 über MHC-II führte. Interessanterweise konnte bei weiteren Transfektionsansätzen mit Plasmiden, die für das Fusionskonstrukt aus Invarianter Kette und MOGp35-55 kodieren, ebenfalls eine signifikante 2D2-Tellzellproliferation ermittelt werden, jedoch nicht mit Plasmiden, die für MOGp35-55 alleine kodieren. Dies lag vermutlich an einer unzureichenden MHC-II-Beladung mit dem zytosolisch produzierten MOGp35-55 in diesen Ansätzen. Diebold et al.¹¹⁴ konnten in einem anderen Transfektionssystem mit OVA-Peptid-kodierenden Expressionplasmiden zeigen, dass die transgene Expression eines Fusionsprodukts aus Invarianter Kette und OVA-Peptid in transfizierten APC zu einer verstärkten Präsentation von OVA über MHC-II führt. Analog zu diesen Erkenntnissen ist somit auch bei MOGp35-55-Transfektionen die Verwendung von Expressionsplasmiden sinnvoll, die für ein Fusionskonstrukt aus Invariante Kette und Peptid kodieren, um eine gesteigerte bzw. effiziente Präsentation von MOGp35-55 über MHC-II-Moleküle zu ermöglichen. Die Begründung dieser Ergebnisse liegt in den biologischen Funktionen der Invarianten Kette. Das Fusionsprotein li-MOGp35-55 wird nach der Transfektion zytosolisch exprimiert und in das endoplasmatische Retikulum transloziert. Im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lagert sich li-MOGp35-55 mit Sequenzbereichen der Invarianten Kette in die Bindungsfurche dort befindlicher MHC-II-Moleküle. Die MHC-II-Moleküle werden in dem Proteinkomplex stabilisiert und eine Bindung intrazellulärer Peptide an die MHC-II-Bindungsfurche sterisch verhindert. In einer weiteren Funktion signalisiert die Invariante Kette den Abtransport in Vesikeln.

Auf diese Weise wird MOGp35-55 automatisch zum endosomalen MHC-II-Kompartiment (MIIC) der Zelle dirigiert. Hier verschmelzen die Vesikel mit vesikulären Endosomen, welche extrazellulär aufgenommene, hydrolysierte Proteine bzw. Peptide beinhalten. Die Invariante Kette wird enzymatisch gespalten und MOGp35-55 kann mit anderen Peptiden um die Bindung an frei gewordene MHC-II-Bindungsfurchen konkurrieren.

Da bei den durchgeführten *in vitro* Transfektionen die unterschiedlichen Expressionsplasmide unter standardisierten Bedingungen in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden, konnte ein direkter Vergleich zwischen den Transfektionsansätzen angestellt werden. So konnten Rückschlüsse auf die Expressionsstärke von MOG bzw. MOGp35-55 in Abhängigkeit der beiden verwendeten Promotoren pCMV und pFascin getroffen werden. Bei dem CMV-Promotor handelt es sich um ein Promotorelement mit bekannter hoher Transkriptionsaktivität in diversen Zellarten ¹⁹⁰. Wie erwartet, war mit den Expressionsplasmiden, bei denen MOG bzw. li-MOGp35-55 unter der Transkriptionskontrolle von pCMV standen, die höchste antigenspezifische T-Zellproliferation messbar. Bemerkenswert waren die Resultate bei Transfektionen von Plasmiden, bei denen die Transkription von MOG bzw. li-MOGp35-55 unter der Kontrolle von pFascin war. In diesen Ansätzen konnte eine signifikante T-Zellproliferationen gemessen werden, die lediglich um den Faktor 3 bis 4 geringer war, als bei den entsprechenden Plasmiden mit dem CMV-Promotor. Diese Ergebnisse untermauern die von Ralf Ross und Kollegen ¹⁹¹ publizierten Erkenntnisse, dass der Fascin-Promotor eine DC-fokussierte Transgenexpression ermöglicht und im Vergleich zu anderen DC-fokussierten Promotoren, wie zum Beispiel dem Dectin-2-Promotor, eine hohe Transkriptionsaktivität in maturierenden DC aufweist. Somit eignet sich der Fascin-Promotor insbesondere für biolistische DNA-Vakzinierungsstrategien wie sie in dieser Arbeit beabsichtigt waren.

4.1.1 In vivo Induktion MOGp35-55 präsentierender APC in drainierenden Lymphknoten mittels biolistischer DNA-Vakzinierung

In der vorliegenden Arbeit sollte MOG-Protein in DC der Haut ektopisch zur Expression gebracht werden und folglich eine MOGp35-55-spezifische Immunreaktion in den lokalen drainierenden Lymphknoten *in vivo* induziert werden. Der Beweis, dass mit den

generierten MOG- bzw. MOGp35-55-Expressionsplasmiden eine solche Immunreaktion mittels Gene Gun-Verfahren induziert werden kann, wurde mit Hilfe eines adoptiven Transfersystems mit CFSE markierten MOGp35-55-reaktiven 2D2 T-Zellen dargelegt. Mittels Durchflußzytometrie wurde eine in vivo Proliferation der transferierten MOGp35-55-reaktiven 2D2 T-Zellen in den Lymphknoten der Wirtsmäuse identifiziert. Somit ist evident, dass nach biolistischer Transfektion mit MOG- und li-MOGp35-55-kodierenden Expressionsplasmiden transfizierte DC aus der Peripherie Richtung drainierende Lymphknoten migrieren und dort Lymphozyten das immunrelevante Autoantigen MOGp35-55 präsentieren. Dass es sich bei der in vivo Proliferation der MOGp35-55-reaktiven T-Zellen nicht um eine unspezifische Aktivierung handelt, konnte durch Kontrollansätze mit Leervektor nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde keine Proliferation detektiert. Obwohl äquimolare Plasmid-DNA-Mengen eingesetzt wurden, fiel in den unterschiedlichen Transfektionsansätzen die Stärke der beobachteten 2D2 T-Zellproliferation, nicht jedoch die Anzahl der detektierten Zellzyklen, unterschiedlich aus. In Lymphknoten von Wirtsmäusen, die zuvor mit pCDH1-CMV-MOG transfiziert wurden, konnte eine deutlich höhere Anzahl proliferierender 2D2 T-Zellen ermittelt werden als bei Ansätzen mit pCDH1-Fscn-MOG. Dies war zu erwarten, da durch den ubiquitär aktiven CMV-Promotor prinzipiell alle biolistisch direkt transfizierten Zellen MOG transgen exprimieren. Wie bereits durch Sudowe et al.¹²⁷ publiziert, können bei biolistischen Transfektionen mit einem ubiquitären Promotorelement neben den direkt transfizierten DC zudem auch nicht-transfizierte DC, welche Antigen von anderen transfizierten apoptotischen Zellen, zum Beispiel Keratinozyten, durch Phagozytose aufgenommen haben, das Antigen über MHC-II präsentieren¹²⁷. Somit ist in diesem Ansatz im Vergleich zu den biolistischen Transfektionen mit dem Fascin-Promotor, bei dem nur direkt transfizierte DC das Transgen exprimieren, die Anzahl MOG-präsentierender APC höher und folglich die induzierte T-Zellproliferation stärker. Zusammenfassend konnte durch das angewandte adoptive T-Zell-Transfersystem die grundsätzliche Funktionalität der biolistischen Transfektion mit MOG-kodierender Plasmid-DNA und die Präsenz MOGp35-55-präsentierender APC in den drainierenden Lymphknoten aufgezeigt werden. Dies war Grundvoraussetzung für die durchgeführten präventiven in vivo DNA-Vakzinierungen im MOGp35-55-induzierten EAE-Krankheitsmodell.

4.1.2 Die präventive biolistische DNA-Kovakzinierung mit MOG und TGF β oder IL-10 führt zu einem supprimierten EAE-Verlauf.

Diverse Forschungsarbeiten mit DNA-Vakzinierungen im Krankheitsmodell der EAE brachten widersprüchliche Erkenntnisse über induzierte immunologische Mechanismen und deren resultierende Wirkung auf den klinischen EAE-Verlauf hervor. Carole Bourquin ¹⁹² identifizierte durch präventive i.m. Administration MOG-kodierender Plasmid-DNA in SJL-Mäuse einen immunogenen Effekt mit verstärktem EAE-Krankheitsverlauf. Die DNA-Vakzinierung induzierte eine MOG-spezifische autoaggressive Antikörperantwort vom IgG2a-Typ. T-Zellen aus Lymphknoten der Versuchsmäuse reagierten auf MOG-Restimulation mit leicht erhöhter Proliferation sowie erhöhter IFN γ -Produktion. In einer anderen Arbeit von Fissolo et al. ¹⁰⁷ hingegen führte die i.m. Administration MOG-kodierender DNA zu einem reduzierten Krankheitsverlauf im Modell der MOGp35-55-induzierten EAE in C57BL/6-Mäusen. Der reduzierte EAE-Krankheitsverlauf ging einher mit einer supprimierten antigenspezifischen Immunantwort vom Th1- und Th17-Typ und einer Expansion von regulatorischen T-Zellen in der Peripherie. In einer weiteren Arbeit von Ramshaw et al. ¹²² wurde im MBP-induzierten EAE-Modell durch Gene Gun-vermittelte DNA-Vakzinierung mit MBP-kodierender Plasmid-DNA eine protektive Immunantwort vom Th2-Typ mit reduziertem Krankheitsverlauf in Lewis-Ratten induziert. Interessanterweise konnte jedoch in dieser Publikation kein inhibierender Effekt auf den EAE-Krankheitsverlauf erzielt werden, wenn die Plasmid-DNA mittels i.m. Nadelinjektion verabreicht wurde. Die Diversität der gewonnenen Erkenntnisse aus den DNA-Vakzinierungsexperimenten liegt darin begründet, dass die Immunisierungsstrategie, die Art der Verabreichung, das gewählte Krankheitsmodell und die Eigenschaften der Plasmid-DNA beeinflussen, welche Zellen angezielt werden und welche immunologischen Mechanismen induziert werden. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine publizierten Erkenntnisse über das intervenierende Potenzial einer DC-fokussierten biolistischen DNA-Vakzinierung im MOGp35-55-induzierten EAE-Modell in C57BL/6-Mäusen. Im Fokus unserer Untersuchungen stand bei den durchgeführten DNA-Vakzinierungen die ektopische MOG-Antigen-Expression unter Kontrolle des DC-fokussierten Fascin-Promotors im Vergleich zu dem ubiquitär aktiven CMV-Promotor. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Einsatz eines DC-fokussierten Promotors bei solchen DNA-Vakzinierungen, bei denen IL10- oder TGF β -kodierende

Expressionsplasmide koappliziert werden, die Induktion einer regulativen Immunantwort begünstigen. Die Grundidee dieser Hypothese ist, dass durch den Fascin-Promotor ausschließlich direkt transfizierte DC das Antigen exprimieren. Auf Grund der induzierten Koexpression von IL-10 oder TGF β können somit transfizierte DC durch einen autokrinen Effekt gleichzeitig in einen tolerogenen Zustand versetzt werden und somit als tolerogene APC fungieren^{193,194}. Im Gegensatz dazu führt der Einsatz eines ubiquitär aktiven Promotors zur ektopischen Expression des Antigens durch alle transfizierten Zellen, in denen der Promotor Aktivität aufweist. Bei der biologischen DNA-Vakzinierung mittels Gene Gun werden quantitativ vor allem Keratinozyten angezielt¹⁹¹. Das auf diese Weise ektopisch exprimierte Antigen kann durch andere nicht-transfizierte APC über apoptotische Vesikel aufgenommen werden und somit indirekt präsentiert werden¹²⁷. Da solche nicht-transfizierten und indirekt antigenpräsentierenden Zellen jedoch nicht durch Koexpression von IL-10 oder TGF β in einen tolerogenen Zustand versetzt wurden, können sie theoretisch als mature immunogene APC fungieren und somit der Inhibition durch direkt-transfizierte regulatorische DC entgegenwirken. Nach dieser Hypothese wäre letztendlich das Verhältnis zwischen der Anzahl induzierter antigenpräsentierender DC im tolerogenen Zustand versus DC im muren bzw. immunogenen Zustand ausschlaggebend, wie erfolgreich eine Immunreaktion durch DNA-Vakzinierungen reguliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese mittels der durchgeführten in vivo DNA-Vakzinierungsexperimente weder eindeutig belegt noch widerlegt werden. Durch präventive biologische Koadministration von pCDH1-Fscn-MOG und Kontrollvektor wurde ein leicht jedoch nicht signifikant reduzierter EAE-Krankheitsverlauf identifiziert. Wurde MOG in Kombination mit den immunsupprimierenden Zytokinen TGF β oder IL-10 in DC spezifisch zur Koexpression gebracht, zeigte sich bei den Versuchsmäusen ein signifikant verminderter EAE-Krankheitsverlauf mit zeitlich verzögertem Beginn sowie reduziertem klinischen EAE-Score. Die EAE-Inhibition war ein antigenspezifischer Effekt. In vivo Transfektionen mit Kontrollvektor plus TGF β oder IL-10 führten zu keiner EAE-Reduktion sondern brachten einen Krankheitsverlauf vergleichbar mit der unbehandelten EAE-Kontrollgruppe hervor. Hiermit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die präventive DC-fokussierte ektopische Koexpression von MOG und TGF β oder IL-10 mit Hilfe des Fascin-Promotors zu einem reduzierten Krankheitsverlauf der MOGp35-55-induzierten EAE in C57BL/6-Mäusen führt. Die Ergebnisse legen die Argumentation nahe, dass durch präventive biologische

DNA-Vakzinierung antigenpräsentierende tolerogene DC induziert werden, welche die darauffolgende provozierte Immunreaktion gegen MOG_{p35-55} regulieren und somit eine Minderung der EAE-Pathologie bewirken. Im Vergleich zu der DC-fokussierten MOG-Expression über den Fascin-Promotor zeigten DNA-Vakzinierungen mit pCDH1-CMV-MOG differenzierte Auswirkungen auf den EAE-Krankheitsverlauf. So konnte nach präventiver biolistischer Koadministration von pCDH1-CMV-MOG und pCI-CMV-TGF- β ein signifikant verminderter EAE-Krankheitsverlauf mit zeitlich verzögertem Beginn sowie reduziertem klinischen EAE-Score identifiziert werden. Der induzierte inhibierende Effekt auf die klinische Ausprägung der EAE war vergleichbar zum entsprechenden Ansatz mit dem Fascin-Promotor. Bezogen auf die oben angeführte Hypothese konnte somit kein Unterschied zwischen der ubiquitären und DC-fokussierten ektopischen MOG-Expression in Kombination mit TGF β festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich bei Koadministration von pCDH1-CMV-MOG und pCI-CMV-IL10 im Gegensatz zu der entsprechenden Fascin-Gruppe kein inhibierender Effekt auf die EAE-Pathologie. Dieses Resultat könnte die oben aufgeführte Hypothese unterstützen, dass die unspezifische ektopische Antigenexpression nachteilig für den Erfolg biolistischer DNA-Vakzinierungen sein kann. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese zu untermauern.

Zusammenfassend konnte dargelegt werden, dass die präventive Gene Gun-vermittelte DNA-Kovakzinierung mit MOG-kodierenden Plasmiden in Kombination mit Plasmiden, die für TGF β oder IL-10 kodieren, grundsätzlich eine geeignete Methode ist, um eine darauffolgende induzierte EAE-Pathologie zu reduzieren. Der DC-fokussierte Fascin-Promotor erweist sich bei der Koapplikation von MOG und TGF β hinsichtlich des inhibierenden Effekts auf den EAE-Krankheitsverlauf im Vergleich zu dem ubiquitären CMV-Promotor weitestgehend als gleichwertig. Auf Grund seiner Möglichkeit das MOG-Antigen gezielt in DC ektopisch zur Expression zu bringen, stellt somit der Fascin-Promotor eine interessante Alternative zu ubiquitär aktiven Promotoren dar, um immunologische Mechanismen einer DNA-Vakzinierungsstrategie im Krankheitsmodell der EAE zu untersuchen.

4.1.3 Die EAE-Suppression ist durch eine reduzierte ZNS-Infiltration von Immunzellen und weniger axonaler Demyelinisierung gekennzeichnet.

Die EAE ist eine T-Zell-vermittelte autoimmune Erkrankung und durch Infiltration von immunogenen T-Zellen und Monozyten in das Zentrale Nervensystem charakterisiert¹⁹⁵. Das Ausmaß an Zellinfiltration korreliert bei der EAE generell mit dem Schweregrad der Krankheitsausprägung¹⁹⁶. Zahlreiche Forschungsarbeiten haben die Beteiligung von IFN γ -produzierenden Th1^{65,70,197,198} und IL-17-produzierenden Th17^{91,92,93} an der EAE-Pathologie aufgezeigt. Mit Hilfe histologischer und durchflusszytometrischer Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der EAE-Ausprägung mittels präventiver biolistischer DNA-Vakzinierung mit der Reduktion infiltrierender proinflammatorischer T-Zellpopulationen zusammenhängt. Zum Höhepunkt des EAE-Krankheitsverlaufs wurden ex vivo signifikant weniger CD4+ T-Zellen im ZNS von Versuchsmäusen identifiziert, die mit MOG- und TGF β -kodierender Plasmid-DNA kovakzinieren wurden als bei Mäusen, die mit Kontrollvektor behandelt wurden. Außerdem konnte bei diesen Gruppen sowie bei pCDH1-Fscn-MOG plus Kontrollvektor weniger infiltrierende CD11b^{hi},CD45.2^{hi}-positive Makrophagen im ZNS ausfindig gemacht werden. Die weitere Quantifizierung der Subpopulationen von CD4+ T-Effektorzellen ergab eine signifikant niedrigere Gesamtzellzahl von IL-17-produzierenden Th17 und IFN γ -produzierenden Th1 im ZNS von Mäusen, die mit pCDH1-Fscn-MOG oder pCDH1-CMV-MOG in Kombination mit TGF β -kodierender Plasmid-DNA behandelt wurden. TGF β ist ein Schlüsselmolekül in der peripheren Toleranz³⁹ und kann in autokriner sowie parakriner Weise auf DC und T-Zellen wirken¹⁹⁹. In der vorliegenden Arbeit werden mittels präventiver biolistischer DNA-Kovakzinierung mit MOG- und TGF β -kodierender Plasmid-DNA TGF β -exprimierende MOGp35-55-präsentierende DC induziert. Das TGF β kann dabei autokrin auf transfizierte DC wirken und ihre Maturierung inhibieren. Es wurde gezeigt, dass TGF β konditionierte DC nur geringe Mengen an MHC sowie den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 exprimieren³⁷. Aufgrund des tolerogenen Phänotyps sind derartig konditionierte DC grundsätzlich in der Lage, Immunreaktionen zu regulieren³¹ und inhibierend auf den Krankheitsverlauf einer EAE zu wirken⁴⁰. Die Kovakzinierung mit pCDH1-Fscn-MOG und IL-10 führte ebenfalls zu weniger Infiltration der beiden IL-17- und IFN γ -produzierenden T-Effektorzellpopulationen, wenn auch der

inhibierende Effekt geringer ausgefallen war. Des Weiteren wurde beobachtet, dass nicht nur die Gesamtzellzahl ZNS-infiltrierender Zellen durch präventive biologische DNA-Vakzinierungen beeinflusst wird, sondern auch der prozentuale Anteil von Effektorzellen an CD4⁺ T-Zellen. So war der prozentuale Anteil IL-17-produzierender Th17 im ZNS der Mäuse geringer, die mit MOG und TGF β oder IL-10 kovakzinieren wurden, als bei Mäusen, die mit Kontrollvektor behandelt wurden. Beachtenswert ist, dass der Anteil IFN γ -produzierender Th1 nur durch die Kovakzinierung von pCDH1-Fscn-MOG und pCI-CMV-IL-10 signifikant reduziert werden konnte, nicht jedoch durch Koapplikation von MOG- und TGF β -kodierender Plasmid-DNA. Diverse Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass IL-10 adaptive Th1- und Th2-Immunantworten reguliert, indem es T-Zellaktivierung und Differenzierung im Lymphknoten limitiert und proinflammatorische Immunantworten im Gewebe reduziert²⁰⁰. Joss et al.²⁰¹ konnte zeigen, dass IL-10 die T-Zell-Kostimulation verhindert, indem die Tyrosin-Phosphorylierung von CD28 verhindert wird. Dadurch wird die Anbindung der Phosphatidylinositol-3-Kinase blockiert und folglich die Produktion antigeninduzierter proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel IL-2, IFN γ , IL4, IL-5 und IL-13 inhibiert. In der vorliegenden Arbeit führt die DNA-Kovakzinierung mit pCDH1-Fscn-MOG und pCI-CMV-IL-10 zur in vivo Induktion IL-10 produzierender MOGp35-55 präsentierender DC, die in drainierende Lymphknoten auswandern. IL-10 kann sowohl in autokriner Weise die Reifung der DC in einen tolerogenen Status bewirken³³, als auch in parakriner Weise während der DC-Interaktion mit antigenspezifischen T-Zellen die Differenzierung zu IFN γ -produzierenden Th1 entgegenwirken²⁰², was in der Folge zu einer reduzierten ZNS-Infiltration dieser T-Effektorzellen führt.

Immunhistologische Untersuchungen bestätigten die mittels Durchflusszytometrie festgestellten reduzierten ZNS-Infiltrationen und konnten weiterhin zeigen, dass die beobachtete Inhibition der EAE-Ausprägung mit einem reduzierten Grad an axonaler Demyelinisierung einherging. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der mildere EAE-Krankheitsverlauf nach präventiver biologischer DNA-Kovakzinierung mit MOG- und TGF β - oder IL-10-kodierender Plasmid-DNA sowohl mit einer reduzierten Infiltration von pathogenen Immunzellen in das ZNS als auch mit einer Reduktion axonaler Demyelinisierung zusammenhängt.

4.1.4 Die präventive DNA-Kovakzinierung mit TGF β oder IL-10 führt zu einer antigenspezifischen Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort.

Nachdem dargelegt wurde, dass der mildere EAE-Krankheitsverlauf mit einer reduzierten Infiltration von immunogenen IFN γ + Th1 und IL-17+ Th17 in das ZNS der DNA-vakzinieren Versuchsmäuse einhergeht, sollten die zu Grunde liegenden immunologischen Mechanismen identifiziert werden. Zunächst wurde das Restimulierungspotenzial der Effektorzellen in der Peripherie untersucht. Es zeigte sich, dass Milzzellen aus Mäusen mit inhibierter EAE-Pathologie schlechter mit MOGp35-55 restimuliert werden konnten als Milzzellen der Kontrollgruppe. Wurden die Mäuse präventiv mit MOG- und TGF β -kodierender Plasmid-DNA kovakzinieren, so reagierten ex vivo zum phänotypischen Höhepunkt der EAE Milzzellen dieser Mäuse auf MOGp35-55-Restimulation mit einer signifikant geringeren IFN γ - und IL-17-Zytokinproduktion sowie mit einer geringeren antigenspezifischen T-Zellproliferation. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die präventive DNA-Vakzinieren die Th1- und Th17-Immunantwort in antigenspezifischer Weise inhibieren wurde.

Die in dieser Arbeit angewandte DNA-Vakzinierenstrategie zielt auf die in vivo Generieren tolerogener antigenpräsentierender DC ab. Erfolgt die Antigenpräsentation von DC ohne eine entsprechende Expression kostimulatorischer Moleküle, führt dies zum Zelltod bzw. zur Anergie von T-Zellen oder zur Induktion regulatorischer T-Zellen²⁰³. Fissolo et al.¹⁰⁷ konnte durch die alleinige i.m. Administration MOG-kodierender DNA eine Expansion CD4+CD25+Foxp3+ nTreg in C57BL/6-Mäusen darlegen. In der vorliegenden Arbeit konnte die beobachtete antigenspezifische Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort allerdings nicht auf die Expansion Foxp3+ regulatorischer T-Zellen zurückgeführt werden. Mittels durchflusszytometrischer Analysen zeigten sich zum phänotypischen Höhepunkt der EAE keine prozentualen Unterschiede in der Foxp3-Expression von CD4+ T-Zellen im ZNS sowie in den Lymphknoten und der Milz der unterschiedlich DNA-vakzinieren Mäuse. Allerdings erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis der Foxp3+ Treg in einem antigenunspezifischen Kontext. Somit ist nicht eindeutig dargelegt, ob quantitative Unterschiede bei den MOGp35-55-reaktiven nTreg vorliegen. Inwieweit die in dieser Arbeit durchgeführte DNA-Vakzinieren eine Konvertieren von Foxp3- T-Zellen zu Foxp3+ Treg induziert, könnte durch weiterführende Experimente mit Hilfe von MOGp35-55-Tetrameren in

einem Transfermodell eruiert werden. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit waren MOGp35-55-Tetramere nicht verfügbar. Des Weiteren muss in diesem Zusammenhang bedacht werden, dass die MOGp35-55/CFA-Immunisierung, wie sie bei der EAE-Induktion durchgeführt wird, per se zu einer Expansion Foxp3⁺ nTreg in den lymphoiden Organen führt¹⁰⁸.

Die Messung der antigenspezifischen TGFβ- und IL-10-Zytokinproduktion von Milzzellen gaben weiterhin keine Hinweise auf die Induktion von TGFβ-produzierenden Th3 oder IL-10-produzierenden Tr1. Somit bleibt es weiterhin fraglich, ob die durchgeführte präventive DNA-Vakzinierung zu einer Induktion antigenspezifischer Treg führte, welche die EAE-Pathologie inhibieren.

Nach heutigem Wissensstand über die pathologischen Prozesse in der EAE erfolgt initial das antigenspezifische Priming von enzephalithogenen T-Zellen in den sekundär lymphoiden Organen außerhalb des ZNS²⁰⁴. Aktivierte Myelin-reaktive T-Zellen gelangen in der Folge über den Blutkreislauf zum ZNS, werden durch ZNS-assoziierte APC, zum Beispiel Mikroglia oder DC, über Peptid:MHC-II reaktiviert¹⁸⁶ und können so zur lokalen ZNS-Entzündung beitragen. Durch die präventive DNA-Vakzinierung mit MOG- und TGFβ- oder IL10-kodierender Plasmid-DNA werden in der vorliegenden Arbeit MOGp35-55-präsentierende DC induziert. Die immunsuppressive Wirkung von TGFβ oder IL10 auf die transfizierten DC kann eine Antigenpräsentation ohne ausreichende Kostimulation zur Folge haben. Dies führt zu T-Zellanergie und steigert die antigenspezifische periphere Toleranz. Somit könnte das initiale Priming in den Lymphknoten supprimiert werden, was folglich zu einer geringeren T-Zellinfiltration in das ZNS und einem mildereren EAE-Krankheitsverlauf führt.

Weiterführende Experimente sollten sich auf die frühen immunologischen Vorgänge vor und nach der EAE-Induktion mit MOGp35-55/CFA konzentrieren, um die mittels DNA-Vakzinierung unmittelbar induzierten suppressiven Mechanismen zu identifizieren. Interessanterweise konnte zum zeitlichen Höhepunkt der EAE ein signifikant höherer Anteil an IFNγ⁺CD8⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von Mäusen entdeckt werden, die präventiv mit MOG- und TGFβ-kodierender Plasmid-DNA immunisiert wurden, als bei Mäusen der Leervektorkontrolle oder der unbehandelten EAE-Gruppe. Die exakte Rolle von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in der autoimmunen EAE-Pathologie wird momentan kontrovers diskutiert. Es wurden diverse CD8⁺ T-Zellsubpopulationen identifiziert, die über direkten Zellkontakt mit Zielzellen, zellkontaktunabhängig über Zytokinsekretion oder durch Induktion von Anergie in APC zur Suppression von

Autoimmunität beitragen können¹⁹⁷. Lee et al.⁴⁷ konnten die Beteiligung von CD8+CD122+ regulatorischen T-Zellen an der Heilung einer monophasischen MOGp35-55-induzierten EAE aufzeigen. Die Depletion von CD8+CD122+ Treg führte zu einer gesteigerten Anzahl ZNS-infiltrierender T-Zellen und zu einem schwereren EAE-Krankheitsverlauf. Umgekehrt bewirkte der zusätzliche Transfer von CD8+CD122+ Treg weniger ZNS-Entzündung und mildere EAE-Symptome in den Rezipienten. In einer anderen Studie von Chen et al.⁴⁸ wurden CD8+LAP+ T-Zellen identifiziert, die in einer TGFβ- und IFNγ-bedingten Weise die EAE-Pathologie supprimieren und die Konvertierung von Foxp3- zu Foxp3+ T-Zellen induzieren. In einer weiteren Publikation von York et al.⁵⁶ konnte die Regulation einer MOGp35-55-induzierten EAE auf die zytotoxisch-suppressive Aktivität von CD8+ T-Zellen zurückgeführt werden. Die regulatorischen CD8+ T-Zellen in dieser Studie produzierten IFNγ und Perforin und waren in der Lage MOG-beladene CD4+ T-Zellen und CD4-depletierte APC zu zerstören. Dass grundsätzlich transgenspezifische IFNγ-produzierende CD8+ T-Zellen durch DC-fokussierte biologische DNA-Vakzinierung mit dem Fascin-Promotor induziert werden können, wurde durch die Forschungsarbeiten von Ross et al.¹⁹¹ dargelegt. Der beobachtete signifikant höhere Anteil von IFNγ+CD8+ T-Zellen in der vorliegenden Arbeit könnte auf die Induktion antigenspezifischer CD8+ T-Zellen hinweisen und ein weiterer potenzieller Mechanismus für die mittels DNA-Vakzinierung induzierte antigenspezifische EAE-Suppression darstellen. Daher erscheint es sinnvoll, bei weiterführenden Arbeiten mit dem DNA-Vakzinierungsmodell die induzierten CD8+ T-Zellen zu charakterisieren und ihre immunmodulatorische Kapazität zu untersuchen.

4.2 Inhibition einer Kontaktallergie durch in vitro tolerogenisierte DC

4.2.1 In vitro Generierung tolerogener APC mit MDSC-Charakteristik durch Kultivierung von BM-DC in Gegenwart von DEX

Neben der in vivo Tolerogenisierung von DC mittels DNA-Immunisierung, wie es im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ist die in vitro Kultivierung von DC unter tolerogenisierenden Bedingungen mit anschließendem Zelltransfer eine alternative Strategie, um eine spezifische Immunregulation in Rezipienten zu induzieren. Hierbei haben sich verschiedene biologische und pharmakologische Substanzen, wie zum Beispiel die immunregulierenden Zytokine IL-10 und TGFβ²⁰⁵,

Vitamin D-Rezeptoragonisten²⁰⁶ oder Glucocorticoide¹⁴⁰, als geeignete Mittel zur Induktion eines tolerogenen Phänotyps in DC herausgestellt. Glucocorticoide werden als natürlich vorkommende Corticosteroidhormone während des Verlaufs einer Immunreaktion produziert¹³⁰, um in einer negativen Rückkopplung als Regulator der Inflammation zu fungieren¹³¹. Des Weiteren wurde eine erhöhte Glucocorticoid-Synthese bei diversen Tumorzellen festgestellt und als ein Mechanismus zum Schutz vor zerstörerischen Immunantworten beschrieben^{207,208}. Glucocorticoide wirken auf DC modulatorisch. Nach Anbindung an den zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor wird dieser aktiviert und kann u.a. über Protein-Protein-Wechselwirkungen die Funktionalität von immunrelevanten Transkriptionsfaktoren wie NFκB^{132,133}, NFAT¹³⁴ und AP-1¹³⁵ inhibieren. Es wurde gezeigt, dass humane¹⁴¹ und murine¹⁴⁰ DC durch die Wirkung des synthetisch hergestellten Glucocorticoids Dexamethason weniger MHC-II sowie kostimulatorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, ein geringeres T-Zellstimulierungspotenzial besitzen und als tolerogene APC in vivo die Immunantwort in einem allogenen Hauttransplantationsmodell inhibieren können^{209,210}. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch vorangegangene Studien gezeigt werden, dass Zellen der murinen DC-Zelllinie SP37A3 unter stimulierenden Bedingungen in Gegenwart von DEX einen protolerogenen Phänotyp annehmen und in der Lage sind, in vitro Treg zu induzieren¹⁴². In der vorliegenden Arbeit wurden knochenmarksabgeleitete Vorläuferzellen, die unter BM-DC-differenzierenden Konditionen und in Gegenwart von DEX generiert wurden, charakterisiert. Konsistent mit der aktuellen Datenlage konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen dargelegt werden, dass die Generierung und Kultivierung von BM-DC in Gegenwart von DEX zu APC führt, die signifikant reduzierte Expressionslevel an MHC-II und den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD83 und CD86 im Vergleich zu unbehandelten DC aufweisen. DEX-APC konnten in vitro durch den starken Aktivierungsstimulus LPS nicht zu einer vergleichbaren Maturierung gebracht werden wie unbehandelte BM-DC. Die Expression von MHC-II, CD83, CD86 und Fascin war durch LPS-Zugabe geringfügig und nicht signifikant höher als bei unstimulierten DEX-APC, aber signifikant niedriger als bei unstimulierten BM-DC und LPS-maturierten BM-DC. Diesem Expressionsprofil entsprechend wurde bei DEX-APC in vitro ein reduziertes T-Zellstimulierungspotenzial im Vergleich zu unbehandelten BM-DC nachgewiesen. In einer syngeneten Kokultur mit MOGp35-55-reaktiven 2D2 T-Zellen wurde eine signifikant geringere antigenspezifische T-Zellproliferation durch unstimulierte und LPS-stimulierte DEX-APC induziert als durch unstimulierte und LPS-

stimulierte BM-DC. Des Weiteren war die Fähigkeit LPS-stimulierter DEX-APC allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen, ähnlich gering wie die LPS-stimulierter BM-DC, die in Gegenwart der protolerogenen Zytokine IL-10 oder TGF β kultiviert wurden (Bros et al.; bisher unpublizierte Daten). Durch weitere phänotypische Charakterisierung der differentiell konditionierten APC konnten erhöhte Expressionslevel der Differenzierungsmarker GR1 für DEX-APC unabhängig vom Aktivierungsstatus und CD11b für LPS-stimulierte DEX-APC nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass bei der in vitro Generierung von BM-DC zu einem frühen Zeitpunkt der Kultur an Tag 3 bis 4 transient myeloide DC-Vorläuferzellen entstehen, die GR1, CD11b und F4/80 exprimieren und suppressive Aktivität auf allogene sowie syngene antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellimmunantworten ausüben ²¹¹. In einer anderen Arbeit konnten erhöhte Zellzahlen an MDSC in Mäusen mit Tumoren identifiziert werden. Diese MDSC sind ebenfalls für die Marker GR1, CD11b und F4/80 positiv und spielen bei der Tumorassoziierten Immunsuppression eine essentielle Rolle ¹⁸². Im Einklang mit der Beschreibung von MDSC aus diesen beiden Publikationen konnte bei DEX-APC unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus signifikant höhere Expressionslevel von F4/80 identifiziert werden. Des Weiteren wurde bei DEX-APC ein signifikant geringerer CD11c-Expressionslevel als bei den entsprechenden unbehandelten BM-DC festgestellt. MDSC wurden als CD11c negative Zellpopulation beschrieben ²¹¹ und murine DC, die durch IL-10 tolerogenisiert wurden, weisen ebenfalls eine geringe CD11c-Expression auf ²¹². In vielen anderen Studien mit tolerogenen DC wurde die CD11c-Expression nicht erfasst, sodass direkte Vergleiche nicht vollzogen werden können. Unsere Daten sowie die Ergebnisse der zitierten Publikationen deuten daraufhin, dass eine geringe CD11c-Expression zumindest für einige tolerogene APC-Populationen charakteristisch ist. Dass es sich bei den DEX-APC weder um plasmacytoide DC noch um Makrophagen handelte, konnte durch die fehlende Oberflächenexpression der Differenzierungsmarker B220 und CD14 belegt werden. Zusammenfassend legen die gewonnenen Ergebnisse die Argumentation nahe, dass durch die frühe Zugabe von DEX an Tag 3 der Kultur die Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen zu BM-DC unterbunden wird und modifizierte APC mit reduziertem T-Zellstimulierungspotenzial entstehen. Auf Grund ihres CD11c^{low},CD11b⁺,GR1^{high},F4/80^{high} Expressionsprofils weisen DEX-APC eindeutig phänotypische Charakteristika von MDSC auf.

4.2.2 Therapeutischer Transfer von DEX-APC führt zu Toleranz im murinen Krankheitsmodell der CHS.

Unter physiologischen Bedingungen weisen immature und semi-mature DC einen tolerogenen Phänotyp auf und sind durch Induktion von Anergie, Apoptose und Tregs an der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz maßgeblich beteiligt ²⁸. Der therapeutische Nutzen von immaturen BM-DC wurde in diversen Forschungsarbeiten untersucht, und es wurden kontroverse Ergebnisse erzielt. In einer Publikation von Lutz et al ²¹³ wurden immature BM-DC in Gegenwart von geringen GM-CSF-Konzentrationen und IL-4 generiert, die stimulationsresistent waren, einen protolerogenen Phänotyp aufwiesen und in einem Transplantationsmodell präventiv appliziert die Abstoßungsreaktion signifikant verzögerten. In einer weiteren Arbeit führte hingegen die Injektion von immaturen BM-DC in allogenen Mäusen zu einer T-Zellantwort vom Th2-Typ und zu einer verstärkten Transplantatabstoßungsreaktion ²¹⁴. Auf Grund der weitestgehenden Stimulationsresistenz und der phänotypischen Charakteristik von MDSC stellte sich die Frage des therapeutischen Nutzens von DEX-APC. In einem Hapten-induzierten murinen Krankheitsmodell der CHS konnte kein kurativer Effekt durch Injektion Hapten-gepulster immaturer BM-DC festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte die therapeutische Applikation von Hapten-gepulsten DEX-APC zu einer signifikant reduzierten Ohrschwellungsreaktion. Nach erneuter Hapten-Provokation einen Monat später zeigte sich für unstimulierte DEX-APC weiterhin eine signifikant reduzierte Ohrschwellungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Resultat könnte darauf hinweisen, dass die Injektion unstimulierter Hapten-gepulster DEX-APC zu nachhaltiger Toleranzinduktion, vielleicht durch in vivo Induktion von Treg, in dem CHS-Modell führte. Bei dieser Interpretation muss allerdings bedacht werden, dass die Injektion unterschiedlich konditionierter BM-DC bzw. DEX-APC und die nachfolgende erste Provokation zunächst in einer unterschiedlich starken T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation resultiert. Theoretisch könnte dadurch zum Zeitpunkt der erneuten Provokation ein Monat später eine neue Ausgangssituation mit quantitativ unterschiedlichen T-Effektorzellzahlen gegeben sein. Die beobachtete reduzierte Ohrschwellung bei Mäusen der DEX-APC-Gruppe könnte nach dieser Argumentation nicht in immunologischen Toleranzmechanismen begründet sein, sondern in dem Vorkommen einer zu diesem Zeitpunkt geringeren Anzahl restimulierbarer T-Effektorzellen als bei Mäusen der Kontrollgruppe.

Interessanterweise konnte mit den Hapten-gepulsten und LPS-stimulierten DEX-APC trotz ihres in vitro stimulierungsresistenten und tolerogenen Phänotyps nur eine moderate CHS-Suppression erreicht werden. Nach erneuter Hapten-Provokation einen Monat später konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine reduzierte Ohrschwellungsreaktion festgestellt werden. Demnach scheint die LPS-Stimulation die in vivo Fähigkeit von DEX-APC zur Toleranzinduktion zu beeinträchtigen, was nicht durch in vitro MLR-Untersuchungen und phänotypische Charakterisierungen mittels Durchflusszytometrie ersichtlich wird.

Mit den vorliegenden in vivo Experimenten wurde zum ersten Mal die tolerogene Kapazität von DEX-APC in einem syngenem murinen CHS-Krankheitsmodell aufgezeigt. Weiterführende Arbeiten sollten auf molekularer Ebene die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen untersuchen. Weiterhin ist es eine offene und spannende Fragestellung, ob DEX-APC auch im syngenem autoimmunen Krankheitsmodell der EAE von therapeutischem Nutzen sind.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass potente tolerogene DC sowohl in vivo als auch in vitro induziert werden können. Dass diese Zellpopulation effektiv antigenspezifische Immunreaktionen supprimieren kann, macht sie zu einem vielversprechenden Werkzeug in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) spielen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Regulierung antigenspezifischer Immunantworten. Aus diesem Grund wird der therapeutische Einsatz von DC zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien sowie zur Tumorbekämpfung erforscht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten wir das Potenzial einer biolistischen DNA-Vakzinierung zur Induktion tolerogener DC *in vivo*. Im Tiermodell der Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein Peptid 35-55 (MOGp35-55) induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) sollte mittels präventiver biolistischer Kovakzinierung von Plasmid-DNA kodierend für MOG und die immunregulatorischen Zytokine TGF β oder IL-10 eine protektive Immunität induziert werden. Die MOG-Expression stand dabei entweder unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors oder des murinen Fascin-Promotors, um eine ektopische MOG-Expression spezifisch in dermalen DC und Langerhanszellen zu erreichen. Dass MOGp35-55-präsentierende DC nach biolistischer DNA-Vakzinierung von der Haut in die drainierenden Lymphknoten migrieren und dort T-Zellen aktivieren, konnte im Vorfeld anhand einer substanziellen Proliferation von MOGp35-55-reaktiven 2D2 T-Zellen nachgewiesen werden. Im präventiven Ansatz der MOGp35-55-induzierten EAE zeigten Mäuse, die mit MOG-kodierenden Plasmiden biolistisch transfiziert wurden, eine leicht reduzierte EAE-Symptomatik. Die Kotransfektion von MOG und TGF β führte zu einer Verstärkung der EAE-Suppression – unabhängig davon, ob die MOG-Expression unter der Kontrolle des CMV- oder des Fascin-Promotors stand. Interessanterweise resultierte die Koapplikation von MOG- und IL-10-kodierender Plasmid-DNA nur bei DC-fokussierter MOG-Expression zu reduzierter EAE-Symptomatik. Für biolistische DNA-Vakzinierungen stellt somit der Fascin-Promotor eine potente Alternative zu viralen Promotoren dar. Entsprechend der mildereren EAE-Symptome beobachteten wir bei behandelten EAE-Mäusen einen geringeren Grad an Demyelinisierung sowie eine reduzierte Infiltration des ZNS mit IFN γ -produzierenden CD4⁺ Th1- und IL-17-produzierenden CD4⁺ Th17-Zellen. Desweiteren zeigten Milzzellen *ex vivo* nach MOGp35-55-Restimulation eine inhibierte Proliferation und eine signifikant reduzierte IFN γ - und IL-17-Zytokinproduktion. Überraschenderweise ging die antigenspezifische

Immunsuppression nicht mit der Expansion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen einher. Da die Milzen aber erhöhte Mengen an CD8⁺IFN γ ⁺ T-Zellen aufweisen, könnte ein zytotoxisch-suppressiver Mechanismus für die Inhibition der Th1- und Th17-Immunantwort verantwortlich sein. Nachfolgende Untersuchungen sind notwendig, um die induzierten immunologischen Mechanismen mittels biologischer DNA-Vakzinierung aufzuklären.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Generierung von tolerogenen DC in vitro. Dafür wurden murine Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Gegenwart des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason (DEX) kultiviert. Die DEX-Zugabe führte zur Differenzierung von APC mit geringer CD11c-Expression. DEX-APC waren in vitro weitestgehend gegen LPS stimulationsresistent und zeigten eine reduzierte Expression von MHC-II und den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD40. Ihrem tolerogenen Phänotyp entsprechend besaßen DEX-APC ein geringeres syngenes T-Zellstimulierungspotenzial als unbehandelte BM-DC. Anhand der erhöhten Oberflächenexpression von CD11b, GR1 und F4/80 besteht eine phänotypische Ähnlichkeit zu myeloiden Suppressorzellen. Die Fähigkeit von DEX-APC in vivo antigenspezifische Toleranz zu induzieren, wurde durch einen therapeutischen Ansatz im murinen Krankheitsmodell der Kontaktallergie überprüft. Die therapeutische Applikation von DEX-APC führte hierbei im Vergleich zur Applikation von PBS oder unbehandelten BM-DC zu einer signifikant reduzierten Ohrschwellungsreaktion.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass potente tolerogene DC sowohl in vivo als auch in vitro induziert werden können. Dass diese Zellpopulation effektiv antigenspezifische Immunreaktionen supprimieren kann, macht sie zu einem vielversprechenden Werkzeug in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien.

6. Abstract

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells (APC) that play a pivotal role in activation and regulation of antigen-specific immune responses. Therefore it is a central scientific interest to use DC as a therapy of autoimmune disorders, allergies and tumours.

In the first part of this thesis we investigated the potential of biolistic gene transfer via the skin to induce tolerogenic DC in vivo. In an animal model of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOGp35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) we performed preventive biolistic coadministration of plasmid DNA encoding MOG and the immunoregulatory cytokines TGF β and IL-10 to induce protective immunity. MOG expression was either under control of the murine DC specific fascin promoter to transcriptionally target ectopic MOG expression to dermal DC and Langerhans cells or under control of the ubiquitously active CMV promoter. Initially the in vivo activation of MOG-reactive T cells via biolistic DNA vaccination was investigated. Flow cytometry analyses revealed a substantial proliferation of MOGp35-55-reactive 2D2 T cells indicating migration of MOGp35-55-presenting DC from the skin to the draining lymph nodes. In a preventive experimental setting of MOGp35-55-induced EAE, mice transfected with MOG-encoding plasmids alone displayed a slight amelioration of EAE symptoms. This suppressive effect was enhanced by co-expression of TGF β and independent from the promoter controlling MOG-expression making the fascin promoter a powerful alternative to viral promoters for DNA vaccination. Interestingly the co-application of MOG- and IL-10-encoding plasmid DNA ameliorated EAE symptoms only when ectopic MOG expression was targeted specifically to DC. Accordant to reduced EAE symptoms we observed a reduced demyelination and a decreased infiltration of IFN γ producing CD4 $^{+}$ Th1 cells and IL-17 producing CD4 $^{+}$ Th17 cells in the central nervous system (CNS). Furthermore, upon antigen-specific in vitro restimulation splenocytes of treated EAE-mice showed inhibited proliferation and significantly reduced IFN γ and IL-17 cytokine production. Surprisingly, antigen-specific immune suppression is not due to an expansion of Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells. It could possibly derive from a cytotoxic-suppressive mechanism, since the spleens of DNA vaccinated EAE-mice display significantly enhanced numbers of CD8 $^{+}$ IFN γ $^{+}$ T cells. To closely characterize the mechanisms responsible for the

suppressed immune reaction further analyses of the immunological effects triggered by biolistic DNA-vaccination are necessary.

The second part of this thesis focusses on the generation of tolerogenic DC in vitro. Murine bone marrow cells were cultured under conditions prompting a differentiation of bone marrow-derived DC (BM-DC) and the synthetic glucocorticoid (GC) dexamethasone (DEX) was added. GC are known to be produced endogenously in response to inflammation as a negative feedback regulatory mechanism by cells of the adrenal cortex. Here we show that early addition of DEX to BM-DC culture results in the differentiation of CD11c^{low} APC characterized by reduced expression of MHC-II and the costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 compared to BM-DC. Furthermore these so called DEX-APC displayed resistance to upregulate these molecules upon stimulation with LPS. In contrast to untreated BM-DC and accordant to their tolerogenic phenotype DEX-APC fail to potentially stimulate syngenic T-cells in vitro at either state of stimulation. Further flow cytometry analyses revealed that DEX-APC highly express CD11b, GR1 and F4/80, resembling the phenotypic characteristics of myeloid derived suppressor cells. To analyse if in vitro differentiated DEX-APC can induce antigen-specific tolerance in vivo we used the animal model of contact hypersensitivity (CHS). The therapeutic application of DEX-APC resulted in a significantly reduced ear swelling reaction compared to untreated BM-DC or PBS control.

In summary, the results of this thesis demonstrate that the induction of potent tolerogenic DC is possible in vivo and in vitro and that this cell population can vitally drive suppressive antigen-specific immune reactions which are highly desired for the curation of autoimmunity and allergies.

7. Literaturverzeichnis

1. Conlon, P., Oksenberg, J. R., Zhang, J. & Steinman, L. The Immunobiology of Multiple Sclerosis: An Autoimmune Disease of the Central Nervous System. *Neurobiology of Disease* **6**, 149–166 (1999).
2. Siffrin, V. *et al.* In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* **33**, 424–436 (2010).
3. Olson, J. K., Eagar, T. N. & Miller, S. D. Functional Activation of Myelin-Specific T Cells by Virus-Induced Molecular Mimicry. *J Immunol* **169**, 2719–2726 (2002).
4. Van Noort, J. M., Bajramovic, J. J., Plomp, A. C. & Van Stipdonk, M. J. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **105**, 46–57 (2000).
5. Gold, R., Linington, C. & Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953–1971 (2006).
6. Fritz, R. B., Chou, C. H. & McFarlin, D. E. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL/J)F1 mice by myelin basic protein and its peptides: localization of a second encephalitogenic determinant. *J. Immunol.* **130**, 191–194 (1983).
7. Johns, T. G. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J. Immunol.* **154**, 5536–5541 (1995).
8. Tuohy, V. K., Sobel, R. A. & Lees, M. B. Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *J. Immunol.* **140**, 1868–1873 (1988).
9. Paterson, P. Y. TRANSFER OF ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS IN RATS BY MEANS OF LYMPH NODE CELLS. *J Exp Med* **111**, 119–136 (1960).
10. Ben-Nun, A., Wekerle, H. & Cohen, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **11**, 195–199 (1981).
11. Borràs, F. E., Matthews, N. C., Lowdell, M. W. & Navarrete, C. V. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood.

- Br. J. Haematol.* **113**, 925–931 (2001).
12. Suto, A. *et al.* Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Produce IFN- γ upon IL-4 Stimulation. *J Immunol* **175**, 5681–5689 (2005).
 13. Allen, C. D. C. & Cyster, J. G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* **20**, 14–25 (2008).
 14. Valladeau, J. *et al.* Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71–81 (2000).
 15. Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F. & Shortman, K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* **100**, 1734–1741 (2002).
 16. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389–400 (1995).
 17. Schuler, Steinman. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* **161**, 526–546 (1985).
 18. Huang, F. P. & MacPherson, G. G. Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance. *Curr. Mol. Med.* **1**, 457–468 (2001).
 19. Mosialos, G. *et al.* Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* **148**, 593–600 (1996).
 20. Ross, R., Endlich, A., Kumpf, K., Schwing, J. & Reske-Kunz, A. B. Maturation of epidermal Langerhans cells in vitro is accompanied by downregulation of 4F2 (CD98) as determined by differential display. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 57–61 (1998).
 21. Ross, R., Ross, X.-L., Schwing, J., Längin, T. & Reske-Kunz, A. B. The Actin-Bundling Protein Fascin Is Involved in the Formation of Dendritic Processes in Maturing Epidermal Langerhans Cells. *J Immunol* **160**, 3776–3782 (1998).
 22. Geissmann, F. *et al.* Accumulation of Immature Langerhans Cells in Human Lymph Nodes Draining Chronically Inflamed Skin. *J Exp Med* **196**, 417–430 (2002).
 23. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).

24. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984–993 (2003).
25. Lenschow, D. J. *et al.* Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11054–11058 (1993).
26. Edwards, A. D. *et al.* Microbial Recognition Via Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways Determines the Cytokine Response of Murine Dendritic Cell Subsets to CD40 Triggering. *J Immunol* **169**, 3652–3660 (2002).
27. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of Interleukin 10–Producing, Nonproliferating Cd4+ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J Exp Med* **192**, 1213–1222 (2000).
28. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**, 445–449 (2002).
29. Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M. & Karjalainen, K. Anatomical Origin of Dendritic Cells Determines Their Life Span in Peripheral Lymph Nodes. *J Immunol* **165**, 4910–4916 (2000).
30. Menges, M. *et al.* Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med* **195**, 15–21 (2002).
31. Torres-Aguilar, H. *et al.* Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4+ T Cells. *J Immunol* **184**, 1765–1775 (2010).
32. Ding, L. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* **148**, 3133–3139 (1992).
33. Steinbrink, K., Wölfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**, 4772–4780 (1997).
34. Groux, H. *et al.* A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
35. Levings, M. K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* **105**, 1162–1169 (2005).
36. Gregori, S. *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**, 935–944

- (2010).
37. Mou, H., Lin, M., Cen, H., Yu, J. & Meng, X. TGF- β 1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J Zhejiang Univ Sci* **5**, 1239–1244 (2004).
 38. Luo, X. *et al.* Dendritic cells with TGF- β 1 differentiate naïve CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2821–2826 (2007).
 39. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K. & Weiner, H. L. Th3 Cells in Peripheral Tolerance. I. Induction of Foxp3-Positive Regulatory T Cells by Th3 Cells Derived from TGF- β T Cell-Transgenic Mice. *J Immunol* **178**, 179–185 (2007).
 40. Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. & Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237–1240 (1994).
 41. Fukaura, H. *et al.* Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* **98**, 70–77 (1996).
 42. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* **251**, 547–548 (1974).
 43. Liu, C. C., Joag, S. V., Kwon, B. S. & Young, J. D. Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J. Immunol.* **144**, 1196–1201 (1990).
 44. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 361–370 (2003).
 45. Dinesh, R. K., Skaggs, B. J., Cava, A. L., Hahn, B. H. & Singh, R. P. CD8+ Tregs in Lupus, Autoimmunity, and Beyond. *Autoimmun Rev* **9**, 560–568 (2010).
 46. Cosmi, L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107–4114 (2003).
 47. Lee, Y.-H. *et al.* Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* **180**, 825–832 (2008).
 48. Chen, M.-L., Yan, B.-S., Kozoriz, D. & Weiner, H. L. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur. J. Immunol* **39**,

- 3423–3435 (2009).
49. Crawford, M. P. *et al.* High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* **103**, 4222–4231 (2004).
 50. Neumann, H., Medana, I. M., Bauer, J. & Lassmann, H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* **25**, 313–319 (2002).
 51. Tennakoon, D. K. *et al.* Therapeutic Induction of Regulatory, Cytotoxic CD8⁺ T Cells in Multiple Sclerosis. *J Immunol* **176**, 7119–7129 (2006).
 52. Koh, D. R. *et al.* Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science* **256**, 1210–1213 (1992).
 53. Sun, D. *et al.* Myelin Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Are Encephalitogenic and Produce Severe Disease in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology* **166**, 7579–7587 (2001).
 54. Ford, M. L. & Evavold, B. D. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8⁺ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology* **35**, 76–85 (2005).
 55. Huseby, E. S. *et al.* A Pathogenic Role for Myelin-Specific Cd8⁺ T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. *J Exp Med* **194**, 669–676 (2001).
 56. York, N. R. *et al.* Immune regulatory CNS-reactive CD8⁺T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* (2010).
doi:10.1016/j.jaut.2010.01.003
 57. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145–173 (1989).
 58. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
 59. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
 60. Fujita, H. *et al.* Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21795–21800 (2009).

61. Macatonia, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071–5079 (1995).
62. Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y.-N. & Liu, Y.-J. Natural Interferon α/β -Producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity. *J Exp Med* **192**, 219–226 (2000).
63. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146 (2003).
64. Cher, D. J. & Mosmann, T. R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* **138**, 3688–3694 (1987).
65. Merrill, J. E. *et al.* Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 574–578 (1992).
66. Baron *et al.* Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* **177**, 57–68 (1993).
67. Kuchroo, V. K. *et al.* Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **151**, 4371–4382 (1993).
68. Chitnis, T. *et al.* Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **108**, 739–747 (2001).
69. Bettelli, E. *et al.* Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* **200**, 79–87 (2004).
70. Ando, D. G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J. L. & Sercarz, E. E. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell. Immunol* **124**, 132–143 (1989).
71. Traugott, U. & Lebon, P. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann. Neurol.* **24**, 243–251 (1988).
72. Ferber, I. A. *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* **156**, 5–7 (1996).
73. Gran, B. *et al.* IL-12p35-Deficient Mice Are Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Evidence for Redundancy in the IL-12 System in the Induction of Central Nervous System Autoimmune Demyelination. *J Immunol*

- 169**, 7104–7110 (2002).
74. Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M. & Groth, B. F. de S. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* **176**, 1091–1098 (1992).
75. Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. & Rao, A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 607–656 (2006).
76. Ohshima, Y. *et al.* OX40 Costimulation Enhances Interleukin-4 (IL-4) Expression at Priming and Promotes the Differentiation of Naive Human CD4⁺ T Cells Into High IL-4–Producing Effectors. *Blood* **92**, 3338–3345 (1998).
77. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).
78. Nawijn, M. C. *et al.* Enforced Expression of GATA-3 in Transgenic Mice Inhibits Th1 Differentiation and Induces the Formation of a T1/ST2-Expressing Th2-Committed T Cell Compartment In Vivo. *J Immunol* **167**, 724–732 (2001).
79. Robinson, D. S. *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298–304 (1992).
80. Lafaille, J. J. *et al.* Myelin Basic Protein–specific T Helper 2 (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts Rather than Protect Them from the Disease. *J Exp Med* **186**, 307–312 (1997).
81. Das, M. P., Nicholson, L. B., Greer, J. M. & Kuchroo, V. K. Autopathogenic T Helper Cell Type 1 (Th1) and Protective Th2 Clones Differ in Their Recognition of the Autoantigenic Peptide of Myelin Proteolipid Protein. *J Exp Med* **186**, 867–876 (1997).
82. Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17 and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* **183**, 7169–7177 (2009).
83. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
84. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
85. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of

- pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
86. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
87. Zhou, L. & Littman, D. R. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **21**, 146–152 (2009).
88. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**, 484–487 (2007).
89. Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol* **9**, 556 (2009).
90. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, 345–350 (2007).
91. Becher, B., Durell, B. G. & Noelle, R. J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* **110**, 493–497 (2002).
92. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748 (2003).
93. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **201**, 233–240 (2005).
94. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723–737 (1970).
95. Möller, G. Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* **27**, 247–250 (1988).
96. Sakaguchi, S. *et al.* T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **9**, 211–220 (1996).
97. Chen, W. *et al.* Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875–1886 (2003).
98. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* **204**, 1303–1310 (2007).
99. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**, 345–352 (2005).
100. Fontenot, J. D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead

- transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329–341 (2005).
101. Vieira, P. L. *et al.* IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* **172**, 5986–5993 (2004).
 102. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68–73 (2001).
 103. Chatila, T. A. *et al.* JM2, encoding a fork head–related protein, is mutated in X-linked autoimmunity–allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* **106**, R75–R81 (2000).
 104. Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A. & Miller, S. D. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **169**, 4712–4716 (2002).
 105. Schif-Zuck, S., Wildbaum, G. & Karin, N. Coadministration of plasmid DNA constructs encoding an encephalitogenic determinant and IL-10 elicits regulatory T cell-mediated protective immunity in the central nervous system. *J. Immunol* **177**, 8241–8247 (2006).
 106. Kang, Y. *et al.* FK506 as an adjuvant of tolerogenic DNA vaccination for the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Gene Med* **11**, 1064–1070 (2009).
 107. Fissolo, N. *et al.* Treatment with MOG-DNA vaccines induces CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation* **9**, 139 (2012).
 108. Korn, T. *et al.* Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* **13**, 423–431 (2007).
 109. Fissolo, N., Montalban, X. & Comabella, M. DNA-based vaccines for multiple sclerosis: current status and future directions. *Clin. Immunol.* **142**, 76–83 (2012).
 110. Ada, G. Vaccines and vaccination. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1042–1053 (2001).
 111. Porgador, A. *et al.* Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen Presentation to CD8+ T Cells after Gene Gun Immunization. *J Exp Med* **188**, 1075–1082 (1998).

112. Bouloc, A., Walker, P., Grivel, J. C., Vogel, J. C. & Katz, S. I. Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA: a role for migratory dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 446–454 (1999).
113. Shedlock, D. J. & Weiner, D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* **68**, 793–806 (2000).
114. Diebold, S. S., Cotten, M., Koch, N. & Zenke, M. MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther* **8**, 487–493 (2001).
115. Kurth, R. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Dev. Biol. Stand.* **93**, 45–56 (1998).
116. Ledwith, B. J. *et al.* Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* **104**, 33–43 (2000).
117. Williams, R. S. *et al.* Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2726–2730 (1991).
118. Lobell, A. *et al.* Suppressive DNA vaccination in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis involves a T1-biased immune response. *J. Immunol* **170**, 1806–1813 (2003).
119. Andersson, A. *et al.* Impaired autoimmune T helper 17 cell responses following DNA vaccination against rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* **3**, e3682 (2008).
120. Lobell, A. *et al.* Presence of CpG DNA and the Local Cytokine Milieu Determine the Efficacy of Suppressive DNA Vaccination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* **163**, 4754–4762 (1999).
121. Sudowe, S., Ludwig-Portugall, I., Montermann, E., Ross, R. & Reske-Kunz, A. B. Transcriptional Targeting of Dendritic Cells in Gene Gun-Mediated DNA Immunization Favors the Induction of Type 1 Immune Responses. *Mol Ther* **8**, 567–575 (2003).
122. Ramshaw, I. A. *et al.* DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 409–413 (1997).
123. Ross, R. *et al.* Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther.* **10**, 1035–1040 (2003).
124. Bros, M., Ross, X.-L., Pautz, A., Reske-Kunz, A. B. & Ross, R. The Human Fascin Gene Promoter Is Highly Active in Mature Dendritic Cells Due to a Stage-

- Specific Enhancer. *J Immunol* **171**, 1825–1834 (2003).
125. Mosialos, G. *et al.* Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kilodalton actin-bundling protein. *J Virol* **68**, 7320–7328 (1994).
126. Pinkus, G. S. *et al.* Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* **150**, 543–562 (1997).
127. Sudowe, S. *et al.* 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* **128**, e193–e205 (2009).
128. Lutz, M. B. Therapeutic Potential of Semi-Mature Dendritic Cells for Tolerance Induction. *Front Immunol* **3**, (2012).
129. Leung, D. Y. M. & Bloom, J. W. Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 3–22; quiz 23 (2003).
130. Besedovsky, H., Sorkin, E., Keller, M. & Müller, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **150**, 466–470 (1975).
131. Munck, A., Guyre, P. M. & Holbrook, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **5**, 25–44 (1984).
132. Caldenhoven, E. *et al.* Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **9**, 401–412 (1995).
133. De Bosscher, K. *et al.* Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13504–13509 (1997).
134. Paliogianni, F. & Boumpas, D. T. Glucocorticoids regulate calcineurin-dependent trans-activating pathways for interleukin-2 gene transcription in human T lymphocytes. *Transplantation* **59**, 1333–1339 (1995).
135. Zhang, X. K., Dong, J. M. & Chiu, J. F. Regulation of alpha-fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site. *J. Biol. Chem.* **266**, 8248–8254 (1991).
136. Almawi, W. Y. & Melemedjian, O. K. Molecular mechanisms of glucocorticoid

- antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 9–15 (2002).
137. Amano, Y., Lee, S. W. & Allison, A. C. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol. Pharmacol.* **43**, 176–182 (1993).
138. Blotta, M. H., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J. Immunol.* **158**, 5589–5595 (1997).
139. Crinelli, R. *et al.* Selective inhibition of NF- κ B activation and TNF- α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol. Dis.* **26**, 211–222 (2000).
140. Moser, M. *et al.* Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol* **25**, 2818–2824 (1995).
141. Piemonti, L. *et al.* Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation. *The Journal of Immunology* **162**, 6473 –6481 (1999).
142. Bros, M. *et al.* 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* **109**, 3820–3829 (2007).
143. Bros, M. *et al.* Mutated cylindromatosis gene affects the functional state of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2848–2857 (2010).
144. Bar-Or, A. *et al.* Induction of antigen-specific tolerance in multiple sclerosis after immunization with DNA encoding myelin basic protein in a randomized, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Arch. Neurol.* **64**, 1407–1415 (2007).
145. Lobell, A. *et al.* Vaccination with DNA Encoding an Immunodominant Myelin Basic Protein Peptide Targeted to Fc of Immunoglobulin G Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* **187**, 1543–1548 (1998).
146. Unkeless J.C. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* **150**, 580–596 (1979).
147. Bettelli, E. *et al.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 1073 –1081 (2003).
148. Grunstein, M. & Hogness, D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **72**,

- 3961–3965 (1975).
149. Beuken, E., Vink, C. & Bruggeman, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *BioTechniques* **24**, 748–750 (1998).
150. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
151. ARBER, W. & DUSSOIX, D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol* **5**, 18–36 (1962).
152. Lobban, P. E. & Kaiser, A. D. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol* **78**, 453–471 (1973).
153. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467 (1977).
154. Rougeon, F. & Mach, B. Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **73**, 3418–3422 (1976).
155. Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R. & Reske, K. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Methods* **154**, 253–264 (1992).
156. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77–92 (1999).
157. Kim, J. A. *et al.* A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosens Bioelectron* **23**, 1353–1360 (2008).
158. Bros, M. *et al.* A novel plasmid DNA electroporation method allows transfection of murine DC. *Journal of Immunological Methods* **343**, 13–20 (2009).
159. Ford, A. L., Goodsall, A. L., Hickey, W. F. & Sedgwick, J. D. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J. Immunol* **154**, 4309–4321 (1995).
160. Julius, M. H., Simpson, E. & Herzenberg, L. A. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol* **3**, 645–649 (1973).

-
161. Parish, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* **77**, 499–508 (1999).
 162. Lyons, A. B. & Parish, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **171**, 131–137 (1994).
 163. Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. & Ikehara, Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 18545–18552 (1988).
 164. Prinz, M. *et al.* Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* **28**, 675–686 (2008).
 165. Gell, P. G. H. & Benacerraf, B. STUDIES ON HYPERSENSITIVITY. *J Exp Med* **113**, 571–585 (1961).
 166. Gell, P. H. G., and R. A. A. Coombs. Clinical Aspects in Immunology. *Blackwell, Oxford*. (1968).
 167. Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A. & Sercarz, E. E. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* **358**, 155–157 (1992).
 168. Vanderlugt, C. J. & Miller, S. D. Epitope spreading. *Current Opinion in Immunology* **8**, 831–836 (1996).
 169. Yu, M., Johnson, J. M. & Tuohy, V. K. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J. Exp. Med* **183**, 1777–1788 (1996).
 170. Kleiter, I. *et al.* Smad7 in T cells drives T helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **133**, 1067–1081 (2010).
 171. Powell, M. B. *et al.* Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *Int. Immunol* **2**, 539–544 (1990).
 172. Segal, B. M., Dwyer, B. K. & Shevach, E. M. An Interleukin (IL)-10/IL-12 Immunoregulatory Circuit Controls Susceptibility to Autoimmune Disease. *The Journal of Experimental Medicine* **187**, 537–546 (1998).
 173. Domingues, H. S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H. & Krishnamoorthy, G. Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental

- Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE* **5**, e15531 (2010).
174. Axtell, R. C., Xu, L., Barnum, S. R. & Raman, C. CD5-CK2 Binding/Activation-Deficient Mice Are Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Protection Is Associated with Diminished Populations of IL-17-Expressing T Cells in the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* **177**, 8542–8549 (2006).
 175. Ji, Q. & Goverman, J. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1103**, 157–166 (2007).
 176. Najafian, N. *et al.* Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest* **112**, 1037–1048 (2003).
 177. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* **10**, 1969–1980 (1998).
 178. Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* **182**, 18–32 (2001).
 179. Segura, E., Wong, J. & Villadangos, J. A. Cutting Edge: B220+CCR9- Dendritic Cells Are Not Plasmacytoid Dendritic Cells but Are Precursors of Conventional Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **183**, 1514–1517 (2009).
 180. Muñoz-Fernández, R. *et al.* Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J. Immunol.* **177**, 280–289 (2006).
 181. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162–174 (2009).
 182. Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D. I. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice. *J Immunol* **181**, 5791–5802 (2008).
 183. Steinman, R. M. *et al.* Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 15–25 (2003).
 184. Hauser, S. L. & Oksenberg, J. R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* **52**, 61–76 (2006).
 185. Chastain, E. M. L., Duncan, D. S., Rodgers, J. M. & Miller, S. D. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 265–274 (2011).

-
186. Becher, B., Bechmann, I. & Greter, M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* **84**, 532–543 (2006).
 187. Tompkins, S. M. *et al.* De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **168**, 4173–4183 (2002).
 188. Ho, P. P. *et al.* Tolerizing DNA vaccines for autoimmune arthritis. *Autoimmunity* **39**, 675–682 (2006).
 189. Prud'homme, G. J., Draghia-Akli, R. & Wang, Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther.* **14**, 553–564 (2007).
 190. Qin, J. Y. *et al.* Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE* **5**, e10611 (2010).
 191. Ross, R. *et al.* Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther* **10**, 1035–1040 (0000).
 192. Bourquin, C., Iglesias, A., Berger, T., Wekerle, H. & Linington, C. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-DNA vaccination induces antibody-mediated autoaggression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3663–3671 (2000).
 193. Rutella, S., Danese, S. & Leone, G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **108**, 1435–1440 (2006).
 194. Sudowe, Stephan, Bros, Matthias, Ross, Ralf & Reske-Kunz, Angelika B. Potential der DNA-Vakzinierung zur Prävention und Therapie von allergischen Krankheiten. *Allergologie* **6**, 228–232 (2007).
 195. ROBINSON, A. P., HARP, C. T., NORONHA, A. & MILLER, S. D. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* **122**, 173–189 (2014).
 196. Allen, S. J., Baker, D., O'Neill, J. K., Davison, A. N. & Turk, J. L. Isolation and characterization of cells infiltrating the spinal cord during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Biozzi AB/H mouse. *Cell. Immunol.* **146**, 335–350 (1993).
 197. Waldburger, K. E., Hastings, R. C., Schaub, R. G., Goldman, S. J. & Leonard, J. P. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis after in vitro treatment with recombinant murine interleukin-12. Preferential expansion of

- interferon-gamma-producing cells and increased expression of macrophage-associated inducible nitric oxide synthase as immunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol* **148**, 375–382 (1996).
198. Pettinelli, C. B. & McFarlin, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.* **127**, 1420–1423 (1981).
199. Rubtsov, Y. P. & Rudensky, A. Y. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 443–453 (2007).
200. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* **180**, 5771–5777 (2008).
201. Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. & Akdis, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1683–1690 (2000).
202. Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
203. Lutz, M. B. & Kurts, C. Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2325–2330 (2009).
204. Korn, T., Anderson, A. C., Bettelli, E. & Oukka, M. The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* **191**, 51–60 (2007).
205. Morelli, A. E. & Thomson, A. W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 610–621 (2007).
206. Adorini, L. & Penna, G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. *Handb Exp Pharmacol* 251–273 (2009). doi:10.1007/978-3-540-71029-5_12
207. Vrezas, I. *et al.* Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: basic and clinical aspects. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 308–314 (2003).
208. Sidler, D. *et al.* Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncoimmunology* **1**, 529–530 (2012).
209. Rea, D. *et al.* Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* **95**, 3162–3167 (2000).

210. Roelen, D. L. *et al.* Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation* **76**, 1608–1615 (2003).
211. Rössner, S. *et al.* Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3533–3544 (2005).
212. Wakkach, A. *et al.* Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* **18**, 605–617 (2003).
213. Lutz, M. B. *et al.* Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1813–1822 (2000).
214. Buonocore, S., Flamand, V., Goldman, M. & Braun, M. Y. Bone marrow-derived immature dendritic cells prime in vivo alloreactive T cells for interleukin-4-dependent rejection of major histocompatibility complex class II antigen-disparate cardiac allograft. *Transplantation* **75**, 407–413 (2003).

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| AMP ^R | Ampicillin-Resistenzgen |
| AP-1 | activating protein |
| APC | Antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle |
| BCR | B cell receptor |
| BM-DC | bone marrow-derived dendritic cell, Knochenmarksabgeleitete DC |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | bovine serum albumin |
| CCR | Chemokine receptor |
| CD | cluster of differentiation |
| CD40L | CD40 ligand |
| cDNA | complementary DNA |
| CFDA-SE | carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester |
| CFSE | Carboxyfluorescein <i>N</i> -succinimidyl ester |
| CHS | contact hypersensitivity, Kontaktallergie |
| CLIP | class-II-associated invariant chain peptide |
| CMV | Cytomegalie-Virus Promotor, pCMV |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| copGFP | copepod green fluorescent protein |
| CpG | Cytidin-Phosphat-Guanosin-Motiv |
| cpm | counts per minute |
| CTL | cytotoxic T lymphocyte, zytotoxische T-Zelle |
| CTLA-4 | cytotoxic T lymphocyte antigen-4 |
| DC | dendritic cell, dendritische Zelle |
| DEX | Dexamethason |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| DNBS | 2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure |
| DNFB | 2,4-Dinitroflourbenzol |
| dNTP | Desoxyribonucleosid-triphosphat |
| DTH | delayed type hypersensitivity |

| | |
|-------------------|--|
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FACS | fluorescence activated cell sorter |
| FCS | fetal calf serum |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| Fscn | Fascin-Promotor; pFascin |
| Foxp3 | forkhead box P3 |
| FSC | Forward scatter; Vorwärtsstreulicht |
| GC | Glucocorticoid |
| GITR | glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| GR | Glucocorticoidrezeptor |
| GRE | glucocorticoid response element |
| H ₂ O | Wasser |
| HBS | heparin buffered saline |
| HLA | human histocompatibility leukocyte antigen |
| ³ HTdR | Trithium-markiertes Thymidin |
| i.d. | intradermal |
| i.m. | intramuskulär |
| i.v. | intravenös |
| iDC | immature DC |
| IFN | Interferon |
| IFN γ R | IFN γ Rezeptor |
| IFN γ -KO | IFN γ knock out |
| Ig | Immunglobuline |
| li | Invariante Kette |
| IL | Interleukin |
| IL-12R | IL-12 Rezeptor |
| IL-23R | IL-23 Rezeptor |
| IPEX | immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome |
| iTreg | induzierte Treg |
| kb | Kilobasen |
| LB | Luria Bertani |

| | |
|----------------|--|
| LN | lymphnode, Lymphknoten |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Mol |
| MACS | Magnetic Activated Cell Sorting |
| mDC | mature DC |
| MBP | Myelin Basisches Protein |
| MCS | multiple cloning site |
| MDSC | Myeloid derived suppressor cell |
| MFI | mean fluorescent intensity |
| MHC | major histocompatibility complex |
| miRNA | microRNA |
| MLR | Mixed leukocyte reaction |
| MOG | Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein |
| MOGp35-55 | MOG Peptidsequenz 35-55 |
| mRNA | messenger RNA |
| MS | Multiple Sklerose |
| NF- κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells |
| NFAT | nuclear factor of activated t cells |
| NK | natural killer |
| nTC | naive T-Zelle |
| nTreg | natürliche Treg |
| ORF | open reading frame |
| OVA | Ovalbumin |
| PAMP | pathogen associated molecular patterns |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion |
| PD-1 | programmed cell death |
| PD-L1 | programmed death ligand-1 |
| pDC | Plasmazytoide DC |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen | Penicillin |
| PerCP | Peridinin chlorophyll protein |
| PLP | Myelin Proteolipid Protein |
| PRR | pathogen recognition receptors, |

| | |
|--------------|--|
| RRMS | relapsing-remitting multiple sclerosis |
| RNA | ribonucleic acid |
| RT | Raumtemperatur |
| smDC | semi-mature DC |
| SOCS | suppressors of cytokine signaling |
| SPMS | secondary progressive multiple sclerosis |
| SSC | side scatter, Seitwärtsstreulicht |
| STAT | signal transducers and activators of transcription |
| Strep | Streptomycin |
| TCR | T cell receptor, T-Zellrezeptor |
| tDC | tolerogene DC |
| TGF β | transforming growth factor β |
| Th | T-Helferzelle |
| TLR | toll-like receptor |
| TNF α | tumor necrosis factor |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | untranslatierte Region |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

9. Anhang

Abbildung 30: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse nach Anreicherung von 2D2 T-Zellen aus der Milz mittels Nylonwolle-Säulen (siehe 2.3.5.1)

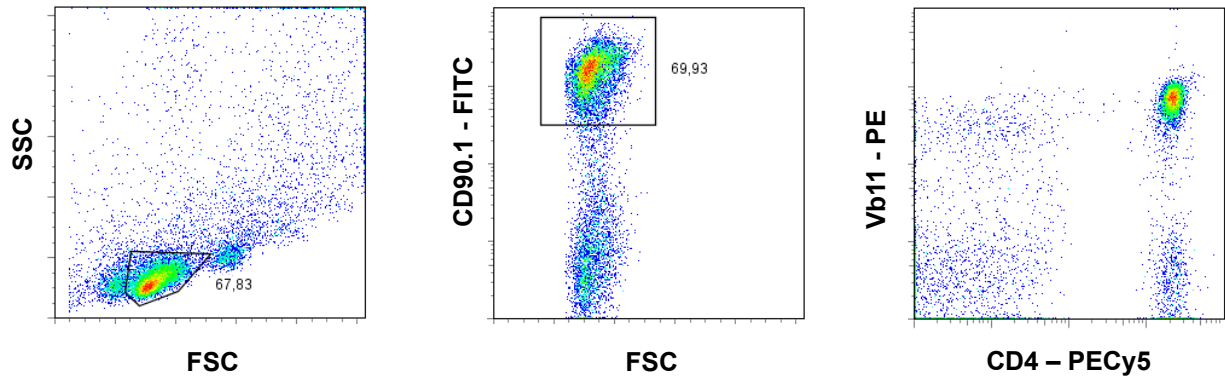


Abbildung 31: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse nach Anreicherung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus der Milz mit der MACS[®]-Methode (siehe 2.3.5.2)

Milzszellsuspension

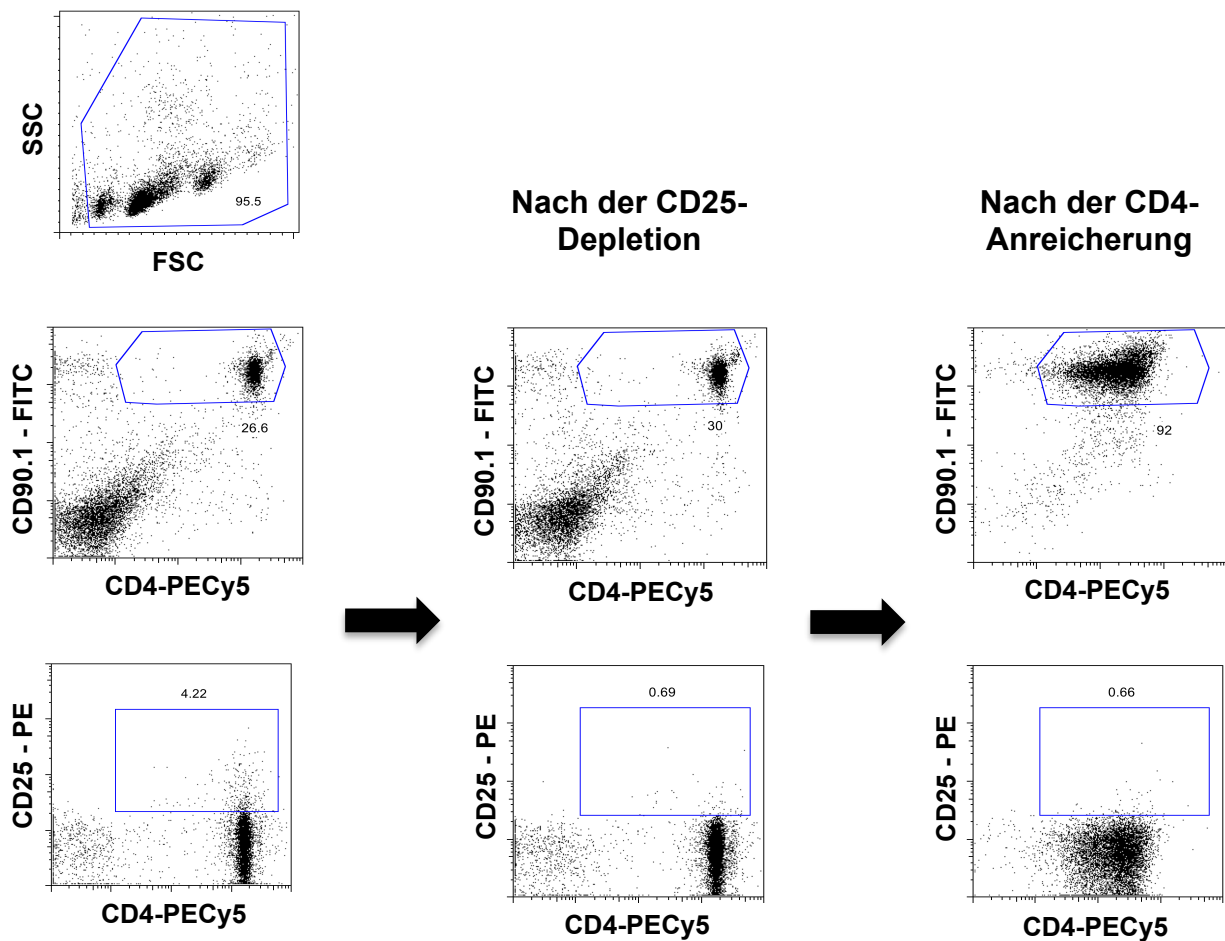
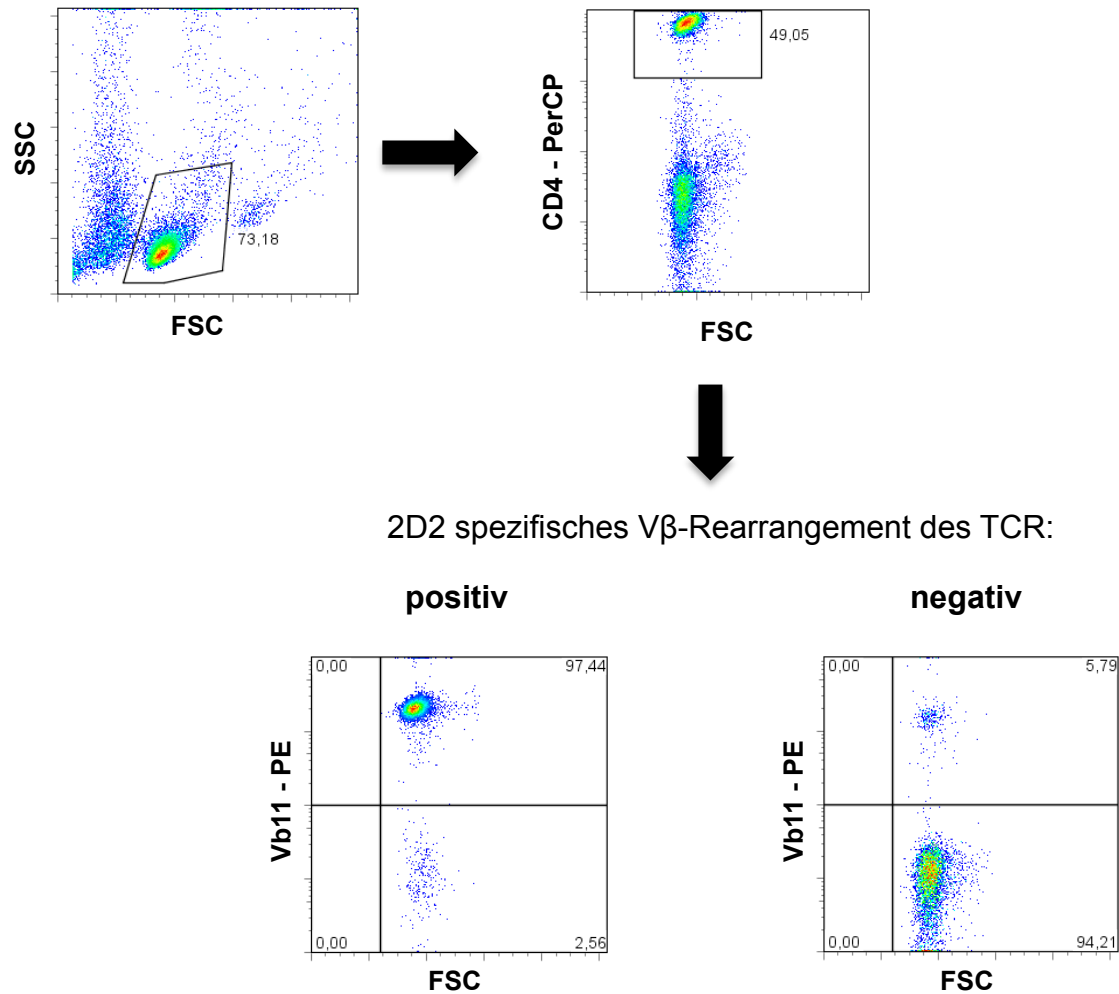


Abbildung 32: Beispiel für eine durchflusszytometrische Analyse zur Typisierung der 2D2-Mauszucht (siehe 2.6.2)



10. Lebenslauf